

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FOLATOS EM VEGETAIS – INFLUÊNCIA DO TIPO DE CULTIVO E
DO PROCESSAMENTO

Juliana Azevedo Lima

Bacharel em Química
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de
Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP
2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

L628f Lima, Juliana Azevedo
Folatos em vegetais - influência do tipo cultivo e
processamento / Juliana Azevedo Lima. – Campinas, SP: [s.n.],
2005.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Folatos. 2.Vegetais. 3.Análise. 4.Cromatografia.
I.I.Godoy, Helena Teixeira. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título

cars-fea

BANCA EXAMINADORA

.....
Dra. Helena Teixeira Godoy

.....
Dra. Elenice Haruko Murate

.....
Dra. Maria Teresa Mendes Ribeiro Borges

.....
Dra. Hilary Castle de Menezes

.....
Dra. Myrna Sabino

.....
Dr. Marcelo Alexandre Prado

.....
Dr. João Bosco Faria

" Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los."

Dalai Lama

Dedico e agradeço especialmente
a meus pais *Miguel* e *Cleusa* e
ao meu amor *Wandinho*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, pela vida e por ter permitido que esse trabalho fosse realizado.

À **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, especialmente ao **Departamento de Ciência de Alimentos** por possibilitar a realização do trabalho.

À **CAPES** pelo suporte financeiro.

Aos membros da **Banca Examinadora** pelas contribuições e sugestões apresentadas.

À **Profa. Helena** pela orientação, carinho, apoio, amizade e por se mostrar um exemplo a ser seguido.

Ao meu namorado **Wandinho** pelo amor, apoio e paciência, sempre...

À minha família **Miguel, Cleusa, Marcio e Dri** por todo incentivo e amor.

Aos meus sobrinhos **Diguinho, Gui e Larinha**, por ordem de chegada, pela “higiene mental” nos finais de semana...

Aos amigos ***Claudinha, Ju, Dani, Elizete, Silvane, CD, Lísia, Roger, Camila, Elenice, Teca, Gisele e Rodrigo*** pelos passeios ao shopping, churrascos, apoio e companheirismo.

Aos ***colegas do Laboratório de Análise de Alimentos*** pelo apoio.

À ***Regina e Cristina*** por toda ajuda.

Ao ***Cosme, Marquinho, Marcão*** e à ***Jardete*** pela disposição em ajudar.

Ao ***peçoal do Laboratório de Bioquímica*** pelo empréstimo do fogão.

A ***todos*** que ajudaram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho.

Obrigada

Ju

RESUMO

Apesar das recentes descobertas a respeito das possíveis ações benéficas dos folatos na saúde humana, ainda são poucos os dados a respeito dos reais teores dessa vitamina nos alimentos brasileiros, principalmente para os vegetais, considerados as principais fontes desse nutriente. Mais escassos ainda são os estudos sobre a estabilidade dos folatos após o cozimento doméstico e o processamento industrial de alimentos. Considerando-se que a concentração de folatos em alimentos é bastante dependente das condições edafoclimáticas, torna-se relevante avaliar essa vitamina em vegetais brasileiros, a fim de se assegurar a ingestão dos folatos pela população. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o estudo de folatos em vegetais considerados ricos nessa vitamina. Para a determinação dos folatos, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta. O método foi validado e aplicado para amostras de espinafre, brócolis, tomate, catchup, molho e suco de tomate, com pequenas adaptações na metodologia referentes à etapa de extração das amostras e no sistema de separação cromatográfica. De forma geral, os parâmetros de validação estabelecidos, para os produtos analisados, foram de 94% para recuperação, coeficiente de variação inferior a 1,4% nos ensaios de repetibilidade e 5, 30, 30, 7pg/mL e 5ng/mL foram os limites de detecção estabelecidos para 5-metiltetraidrofolato (5-metilTHF), 5-formiltetraidrofolato (5-formilTHF), 10-formiltetraidrofolato (10-formilTHF), tetraidrofolato (THF) e 10-metiltetraidrofolato (10-metilTHF), respectivamente. Em tomate e produtos derivados o único folato encontrado foi o 5-metilTHF. Não se observou diferença significativa, entre os teores dessa forma da vitamina, encontrados em tomates cultivados de forma tradicional (entre 176,0 a 326,9µg/100) e orgânica (208,7 a 345,1µg/100g). Nos produtos de tomate verificou-se que a concentração de 5-metilTHF variou significativamente, tanto entre marcas, quanto entre lotes analisados para cada produto. Para catchup, molho e suco de tomate os valores obtidos variaram entre 58,8 e 265,9µg/100g, 103,9 e 325,0µg/100g e 138,9 e 330,8µg/100g, respectivamente. Assim, tanto o tomate como os seus produtos derivados podem ser considerados fontes de folatos. No brócolis além do 5-metilTHF, o 5-formilTHF também foi detectado. Nesse caso, observou-se diferença significativa entre os

teores de 5-metilTHF obtidos para o cultivo orgânico (954,0 a 1740,0µg/100g para 5-metilTHF e 7,9 a 13,6µg/100g para 5-formilTHF) e tradicional (414,0 a 742,0µg/100g para 5-metilTHF e 4,8 a 12,8µg/100g para 5-formilTHF), tendo a forma orgânica apresentado as maiores concentrações. No caso do 5-formilTHF não se observou diferença significativa devida ao cultivo. Verificou-se, também, que o brócolis cozido em água, apresentou perdas de aproximadamente 68%, sendo que a maior parte da vitamina (53%) ficou na água de cozimento, indicando ser o processo de lixiviação o maior responsável pela perda dos folatos. Para o espinafre as mesmas formas de folatos encontradas em brócolis (5-metilTHF e 5-formilTHF) foram detectadas. Tanto para brócolis, quanto para espinafre, o 5-metilTHF representou aproximadamente 99% do teor total de folatos. Verificou-se, entretanto, em espinafre, não haver diferença significativa entre os teores de folatos obtidos por cultivo tradicional (386,0 a 550,4µg/100g para 5-metilTHF e 4,0 a 6,3µg/100g para o 5-formilTHF) e orgânico (295,3 a 599,9µg/100g para 5-metilTHF e 5,0 a 7,7µg/100g para o 5-formilTHF). As concentrações das diferentes formas de folatos, em espinafres colhidos em diferentes épocas do ano (setembro a novembro/2002 e maio e julho de 2003) também foram avaliados e revelaram não haver diferença significativa para os valores obtidos ao longo do período estudado. O cozimento em água resultou em perdas de aproximadamente 79% para o 5-metilTHF e 66% para o 5-formilTHF. Pela determinação dos teores de folatos na água de cozimento, concluiu-se que, também para esse caso, as perdas se deram, principalmente, devido a lixiviação. Os resultados obtidos permitiram, portanto, concluir-se que todos os vegetais avaliados no trabalho podem ser considerados importantes fontes de folatos, entretanto, o cozimento em água ocasionou enormes perdas da vitamina. Dessa forma, recomenda-se o aproveitamento da água de cozimento como forma de garantir a ingestão desse importante nutriente.

SUMMARY

Despite the recent discoveries about the possible beneficial actions of folates to human health, data on the real contents of this vitamin in Brazilian foods, are little, ever for vegetables, considered the main source of this nutrient. Scarcer still are studies on the stability of folates after domestic cooking and industrial food processing. Considering that the concentration of folates in foods is somewhat dependent on the soil/climate conditions, it becomes important to evaluate this vitamin in Brazilian vegetables, in order to guarantee the ingestion of folates by the population. Thus the main of this study was to contribute to the knowledge of folates in foods. Folates were determined by high performance liquid chromatography technique. The method was validated and applied to samples of spinach, broccoli, tomatoes, ketchup, sauce and tomato juice. Small adaptations in the methodology were made for the extraction step of the samples and others in the chromatographic separation system. In general, the validation parameters established for the products analyzed were of 94% for recovery, variation coefficient below 1.4% in the repeatability assays and detection limits of 5, 30, 30, 7pg/mL and 5ng/mL 5-methyl-tetrahydrofolate (5-methylTHF), 5-formyl-tetrahydrofolate (5-formylTHF), 10-formyl-tetrahydrofolate (10-formylTHF), tetrahydrofolate (THF) and 10-methyl- tetrahydrofolate (10-methylTHF), respectively. For tomatoe and tomato products the only folate form was 5-methylTHF. There was no significant difference between the contents of this form of the vitamin found in tomatoes cultivated by the traditional (176,0 to 326,9µg/100g) and the organic method (208.7 to 345.1µg/100g) form. For tomatoe products, both, brands and batches showed significant differences in the concentration of 5-methylTHF. For ketchup, sauce and tomato juice the values were from 58.8 to 265.9µg/100g, 103.9 to 325.0µg/100g and 138.9 to 330.8µg/100g, respectively. Thus, tomatoes and tomato products can be considered as folates sources. In broccolis, in addition to 5-methylTHF, 5-formylTHF was also detected. In this case, these was a significant difference in the contents of 5-methylTHF for the organic (954.0 to 1740.0µg/100g for 5-methylTHF and 7.9 to 13.6µg/100g for 5-formylTHF) and traditional (414.0 to 742.0µg/100g for 5-methylTHF and 4.8 to 12.8µg/100g for 5-formylTHF) cultivation, the organic form presenting higher concentrations. For 5-formylTHF there was not significant difference. It was also noted, that when the broccoli was cooked in water, the losses were of approximately 85%, that most of the vitamin (70%) being founder the cooking water, indicating that the leaching process is responsible for the greater losses of folates. For the

spinach the same folates forms were found as in broccolis (5-methylTHF and 5-formylTHF). For both, broccoli and spinach, 5-methylTHF corresponds to approximately 99% of the folates contents. For spinach there was no significant difference in the folates contents for traditional (386.0 to 550.4 μ g/100g for 5-methylTHF and 4.0 to 6.3 μ g/100g for 5-formylTHF) and organic (295.3 to 599.9 μ g/100g for 5-methylTHF and 5.0 to 7.7 μ g/100g for 5-formylTHF) cultivation. The contents of the different folate forms, in spinach were also evaluated at different periods of the year (September to November/2002 and May to July/2003), and it was concluded there was no significant difference between the values obtained in the periods studied. Cooking in water resulted in losses of 66% for 5-methylTHF and 47% for 5-formylTHF. The determination of folates in the cooking water, confirmed that, in this case, the losses were mostly due to leaching, most of the vitamin, being found in the water. It was concluded that all the vegetables evaluated in this study could be considered important folates sources, however, the cooking in water caused enormous losses of the vitamin. It is therefore of great importance to use the cooking water so that adequate amounts of this important nutrient are ingested.

ÍNDICE

Introdução.....	1
Referências Bibliográficas.....	3
 CAPÍTULO 1 - FOLATOS EM VEGETAIS: IMPORTÂNCIA, EFEITO PROCESSAMENTO E BIODISPONIBILIDADE.....	5
Resumo.....	6
Introdução.....	7
Importância dos folatos.....	9
Folatos em vegetais.....	11
Efeitos de cozimento e processamento nos teores de folatos em vegetais.....	14
Biodisponibilidade de folatos.....	15
Abstract.....	16
Referências bibliográficas.....	17
 CAPÍTULO 2 - VALIAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM TOMATE E PRODUTOS PROCESSADOS.....	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e Método.....	27
Produtos avaliados.....	27
Determinação de folatos.....	28
Reagentes.....	29
Equipamento.....	29
Validação da metodologia.....	30
Análise estatística.....	31
Resultados e Discussão.....	31
Validação da metodologia.....	31
Etapa analítica.....	34

Conclusões.....	37
Referências Bibliográficas.....	40

CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DO TEOR DE FOLATOS EM BRÓCOLIS ORGÂNICO E TRADICIONAL *IN NATURA* E PERDAS NO PROCESSO DE COCÇÃO EM ÁGUA.....

Resumo.....	43
Abstract.....	44
Introdução.....	45
Material e Método.....	47
Produtos avaliados.....	47
Determinação da umidade.....	48
Determinação de folatos.....	48
Reagentes.....	49
Equipamento.....	49
Validação da metodologia.....	49
Análise estatística.....	51
Resultados e Discussão.....	51
Validação da metodologia.....	51
Etapa analítica.....	52
Conclusões.....	57
Referências Bibliográficas.....	58

CAPÍTULO 4- DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ESPINAFRE – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TIPO DE CULTIVO, ÉPOCA DE PLANTIO E COZIMENTO.....

Resumo.....	63
Abstract.....	64
Introdução.....	65
Material e Método.....	67
Produtos avaliados.....	66
Determinação da umidade.....	68
Determinação de folatos.....	68

Reagentes.....	69
Equipamento.....	70
Validação da metodologia.....	70
Análise estatística.....	71
Resultados e Discussão.....	71
Validação da metodologia.....	71
Etapa analítica.....	73
Conclusões.....	79
Referências Bibliográficas.....	80
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 83
 SUGESTÕES.....	 84

INTRODUÇÃO

As vitaminas são substâncias orgânicas indispensáveis à manutenção das funções metabólicas do organismo e portanto, da saúde. São micronutrientes classificados em lipossolúveis e hidrossolúveis que devem ser obtidos da dieta, já que não são sintetizados pelo homem (Goodman e Gilman, 1991). No grupo das vitaminas hidrossolúveis estão os folatos, forma do ácido fólico sintético naturalmente encontrada nos alimentos, conhecido como vitamina B₉, B₁₁, B_c e M (Katzung, 1994).

A história da descoberta dos folatos teve início em 1935, quando começaram a ser descritos uma série de distúrbios, decorrentes da deficiência nutricional de um composto pertencente à família do ácido pteroilglutâmico, cujo o protótipo do grupo era o ácido fólico (Devlin, 1987). São considerados nutricionalmente essenciais por serem precursores de uma grande variedade de derivados que atuam como coenzimas nas reações de transferência de carbono. Essas reações ocorrem em dois importantes ciclos em vegetais e mamíferos, o “ciclo de biossíntese de DNA” e o “ciclo de metilação” (Scott et al., 2000). Cada uma das diferentes formas de folatos que são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano, desempenha um papel específico no metabolismo intracelular (Hawkes e Villota, 1989).

Essa vitamina está presente em vários alimentos, principalmente, vegetais verdes escuros, fígado, grãos, produtos à base de leite fermentado entre outros, sendo os vegetais as fontes mais importantes, não só pelo consumo, mas também pelos altos teores (Gregory III, 1989). O 5-metiltetraidrofolato (5-metilTHF) tem sido apontado como o congênera majoritário. A grande variação nos níveis da vitamina encontrada nesses alimentos pode ser devida aos diferentes métodos de análise utilizados nas determinações, porém outros fatores também podem ser muito importantes. Nos vegetais os derivados de folatos e sua distribuição nas diferentes porções da planta são afetados pela luz, já que a síntese da vitamina ocorre na fotorespiração (Carl et al., 1995; Wagner, 1995). Além disso, os folatos presentes nos vegetais estão predominantemente na forma de poliglutamatos, porém a estocagem desses alimentos pode levar à hidrólise dessa forma por conjugases endógenas (Leichter et al., 1979; Müller, 1993). Scott et al. (2000) também apontam o grau de maturação como um parâmetro importante no teor de folatos nesse tipo de alimento, já que eles participam do processo de divisão celular. Portanto, a quantidade deve ser maior nos tecidos em divisão do que nos tecidos já maduros, onde não há ocorrência desse processo. Minerais como Mg²⁺ e K⁺ também são bastante

importantes na produção de folatos pelos vegetais, participando de uma das etapas de biossíntese dessa vitamina (Vahteristo et al., 1997).

Dentre os vegetais ricos em folatos, espinafre, brócolis e tomate figuram em lugar de destaque. Porém, os teores da vitamina encontrados, para o mesmo alimento, em diferentes trabalhos, variam bastante, o que gera pouca confiabilidade dos dados relacionados à ingestão da vitamina por parte da população.

O estudo da estabilidade de folatos em alimentos é dificultado pela existência de várias formas da vitamina, variações na suscetibilidade à degradação e influência de fatores ambientais como pH, concentração de oxigênio e metais, entre outros (Gregory III, 1989, Hawkes e Villota, 1989). Nesse aspecto, os valores apresentados pela literatura ainda são relativamente desconhecidos. Franco (1992) mostrou a ocorrência de 50% de perdas da vitamina após o cozimento de alimentos, enquanto Katzung (1994) já relatou perdas de até 90%.

Os folatos, como as outras vitaminas hidrossolúveis e os minerais, estão sujeitos a lixiviação pela água de cozimento, além da própria degradação química. Elevadas perdas de folatos têm sido relatadas em vegetais cozidos, sendo a maior porcentagem devida ao processo de lixiviação (Gregory III, 1989, Hawkes e Villota, 1989). A quantidade retida em vegetais cozidos, somada à quantidade de vitamina na água é equivalente ao teor no vegetal cru (Scott et al., 2000). Leichter et al. (1979) afirmaram que as perdas devidas a esse processo variaram de 22 a 84% para vegetais cozidos por 10 minutos. Esses dados indicaram que a extração da vitamina pela água é a maior responsável pela perda de folatos durante o cozimento. Klein et al (1979) determinaram que o cozimento de espinafre em água acarretaria perda 77% de da vitamina, já Chen e Cooper (1979) determinaram 33% de perda após cozimento a 100°C por 3 minutos para o mesmo alimento. Para brócolis De Souza e Eitenmiller (1986) , citados por Hawkes e Villota (1989) registraram uma perda de 60% de folatos após o cozimento em água.

Em se tratando de processamento industrial sabe-se que esse procedimento deve atender às melhores condições microbiológicas e tecnológicas, minimizando a destruição de nutriente e mudanças organolépticas. No caso especial da fabricação de alimentos enlatados, etapas de lavagem e branqueamento estão envolvidos e os teores de folatos encontrados são diferentes quando comparados ao alimento cru, devido também, principalmente, ao fenômeno da lixiviação (Scott et al., 2000).

Dados da literatura apontam que as deficiências nutricionais estão se tornando uma das maiores causas de preocupação em relação ao bem estar da população mundial (Hawkes e Villota, 1989). Dentre os principais problemas causados pela deficiência de folatos estão as malformações congênitas, que desencadearam campanhas de incentivo ao consumo de folatos em vários países, além de problemas cardíacos, associado ao acúmulo de homocisteína no sangue, doenças degenerativas, incluindo mal de Alzheimer, por dificultar a síntese de mielina e a anemia megaloblástica (Parodi, 1997; Scott et al., 2000; Iwatani et al., 2003, Gregory III, 1989, Konings et al., 2001, Cho et al., 2002, Yon e Hyun, 2003).

Dessa forma, foram objetivos deste trabalho a determinação de folatos em espinafre, brócolis, tomate, catchup, suco e molho de tomate, a verificação da influência do tipo de cultivo e época de colheita nos teores da vitamina nos vegetais *in natura* e a avaliação da estabilidade dos folatos após o processo de cozimento em água de brócolis e espinafre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARL, G.F., HUDSON, F.Z., McGUIRE, B.S. Rat liver subcellular folate distribution shows association of formyltetrahydropteroylpentaglutamates with mitochondria and methyltetrahydropteroylhexaglutamates with cytoplasm. **J. Nutr.** 125, 2096-2103, 1995.
- CHEN, T.S.; COOPER, R.G. Thermal destruction of folacin: effect of ascorbic acid, oxygen and temperature. **J. Food Sci.**, v.44, n.3, p. 713-419, 1979.
- CHO, S., JOHNSON, G., SONG, W.O. Folate Content of Foods: Comparison Between Databases Compiled and After New FDA Fortification Requirements. **J. of Food Comp. Anal.**, v. 15, p.293-307, 2002.
- DESOUZA, S.C.; EITENMILLER, R.R. Effects of processing and storage on the folate content of spinach and broccoli. **J. Food Sci.**, v.51, p.526-628, 1986.
- DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1997, 1007p.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992, 307p.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1987, 1985p.

- GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Adv. Food Nutr. Research**, v.3, p.1-101, 1989.
- IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A.K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. *J. Food Comp. Anal.*, v.16, p. 37-48, 2003.
- HAWKES, J.G.; VILLOTA, T.H. Folates in foods: Reactivity, Stability during processing and nutritional implications. **Critical Rev. Food Sci. Nutr.**, v.28, n.6, p.439-539, 1989.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.
- KLEIN, B.P. et al. Folacin content in microwave and conventionally cooked spinach. **J. Food Sci.**, v.46, n.2, p.286-292, 1979.
- KONINGS, E.J.M. ROOMANS, H.H.S., DORANT, E., GOLDBOHN, R.A., SARIS, W.H.M., BRANDT, P.A. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, p.765-776, 2001.
- LEICHTER, J.; LANDYMORE, A.F.; KRUMDIECK, C.L. Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effect on the determination of free folate content. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.32, p. 92-95, 1979.
- MÜLLER H., Bestimmung der Folsäure – Gehalt von Gemüse und Obst mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 196, 137-141, 1993.
- PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. **Austr. J. Dairy Techn.**, vol.52, p.109-118, 1997.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p. 795-824, 2000.
- VAHTERISTO, L.T.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. *J. AOAC Intern.*, v.80, n.2, p. 373-378, 1997.
- YON, M.; HYUN, T.H. Folate content of foods commonly consumed in Korea measured after trienzyme extraction. **Nutr. Res.**, v.23, p.735-746, 2003.
- WAGNER, C. **Biochemical role of folate in cellular metabolism**. In *Folate in Health and Disease*, ed. L. Bailey. Marcel Dekker, N. York, 23-42, 1995.



CAPÍTULO 1

FOLATOS EM VEGETAIS: IMPORTÂNCIA, EFEITO PROCESSAMENTO E BIODISPONIBILIDADE

Trabalho aceito para publicação

Alimentos e Nutrição, Araraquara, 14(1): 123-129, 2003

FOLATOS EM VEGETAIS: IMPORTÂNCIA, EFEITO DO PROCESSAMENTO E BIODISPONIBILIDADE

Juliana Azevedo LIMA*
Rodrigo Ramos CATHARINO*
Helena Teixeira GODOY*

RESUMO: Este trabalho apresenta uma revisão sobre a importância dos folatos, uma vitamina do complexo B, naturalmente presente em alguns alimentos, assim como o efeito do processamento nos teores dessa vitamina e a influência na sua biodisponibilidade. Atualmente, sabe-se que os folatos, termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente mas também com atividade semelhante a do ácido fólico, estão envolvidos em inúmeras reações metabólicas e são extremamente importantes para a manutenção da saúde. A carência dessa vitamina vem sendo relacionada a uma série de doenças graves como a anemia megaloblástica, câncer, problemas cardíacos e malformações congênitas, entre outras. Os vegetais são apontados como as principais fontes de folatos na dieta humana. Porém, há muitos fatores que podem levar à deficiência dessa vitamina, incluindo fatores que influem na biodisponibilidade dos folatos, necessidade aumentada e principalmente a ingestão insuficiente, muitas vezes causada pelas perdas ocorridas durante o preparo do alimento e o processamento industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Folatos; vegetais; processamento; biodisponibilidade.

*Departamento de Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos-Unicamp-13083-970, Campinas-SP-Brasil.

Introdução

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B_c, vitamina B₉ e vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico, conhecidos como folatos ¹⁷. Folato é um termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico ^{3, 4, 5, 11, 25, 54}.

A descoberta dessa vitamina teve início em 1935, quando começaram a ser descritos distúrbios, decorrentes da deficiência nutricional de um composto pertencente à família do ácido pteroilglutâmico, cujo protótipo do grupo era o ácido fólico ²⁴.

Apesar do ácido pteroilglutâmico (PteGlu-1) (**Figura 1**) ser a estrutura química comum aos folatos, ele não é o principal congênere presente nos alimentos, nem a coenzima ativa no metabolismo intracelular. Os folatos encontrados nos alimentos estão, predominantemente, na forma de poliglutamatos, sendo o 5-metiltetraidrofolato o congênere majoritário. Cada uma das diferentes formas de folatos (**Figura 2**) que são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano, desempenha um papel específico no metabolismo intracelular, conforme apresentado na **Tabela 1** ^{11, 19, 24, 54}.

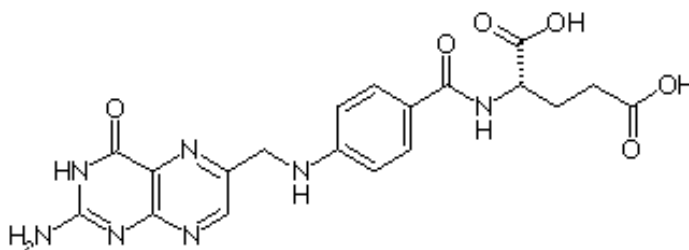


FIGURA 1- Estrutura química do ácido fólico

Tabela 1. Nomenclatura e funções bioquímicas das diversas formas de folatos.

Composto	Congênere	Radical	Posição	Função
Metiltetraidrofolato	CH ₃ H ₄ PteGlu	-CH ₃	N5	Convesão de homocisteína a

				metionina. Conversão de serina a glicina.
Ácido folínico	5-CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N5	Síntese de purinas.
10- Formiltetraidrofolato	10- CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N10	Síntese de purina. Utilização ou geração de formato.
5,10- Meteniltetraidrofolato	5,10- CHH ₄ PteGlu	-CH-	N5-10	Síntese de purina.
5,10- Metilenotetraidrofolato	5,10- CH ₂ H ₄ PteGlu	-CH ₂ -	N5-10	Síntese de timidilato
Formiminotetraidrofolato	CHNHH ₄ PteGlu	-CHNH	N5	Metabolismo da histidina.

Fonte: Goodman & Gilman²⁹

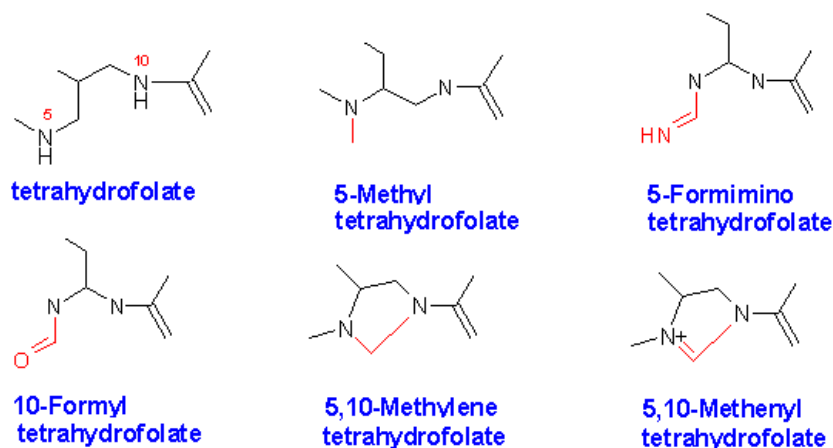


FIGURA 2: Parte da estrutura química de algumas das diferentes formas de folatos.

A ingestão insuficiente tem sido apontada como a principal causa da carência desse nutriente. Nos últimos anos têm aumentado as evidências da relação entre a deficiência de folatos e o risco de defeitos em tubo neural de fetos, durante a gestação, de doenças cardíacas, de certas formas de tumores e mal de Alzheimer, entre outras^{21, 47}. A fim de se prevenir essas doenças, as dietas recomendadas são baseadas em estudos referentes às quantidades de folatos presentes em alimentos²¹.

Malformações congênitas têm sido relacionadas com a carência de folatos no organismo de gestantes e surtido repercussão mundial. A preocupação com a carência de folatos na alimentação é tão grande, que nos Estados Unidos, em 1998, foi criada uma Campanha Nacional de incentivo à ingestão da vitamina, cujo principal objetivo é a redução das malformações congênitas ^{12, 14}.

Dentre as principais fontes de folatos encontram-se os vegetais, porém, os dados disponíveis sobre os teores presentes nesses alimentos são bastante conflitantes, principalmente devido a fatores edafoclimáticos, além de diferentes técnicas analíticas empregadas. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura apontam o 5-metiltetraidrofolato como sendo o folato majoritário presente em alimentos ^{12, 29}.

1- Importância dos folatos

Os folatos estão envolvidos como cofatores nas chamadas “reações de transferência de carbono”. Essas reações ocorrem em dois importantes ciclos em vegetais e mamíferos, o “ciclo de biossíntese de DNA” e o “ciclo de metilação” ^{47, 49}.

Vários derivados do tetraidrofolato são necessários na formação de produtos intermediários do metabolismo, estão envolvidos na síntese de purinas, timidilato (dTMP), síntese de colina, serina e glicina. Como quantidades adequadas de colina e outros aminoácidos podem geralmente ser obtidas da dieta, a participação de folatos na síntese de purina e dTMP parece ser, dessas reações, a metabolicamente mais significativa, por ser fundamental à síntese de DNA ^{13, 24}.

Nesse aspecto, a deficiência da vitamina está sendo apontada como a principal responsável pela incidência de malformações congênitas, pois, no período de gestação ocorre aumento do número de células em divisão rápida, havendo então, maior necessidade do consumo dessa vitamina. Além disso, esse problema ocorre no primeiro mês de gestação, período em que a maioria das mulheres não sabem da gravidez, e, portanto, não existe outra forma de prevenção a não ser através da ingestão de uma dieta mais rica em alimentos fontes de folatos ^{23, 41, 47}. As malformações congênitas, que podem ou não ter etiologia genética, acometem cerca de 3 a 4 por cento dos nascidos vivos. Calcula-se que

5/1000 crianças morrem no primeiro ano de vida por doenças de causa genética, as quais são mais graves e requerem investigação mais elaborada. À medida que diminui a mortalidade infantil por desnutrição ou doenças infecciosas em um país, as doenças genéticas passam a ter participação crescente na mortalidade desse grupo. No Brasil, esse problema é a segunda maior causa de morte de recém nascidos ⁴⁴.

Os folatos também participam na produção normal das hemácias e a carência de alimentos que contenham a vitamina na dieta, pode levar à anemia megaloblástica ^{16, 20, 21, 47}

Além disso, o tetraidrofolato juntamente com a vitamina B₁₂ é necessário para a conversão de homocisteína a metionina ¹³. Esta reação é de extrema importância para o sistema cardiovascular, dado que a hiperhomocisteinemia pode causar lesões nos vasos sanguíneos, podendo levar à arteriosclerose vascular e trombose ^{15, 36, 41}. Segundo Willcox et al. ⁵² altos níveis de homocisteína no sangue podem aumentar a agregação de plaquetas, causando trombose e inativando anticoagulantes. Atualmente a homocisteína tem sido apontada como o colesterol do século XXI ³¹. Também de acordo com Scott et al. ⁴⁷, os altos níveis de homocisteína aumentam o risco de doenças cardiovasculares e derrame cerebral.

Os folatos também estão envolvidos na produção da mielina, a principal proteína que participa da biossíntese de camadas de lipídeos que separam os nervos axônios. Assim, a carência de folatos também vem sendo associada a doenças degenerativas por diminuir a biossíntese de mielina ⁴⁷.

Dessa forma, os folatos têm despertado bastante interesse devido aos seus efeitos em relação à prevenção de doenças como problemas cardíacos, malformações congênitas, incluindo defeitos no tubo neural de fetos e anencefalia, câncer e mal de Alzheimer, entre outras ^{3, 7, 8, 10, 11, 14, 24, 39, 40, 43, 50}.

Os folatos, a exemplo de todas as outras vitaminas, são necessários em pequenas quantidades, porém, parte da população apresenta deficiência desse nutriente. Há muitas causas que levam a esse quadro em seres humanos, incluindo ingestão inadequada, absorção e metabolismo deficientes e demanda aumentada, principalmente nos períodos de gestação, lactação e crescimento. A principal causa tem sido apontada como sendo a ingestão insuficiente ⁴¹, portanto, para tentar amenizar esse quadro, é recomendável a ingestão de alimentos ricos nessa vitamina.

2- Folatos em vegetais

Mundialmente, o consumo per capita de hortaliças ocupa o terceiro lugar, seguidos de cereais e outras fontes não vegetais de alimentos ⁴⁶. No Brasil, o consumo per capita anual é de 34,419 kg ²².

Os vegetais têm sido identificados como a maior fonte de folatos na dieta humana e têm sido inclusive empregados em recomendações nutricionais para aumentar os níveis de folatos em pessoas deficientes nessa vitamina ²³. Também, de acordo com Brody ³ e Franco ¹⁷ entre muitos outros autores, vegetais e leveduras seguidos por carnes, fígados, rins, frutas e cereais são considerados as principais fontes dessa vitamina. Porém, os dados apresentados nas tabelas de composição de alimentos e publicações científicas são muitas vezes bastante diferentes para um mesmo alimento. Essas diferenças são devidas, provavelmente, às diversas técnicas analíticas empregadas, nem sempre são confiáveis, além de fatores edafoclimáticos relacionados ao cultivo de vegetais.

Nas células e, portanto, nos alimentos as formas de folatos estão ligadas a uma cadeia de glutamatos (3-11), que depende da fonte. Essa cadeia de poliglutamatos retém os folatos no interior das células e aumentam sua afinidade e cinética quando atuam enzimas folato dependentes ⁴⁷. Apesar dos vegetais conterem principalmente folatos poliglutamatos, a estocagem desses alimentos pode levar à hidrólise dessas formas por conjugases endógenas, naturalmente presentes ⁵¹. Em se tratando de vegetais, aproximadamente 80 e 64% dos folatos presentes em espinafre e brócolis, respectivamente, estão na forma monoglutâmica ²³. Já de acordo com Konnings et al. ³⁰ 33%, 92% e 74% dos folatos presentes em espinafre, brócolis e tomate, respectivamente, estão na forma de poliglutamatos. Na **Tabela 2** está apresentado o teor de folatos e a porcentagem poliglutamatos em alguns alimentos.

Tabela 2: Porcentagem de folatos poliglutamatos em alimentos

Alimento	Teor de folato ($\mu\text{g/g}$)	Poliglutamato (%)
Brócolis (fresco/cozido)	$0,65 \pm 0,24$	92
Espinafre (cru)	1,00	33
Espinafre (fresco/cozido)	$0,83 \pm 0,06$	90
Tomate (cru)	$0,08 \pm 0,03$	74
Suco de tomate	$0,18 \pm 0,01$	70
Molho de tomate	$0,15 \pm 0,02$	68
Purê de tomate	$0,33 \pm 0$	63

Fonte: Konings et al.,³⁰.

A distribuição das diferentes formas de folatos nos tecidos vegetais depende da espécie, mas, também dos métodos de colheita e pós-colheita. Essas formas de folatos diferem na suscetibilidade de perda durante estocagem, processamento e cozimento, como também na biodisponibilidade^{20, 21, 47}.

Os teores de folatos em vegetais são afetados, principalmente, pela incidência de luz durante o cultivo^{47, 51}. Os folatos participam ativamente da fotorespiração, onde são produzidas altas quantidades de glicina, oxidada na mitocôndria para a fotossíntese, sendo todo esse processo induzido pela luz. Minerais como Mg^{2+} e K^+ também são bastante importantes na produção de folatos pelos vegetais, participando de uma das etapas de biossíntese dessa vitamina. As quantidades encontradas nos vegetais também estão intimamente relacionadas ao grau de maturação e como os folatos participam do processo de divisão celular, sua quantidade é maior nos tecidos em divisão do que nos tecidos já maduros, onde não há ocorrência desse processo⁴⁷.

Dentre os alimentos ricos em folatos, as hortaliças como espinafre, brócolis e tomate, entre outras, ocupam lugar de destaque. Porém, os teores dessa vitamina encontrados, para a mesma hortaliça, em diferentes trabalhos variam bastante, o que gera pouca confiabilidade dos dados além dos problemas relacionados à própria ingestão da vitamina. Estudos realizados por diversos autores indicando as quantidades de folatos totais determinados em espinafre, brócolis e tomate estão mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Diferenças nos teores de folatos, apresentados em diferentes trabalhos, para brócolis, espinafre e tomate.

Alimento	Folatos totais (µg/100g)/	Referências
Brócolis	174 ± 14	Iwatani et al. ²³
	65 ± 2	Konings et al. ³⁰
	114	Vahteristo et al. ⁵¹
	102	De Souza e Eitenmiller ¹⁴
	133	Mullin et al. ³²
	189	Leichter et al. ³²
	169	Leichter et al. ³³
Espinafre	302 ± 17	Iwatani et al. ²³
	261 ± 92	Yon et al. ⁵³
	95,5	Freisleben et al. ¹⁸
	193	Shrestha et al. ⁴⁸
	364	Lin e Lin ³⁴
	200	Lin e Lin ³⁴
	224	Aiso e Tamura ¹
	1540	Clifford et al. ⁹
	150	McCance e Windson's ³⁵
	251	De Souza e Etenmemiler ¹⁴
	300	Kirsch e Chen ²⁷
	284	Chen et al. ⁶
	198	Mullin ³⁸
Tomate	8 ± 3	Konings et al. ³⁰
	40	Marletta et al. ³⁷ – Itália
	17	Marletta et al. ³⁷ – Inglaterra
	26	Marletta et al. ³⁷ – Dinamarca
	39	Marletta et al. ³⁷ – Alemanha
	15	Marletta et al. ³⁷ – Estados Unidos
	12	Vahteristo et al. ⁵¹
	6	Brody ³

Em se tratando de hortaliças a qualidade e a composição extremamente tendem a ser dependentes das condições edafoclimáticas. Dessa forma, os teores da vitamina dependem de fatores como clima, irrigação, adubação, incidência de luz e ventos entre outros, o que juntamente com a utilização de distintos métodos para as determinação, poderiam explicar essas diferenças.

3- Efeitos de cozimento e processamento nos teores de folatos em vegetais

O estudo da estabilidade de folatos em alimentos é dificultado pela existência de várias formas dessa vitamina, variações na sua suscetibilidade à degradação e influência de fatores ambientais como pH, concentração de oxigênio e presença de metais, entre outros ^{20, 21}.

Nesse aspecto, os valores apresentados na literatura ainda são relativamente conflitantes. Franco ¹⁷ mostrou a ocorrência de 50% de perdas da vitamina após o cozimento de alimentos, enquanto Katzung ²⁴ relatou perdas de até 90%. Gregory et al. ²⁰ relataram que altas perdas de folatos foram observadas após pequena exposição de alimentos ao calor, porém, em outros experimentos, não descritos com detalhes, pequenas perdas foram observadas. O mesmo autor afirmou que essas diferenças devem ser, portanto, explicadas pela quantidade de água e vitamina C presentes durante o cozimento, além de diferentes exposições ao oxigênio.

Os folatos, como as outras vitaminas hidrossolúveis e minerais, estão sujeitos a lixiviação pela água de cozimento, além da própria degradação química. Altas perdas de folatos têm sido relatadas em vegetais cozidos, sendo maior a porcentagem devida ao processo de lixiviação ^{20, 21}. A quantia retida em vegetais cozidos, somada à quantidade de vitamina na água é equivalente ao teor no vegetal cru ⁴⁷. Leichter et al. ³³ afirmaram que as perdas devidas a esse processo variaram de 22 a 84% para vegetais cozidos por 10 minutos. Esses dados indicam que a extração da vitamina pela água é a maior responsável pela perda de folatos durante o cozimento. Klein et al ²⁸ determinaram que o cozimento de espinafre em água acarretaria 77% de perda da vitamina, já Chen e Cooper ⁶ encontraram o valor de 33% de perda após cozimento a 100°C por 3 minutos para o mesmo alimento. Para brócolis

De Souza e Ettenmiller ¹⁴, citados por Hawkes e Villota ²¹ apontaram 60% de perda de folatos após cozimento em água.

Em se tratando de processamento industrial sabe-se que o tratamento adotado deve atender às melhores condições microbiológicas, minimizando a destruição de nutrientes e mudanças sensoriais. No caso especial da fabricação de alimentos enlatados, processos de lavagem e branqueamento estão envolvidos e os teores de folatos são menores quando comparados ao alimento cru, devido, principalmente, aos processos de lixiviação ⁴⁷. No processo de fabricação de sucos, Hawkes e Villota ²¹ apresentaram trabalhos que relatam perda de 70% para suco de tomate, conflitando com a afirmação de que para tomates processados a estabilidade dos folatos deveria ser mais alta devido à presença de vitamina C.

4- Biodisponibilidade de folatos

Os folatos estão naturalmente presentes em vegetais escuros, legumes e algumas frutas, principalmente, na forma de poliglutamatos. Porém, muitos alimentos são atualmente enriquecidos ou fortificados com ácido fólico (forma monoglutâmica). Portanto, é necessário distinguir entre o valor nutricional do ácido fólico e sua forma poliglutâmica ⁴⁷.

A avaliação da biodisponibilidade de folatos em alimentos inclui estudos que vão desde a absorção intestinal, função metabólica das coenzimas folato-dependentes até o processo de excreção. Então, qualquer fator que influencie a absorção intestinal ou que afete o metabolismo e excreção dessa vitamina deve ser considerado ²⁰.

O valor nutricional atribuído às formas mono ou poligutâmicas varia, porque existe diferenças de biodisponibilidade entre elas ⁹. Muitos estudos comparando a biodisponibilidade de folatos apontam dados distintos ²⁰. Rosenberg e Godwin ⁴⁵ indicaram 85 a 90% de biodisponibilidade para folatos poliglutamatos em relação ao ácido fólico. Já Keagy et al. ²⁶ apontaram o valor de 63% e Perry e Chanari ⁴² já haviam relatado que apenas 25% dos folatos poliglutamatos estão biodisponíveis em comparação com o ácido fólico. De acordo com Iwatani et al. ²³, os folatos monoglutamatos são melhor absorvidos que os folatos conjugados. Konnings et al. ³⁰, afirmaram que a biodisponibilidade de folatos

monoglutamatos varia de 70 a 120% em relação ao ácido fólico sintético e que em geral, a biodisponibilidade de folatos presentes em alimentos é de 50%. A biodisponibilidade da forma sintética adicionada está em torno de 85 a 100%, enquanto a forma natural está em torno de 50% ⁴⁹. Outros estudos indicaram pequena ou nenhuma diferença na biodisponibilidade de ácido fólico e folatos poliglutamatos ^{2, 26}. Ensaio com seres humanos indicaram que diferentes alimentos apresentam diferentes biodisponibilidades em relação aos folatos presentes, conforme apresentado na **Tabela 4** ²⁰.

Esses estudos indicam que ainda não existe um consenso entre os pesquisadores à respeito da biodisponibilidade de folatos e ácido fólico, mas, de qualquer forma, é importante garantir que os níveis dessa vitamina sejam adequados, para a manutenção da saúde e a prevenção de doenças.

Tabela 4: Diferenças na biodisponibilidade de folatos em alimentos.

Alimento	Quantidade consumida (g)	Biodisponibilidade média (%)
Tomate	1000	37
Espinafre	200	63
Couve cozida	500-700	47
Couve cru	500	47

Fonte: Gregory ²⁰

ABSTRACT: This work presents a revision of the importance of folates, a water-soluble vitamin, naturally occurring in some foods, as well as the effects of processing on the level of this vitamin and the influence on its bioavailability. It is now known that the folates, a general term that refers to compounds not only structurally similar but also with similar activity to folic acid, are involved in innumerable metabolic reactions and are extremely important for the maintenance of health. The lack of this vitamin is being related to a series of serious illnesses such as the megaloblastic anaemia, cardiac problems, cancer and congenital malformations, amongst others. Vegetables have been identified as the main source of folates in the diet. However, there are many factors that can lead to a deficiency of this vitamin, including factors that influence the bioavailability of the folates, increased

requirements and insufficient ingestion, frequently caused by losses occurred during the preparation of the food and industrial processing.

KEYWORDS: Folate; vegetables; processing; bioavailability.

Referências bibliográficas

- 1 AISO, K.; TAMURA, T. Trienzayme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation for α -amilase and protease treatments. **J. Nutr. Sci. Vitam.**, v.44, p. 361-370, 1998.
- 2 ANAD A.R.; GREGORY, J.F. Determination of folate bioavalability with a rat bioassay. **J. Nutr.**, v.117, p. 866-873, 1987.
- 3 BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins**. 2ed. rev. New York: Marcel Decker, 1991, p.453-490.
- 4 BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. Hawaii: Academic Press, 1994, 658p.
- 5 BRUBACKER,G.;MULLER-MULLOT, W.; SOUTHGATE,D. A. T. Methods for the determination of vitamins in food, recommended by COST 91. New York: Elsevier Applied Science Publ., 1985, 166p.
- 6 CHEN, T.S.; COOPER, R.G. Thermal destruction of folacin: effect of ascorbic acid, oxygen and temperature. **J. Food Sci.**, v.44, n.3, p. 713-419, 1979.
- 7 CHEN, T.S.; SONG, Y.O.; KIRSH, A.J., Effects of blanching, freezing and storage on folacin content of spinach. **Nutr. Rep. Intern.**, v.28, p. 17-324, 1983.
- 8 CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. Folate, vitamin B12 and serum homocysteine levels in cofirmed Alzheimer's disease. **Arch. Neurology**, v.111, p. 449-1453, 1998.
- 9 CLIFFORD, A.J. et al. Bioavailability of Food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. **Vitamins**, v. 22, p.445-453, 1991.
- 10 CRANE, N.T. et al. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **Am. J. Public Health**, v.85, n.5, p.660-666, 1995.

- 11 CZEIZE, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional vitamin supplementation. **N. Engl. J. Medicine**, v. 327, n.226, p. 1832-1835, 1992.
- 12 DALY S. et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**, v.350, n.9092, p. 1666-1669, 1997.
- 13 DANG, J.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chem.**, v.68, n.3, p. 295-298, 2000.
- 14 DESOUZA, S.C.; EITENMILLER, R.R. Effects of processing and storage on the folate content of spinach and broccoli. **J. Food Sci.**, v.51, p.526-628, 1986.
- 15 DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998, 1007p.
- 16 DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **Intern. J. Vitamin Nutrient Res.**, v.68, p.98-103, 1998.
- 17 FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992, 307p.
- 18 FREISLEBEN, A.; SCHIEBERLE, P.; RYCHLIK, M. Compararison of folate quantification in foods by HPLC-fluorescence detection to that by satable isotope diluition assays using HPLC-tandem mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, v.31, p. 247-255, 2003.
- 19 GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1987, 1985p.
- 20 GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Adv. Food Nutr. Research**, v.3, p.1-101, 1989.
- 21 HAWKES, J.G.; VILLOTA, T.H. Folates in foods: Reactivity, Stability during processing and nutritional implications. **Critical Rev. Food Sci. Nutr.**, v.28, n.6, p.439-539, 1989.
- 22 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Alimentares. Consumo alimentar domiciliar “per capita” anual (em Kg). Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 16/08/2003.
- 23 IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A.K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. **J. Food Comp. Anal.**, v.16, p. 37-48, 2003.

- 24 KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.
- 25 KEAGY, P.M. Folacin In: **Methods of vitamin assay**. 4ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985, p. 445-471.
- 26 KEAGY, P.M.; SHANE, B.; OACE, S.M. Folate bioavailability in humans. Effects of wheat bran and beans. **Am. J. of Clin. Nutr.**, v.47, p.80-88, 1988.
- 27 KIRSCH, A.J.; CHEN, T.S. Comparison of conjugase treatment procedures in the microbiological assay of food folacin. **J. Food Sci.**, v.49, p.94-98, 1984.
- 28 KLEIN, B.P. et al. Folacin content in microwave and conventionally cooked spinach. **J. Food Sci.**, v.46, n.2, p.286-292, 1979.
- 29 KONINGS, E.J.M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **J. AOAC Intern.**, v.82, n.1, p.119-127, 1999.
- 30 KONINGS, E.J.M et al. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, n.765-776, 2001.
- 31 LARA, G.M. et al. Assessoria Científica-Centerlab. Disponível em: www.newslab.com.br/homocisteína.htm. Acesso em: 22/09/2003.
- 32 LEICHTER, J.; SWITZER, V.P.; LANDYMORE, A.F. Effect of cooking on folate content of vegetables. **Nutr. Rep. Int.**, v.18, n.4, p. 475-482, 1978.
- 33 LEICHTER, J.; LANDYMORE, A.F.; KRUMDIECK, C.L. Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effect on the determination of free folate content. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.32, p. 92-95, 1979.
- 34 LIN, B.F.; LIN, R.F. Effect of chinese stir-fry cooking on folate content of vegetables. **J. Chinese Agric.Chem. Soc.**, v.37, p. 443-454, 1999.
- 35 McCANE, R.A.; WIDDOWSON, E.M. **The Composition of foods**. 5th Edn. Cambridge: The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture , Fisheries and Food, 1991, 462p.
- 36 MALINOW, M.R. et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **N. Engl. J. Med.**, v.338, n.15, p.1009-1015, 1998.
- 37 MARLETTA, L. et al. Food Composition Databases in Italy: Problems and Perspectives. **J. Food Comp. Anal.**, v.13, p. 611-618, 2000.
- 38 MULLIN, W.J.; WOOD, D.F.; HOWSAM, S.G. Some factors affecting content of spinach, swiss chard, broccoli and brussels sprouts. **Nutr. Rep. Int.**, v.26, n.1, p.7-11, 1982.
- 39 NIGARD, O. et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.**, v.337, p. 230-236, 1997.
- 40 OAKLEY, G.P Jr.; ERICKSON, J.D.; ADAMS, M.J. Urgent need to increase folic acid consumption. **J. Am. Med. Assoc.**, v.274, n.21, p. 1717-1718, 1995.

- 41 PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. **Austr. J. Dairy Techn.**, vol.52, p.109-118, 1997.
- 42 PERRY, J.; CHANARI, I. Intestinal absorption of reduced folate compounds in man. *Brit. J. Hematol.*, v.18, p. 329-339, 1970.
- 43 RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 692p.
44. Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação. Diagnóstico clínico-laboratorial das doenças genéticas. Disponível: www.sarah.br. Acesso em 20/08/2003.
- 45 ROSENBERG, I.H.; GODWIN, H.A. The digestion and absorption of dietary folate. **Gastroenterology**, v.60, p. 445-463, 1971.
- 46 RUBATZKY, V.P.; YAMAGUCHI, M. **World vegetables: principles, production and nutritive values**. 2.ed. New York: Chapman & Hall, International Thomson Publishing, 1997, 843 p.
- 47 SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p. 795-824, 2000.
- 48 SHRESTHA, A.K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by trionzyme and trienzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chem.**, v.71, p. 545-552, 2000.
- 49 TRUMBO, P.R.. Dietary Reference Intakes: Revised nutritional equivalents for folate, vitamin e and provitamin a carotenoids. **J. Food Comp. Anal.**, v.16, p. 379-382, 2003.
- 50 TSAI, M.Y. et al. Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.143, p.163-169, 1999.
- 51 VAHTERISTO, L.T.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. **J. AOAC Intern.**, v.80, n.2, p. 373-378, 1997.
- 52 WILLCOX, J.K.; CATIGNANI, G. L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.43, p. 1-18, 2003.
- 53 YON, M.; HYUN, T.H. Folate content of foods commonly consumed in Korea measured after trienzyme extraction. **Nutr. Res.**, v.23, p.735-746, 2003.
- 54 ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1994, 739p.



CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM TOMATE E PRODUTOS PROCESSADOS

Trabalho a ser submetido ao *Food Science and Biotechnology*.

VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM TOMATE E PRODUTOS PROCESSADOS

Juliana A. Lima & Helena T. Godoy

RESUMO

Folatos, é a denominação de um grupo de substâncias que apresenta atividade biológica semelhante à do ácido fólico, uma vitamina hidrossolúvel, naturalmente presente em alguns alimentos. Esses compostos estão envolvidos em inúmeras reações metabólicas e são extremamente importantes para a manutenção da saúde. A carência dessa vitamina vem sendo relacionada a uma série de doenças graves como anemia megaloblástica, câncer, problemas cardíacos e malformações congênitas, entre outras. As principais fontes de folatos são os vegetais e as leveduras, porém, os dados sobre os teores de folatos apresentados nas tabelas de composição de alimentos e nas publicações científicas na área, apresentam grandes diferenças de conteúdo para o mesmo tipo de alimento. O objetivo desse trabalho foi a validação de uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de folatos naturalmente presentes em tomates, verificando também a influência do tipo de cultivo (tradicional e orgânico) e a avaliação dos teores dessa mesma vitamina em produtos processados a base de tomate, como catchup, molho e suco de tomate. Os folatos foram extraídos com tampão fosfato, seguida por uma etapa de limpeza, filtração e injeção no cromatógrafo a líquido. No processo cromatográfico utilizou-se coluna C₁₈ e sistema de eluição por gradiente, sendo a fase móvel composta por solução de ácido acético e acetonitrila. A detecção foi feita por fluorescência e na região do ultravioleta, de acordo com os comprimentos de onda adequados a cada forma da vitamina analisada. A quantificação foi realizada por padronização externa. O método se mostrou eficiente apresentando boa repetibilidade, taxas de recuperação entre 90 e 95% e limites de detecção de 5, 30, 30, 7pg/mL e 5ng/mL para 5-metilTHF, 5-formilTHF, 10-formilTHF, THF e 10-metilTHF, respectivamente. Foram avaliados tomate tipo salada, 5 diferentes marcas de catchup e molhos de tomate e 2 marcas de sucos de tomate, todos em 5 lotes. O folato majoritário encontrado foi o 5-metilTHF, em todos os produtos estudados. Os teores determinados para tomates cultivados em sistema tradicional variaram de 176,0 a 326,9 µg/100g e por cultivo orgânico entre 208,7 a 345,1µg/100g. O catchup foi o produto que apresentou a maior variação (58,8 a 265,9µg/100g) entre todos os avaliados. O molho e o suco de tomate apresentaram variação entre 103,9 a 325,0µg/100g e 138,9 a 330,8µg/100g, respectivamente. Esses valores indicaram que todos os produtos analisados podem ser considerados importantes fontes de folatos.

ABSTRACT

Folates, a group of substances with biological activity similar to that of folic acid, a water-soluble vitamin, present in some foods. These compounds are involved in numerous metabolic reactions and are extremely important for the maintenance of health. The deficiency of this vitamin has been related to a series of serious diseases such as megaloblastic anemia, cardiac problems, cancer, and congenital malformations, amongst others. The main sources of folates are vegetables and the yeasts. However, the data on folate contents in food composition tables and in scientific publications in the area, show considerable variation for the same type of food. The objective of this work was validate a methodology by high performance liquid chromatography for the determination of folates in tomatoes, also verifying the influence of the type of cultivation (traditional and organic), as well as the evaluation of this same vitamin in processed tomato based products, such as ketchup, sauce and tomato juice. The folates were extracted with phosphate buffer, followed by a clean-up step, filtration and injection into the chromatograph. In the chromatographic process a C₁₈ column was used and gradient elution, the mobile phase being composed of on acetic acid solution and acetonitrile. Detection was by fluorescence and absorbance in the ultraviolet region, in accordance with the adequate wavelengths for each form of the vitamin analyzed. Quantification was done by external standardization. The method was shown to be efficient, presenting good repeatability, recovery rates between 90 and 95% and with detection limits of 5, 30, 30, 7pg/mL and 5ng/mL for 5-methylTHF, 5-formylTHF, 10-formylTHF, THF e 10-methylTHF, respectively. Salad type tomatoes, 5 different brands of ketchup and sauce and 2 brands of tomato juice, 5 batches of each, were evaluated. The main folate present was 5-methylTHF in all the foods examined. The tomatoes cultivated in the traditional form showed contents varying between 176.0 and 326.9ug/100g, where as the for organic cultured tomatoes showed between 208.7 and 345.1ug/100g. Ketchup was the product presenting the biggest variation (58.8 to 265.9ug/100g). The sauce and the tomato juice presented a variation between 103.9 and 325.0ug/100g and 138.9 to 330.8ug/100g, respectively. These values indicated that all the products analyzed could be considered as important sources of folates.

1- INTRODUÇÃO

Os folatos fazem parte do grupo das vitaminas do complexo B e são necessários para as reações de transferência de carbono, que ocorrem na biossíntese de DNA e no

ciclo da metilação (Scott et al., 2000).

Vários derivados do tetraidrofolato são necessários na formação de produtos intermediários do metabolismo e estão envolvidos na síntese de purinas e timidilato (dTMP) sendo, portanto, fundamentais à síntese de DNA (Katzung, 1994, Devlin, 1997). Dessa forma, a deficiência da vitamina, está sendo apontada como a principal responsável pela incidência de malformações congênitas, que ocorrem no período em que as células estão em divisão rápida para a formação do feto (Parodi, 1997; Scott et al., 2000; Iwatani et al., 2003). Os folatos também participam da produção normal das hemácias e a carência dessa vitamina na dieta, pode levar à anemia megaloblástica (Hawkes e Villota, 1989; Gregoy, 1989, Scott et al., 2000).

O tetraidrofolato juntamente com a vitamina B₁₂ também é necessário para a conversão de homocisteína a metionina (Devlin, 1997). Segundo Willcox et al. (2003), o alto nível de homocisteína no sangue pode aumentar a agregação de plaquetas, causando trombose e inativando anticoagulantes. Brown e Hu (2001) afirmaram que fatores relacionados à dieta, incluindo a deficiência de vitaminas como os folatos, têm importante papel no mecanismo que provoca as doenças cardiovasculares.

A carência de folatos também vem sendo associada a doenças neurológicas por prejudicar a biossíntese de mielina, proteína que participa da biossíntese de camadas de lipídeos que separam os nervos axônios (Scott et al., 2000).

Os folatos são necessários em pequenas quantidades, porém, parte da população apresenta deficiência desse nutriente. Para tentar amenizar esse quadro, é recomendável o aumento da ingestão de alimentos ricos nessa vitamina (Iwatani et al., 2003).

Dentre os alimentos ricos em folatos, os vegetais, como o tomate, dentre outros, têm lugar de destaque. Porém, os teores da vitamina encontrados, em diferentes trabalhos, para a mesma hortaliça, variam bastante, o que gera uma grande limitação na confiabilidade dos dados disponíveis, além dos problemas relacionados a própria ingestão da vitamina. No caso de folatos em tomates Brody (1991) apontou o valor de 6µg/100g, enquanto Vahteristo et al. (1997) determinaram 12µg/100g e Konings et al. (2001)

8µg/100g. Já Marletta et al. (2000) analisando tomates cultivados em diferentes países determinaram 40, 17, 26, 39 e 15µg/100g para os níveis de folatos em tomates da Itália, Inglaterra, Dinamarca, Alemanha e Estados Unidos, respectivamente.

Em se tratando do cultivo de vegetais a qualidade e a composição são extremamente dependentes das condições edafoclimáticas. Dessa forma, os teores dessa vitamina são bastante dependentes de fatores como clima, irrigação, solo, adubação (presença de K⁺ e Mg²⁺) e incidência de luz, entre outros (Vahteristo et al., 1997, Scott et al., 2000), o que, juntamente com a utilização de diferentes métodos de determinação, podem ser responsáveis pelas diferenças observadas nos teores de folatos presentes em um mesmo alimento cultivado em condições diferentes.

De acordo com Willcox et al. (2003), com uma produção em torno de 1,2 milhões de toneladas/ano, o Brasil é o terceiro maior produtor de tomates, ficando atrás apenas dos EUA e México. De acordo com dados do IBGE, em 2003 a produção brasileira foi cerca de 3,6 milhões de toneladas, sendo o consumo dessa hortaliça de 5,6Kg/pessoa/ano (IBGE, 2004).

Mundialmente, a agricultura orgânica está crescendo bem como o consumo de alimentos obtidos através desse tipo de cultivo (Saba e Messina, 2003) porém, dados sobre os teores de folatos em tomates orgânicos não foram encontrados na literatura.

A avaliação do teor dessa vitamina, presente em catchup, molhos e sucos de tomate é bastante importante, quando se considera o expressivo consumo desses produtos. De acordo com o *Bureau of Censos* (91/92) os níveis de consumo de produtos derivados de tomate estão crescendo cada vez mais, em média 6,6% ao ano. Para o molho de tomate em especial, o crescimento do consumo interno foi de 37% nos últimos anos (Seagri, 2004) e segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística o consumo é de 400g/pessoa/ano (IBGE, 2004).

Em se tratando de processamento industrial de alimentos enlatados, como molhos, que envolvem processos de lavagem e branqueamento os teores de folatos são diferentes quando comparados ao alimento cru, devido, principalmente, ao processo de lixiviação (Scott et al., 2000). Konnings et al. (2001), relataram valores de 8µg/100g, 15µg/100g e 18µg/100g como os teores de folatos totais presentes em tomate cru, molho e suco de tomate, respectivamente e o 5-metiltetraidrofolato foi a forma majoritária determinada nesses produtos, apresentando, nessa ordem, 6µg/100g, 13µg/100g e 14µg/100g. Para o catchup, nenhum dado foi encontrado na literatura.

Assim, a quantificação de folatos presentes em tomates cultivados de forma tradicional e orgânica, além da determinação dos teores da vitamina em produtos processados de tomate, se revela de extrema importância para o cálculo do consumo de folatos, além de contribuir, também, com estudos na área médica, que relacionam a ingestão de determinados alimentos e os benefícios à saúde.

2- MATERIAL E MÉTODO

2.1 – Produtos avaliados

Para as determinações de folatos foram avaliados cinco diferentes lotes de tomate (*Lycopersicum esculentum*, tipo salada, variedade maçã), sendo cada lote composto por 1Kg, escolhidos de forma arbitrária, com a preocupação da coleta de tomates com diferentes graus de maturação, escolhidos visualmente, cultivados de forma tradicional e por agricultura orgânica. Os lotes foram adquiridos no mercado da cidade de Campinas, diferenciados pela data de colheita.

Para catchup e molho de tomate foram analisadas 5 diferentes marcas, já para suco de tomate foram avaliadas 2 marcas, todos encontrados no mercado da cidade de Campinas, Brasil, em 5 diferentes lotes, diferenciados pela data de fabricação. Entre as marcas, as datas de fabricação foram próximas. As determinações foram feitas em duplicata.

2.2- Determinação dos folatos

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação do tetraidrofolato (THF), 5-metiltetraidrofolato (5-metilTHF), 10-metil- ácido-fólico (10-metilAF), 5-formiltetraidrofolato (5-formilTHF) e 10-formil-ácido-fólico (10-formilAF), nos alimentos analisados.

A metodologia, a ser validada para tomates e seus produtos foi desenvolvida por Catharino et al. (2002) objetivando a determinação simultânea das várias formas de folatos. Para a extração da vitamina foram tomados 10,0g de tomate, molho e catchup e 10,0mL de suco de tomate, adicionou-se 50,0mL de tampão fosfato, composto por

Na_2HPO_4 (0,25mol/L)/ KH_2PO_4 (0,37mol/L) e homogeneizou-se em Turatec. Uma alíquota de 9,0mL foi transferida para um balão volumétrico de 10mL onde adicionou-se 500 μL de ácido tricloroacético concentrado, para a etapa de limpeza da amostra, completando-se o volume final com tampão fosfato. Para o catchup, a etapa de extração teve que ser modificada para a precipitação da goma xantana, utilizada como estabilizante nesse produto, que impedia a filtração do extrato. Para tanto, utilizou-se 25mL de tampão fosfato e 25mL de etanol 70%, seguindo-se posteriormente, o mesmo procedimento empregado para os demais produtos. Após homogeneização a solução passou por duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana durapore (HAWP 01300 Millipore) e a seguir foi efetuada a injeção de 100 μL do extrato no cromatógrafo a líquido.

Os folatos foram eluídos através de um sistema por gradiente, com vazão de 0,5mL/min, sendo a fase móvel composta por solução de ácido acético (2%, a pH 2,8) no início da corrida, chegando a 24% de solução de ácido acético e 76% de acetonitrila em 26 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 15 minutos antes da próxima injeção. As formas de folatos foram detectadas em detector de fluorescência e UV/visível com arranjo de diodos, sendo $\lambda_{\text{excitação}}$ 290nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 360nm para THF, 5-MetilTHF e 5-FormilTHF e o $\lambda_{\text{excitação}}$ 290nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 445nm para 10-FormilAF. Já para 10-MetilAF a detecção foi feita a 290nm.

A identificação foi feita por comparação entre os tempos de retenção obtidos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e através dos espectros de fluorescência e UV-visível. O grau de pureza das formas de folatos foi avaliado pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação foi realizada por padronização externa, através das curvas analíticas construídas com 5, 6 ou 7 níveis de concentração. As concentrações foram 30, 80, 160, 240, 330, 650, 1000 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para 5-metilTHF. 5, 15, 30, 45, 60, foram os valores para 5-formilTHF e 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, 7, 28, 56, 84, 112 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ e 20, 60, 120, 180, 270, 300 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, foram as concentrações utilizadas para 10-metilTHF, 10-formilTHF e THF, respectivamente, sendo cada ponto, representado pela média de três determinações.

2.2.1- Reagentes

Os padrões de tetraidrofolato, 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio, 10-metil-ácido-fólico, 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio, 10- formil-ácido-fólico foram adquiridos do Laboratório Dr. Schircks (Jona, Suíça). A acetonitrila grau cromatográfico, o ácido acético e o hidróxido de potássio, grau analítico foram adquiridos da Merck, Brasil. O ácido tricloroacético, Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 grau analítico, foram adquiridos da Synth, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e HVLP 04700 Millipore), com poros de $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro.

2.2.2 – Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático com capacidade de 1 a $100\mu\text{L}$, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível e de fluorescência, dispostos em sequência. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu análise da pureza do pico de interesse e o melhor tratamento dos dados. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, $5\mu\text{m}$, $250\times 4,6\text{mm}$ d.i. (Raimin Instrument Company) foi utilizada para o processo cromatográfico, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C_{18} , $5\mu\text{m}$, $10\times 4,6\text{mm}$ d.i (Varian).

2.3- Validação da metodologia

Testes de recuperação e repetibilidade foram realizados com as amostras analisadas neste trabalho, já que a metodologia utilizada foi desenvolvida para outras matrizes alimentícias. Limites de detecção e quantificação também foram determinados para essas novas matrizes, assim como as faixas de linearidade.

2.3.1- Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se testes de recuperação de padrões adicionados aos produtos, em dois níveis diferentes de concentração conforme apresentado na Tabela 1. Os teores foram escolhidos arbitrariamente, já que os alimentos

analisados já continham quantidades dos folatos. Para as análises foram utilizados 50,0g de cada alimento.

Para o cálculo da recuperação, utilizou-se a seguinte equação, indicada por Rodriguez et al (1995):

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração amostra})}{\text{Concentração adicionada}}$$

2.3.2- Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de dez determinações realizadas para cada produto. A repetibilidade foi calculada de acordo com Calcutt e Boddy (1983) através da equação:

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

r = repetibilidade

sr = estimativa do desvio padrão

t = t de Student

2.3.3- Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção foi estimado por diluições sucessivas dos padrões de concentrações conhecidas das diferentes formas da vitamina, até a determinação da menor quantidade detectável para cada uma delas como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (Calcutt e Boddy, 1983).

2.4. Análise Estatística

Com a finalidade de se definir a existência ou não de diferença significativa entre os valores obtidos para o teor de 5-metilTHF encontrados em tomate cultivado de forma orgânica e tradicional e, para as duas diferentes marcas de suco de tomate, utilizou-se teste t. Com essa mesma finalidade, foi realizada a análise de variância para os valores obtidos para molho de tomate e catchup. Para todos os casos usou-se o programa GraphPad Prism (versão 2.01).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Validação da metodologia

As taxas de recuperação obtidas para tomate, catchup, molho e suco de tomate estão apresentadas na Tabela 1. Os valores variaram entre 90 e 95% nos dois níveis de enriquecimento indicando uma boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos avaliados.

Para os ensaios de repetibilidade foram realizadas 10 determinações utilizando-se matrizes reais (não enriquecidas com padrões), portanto, como apenas o 5-metilTHF foi encontrado nessas amostras, os dados foram obtidos apenas para essa forma da vitamina, conforme apresentado na Tabela 2. Esperava-se que as diferenças entre os valores fornecidos pelas determinações em duplicata estivessem dentro dos limites fornecidos pela equação da repetibilidade, valor de “r”, com a confiança indicada. Observou-se, então, que a maior diferença entre os valores obtidos nas 10 determinações foi menor do que o valor de “r” calculado, comprovando a boa repetibilidade do método quando aplicado às matrizes avaliadas neste trabalho.

Tabela 1: Taxas de recuperação dos padrões de folatos adicionado em dois diferentes níveis de concentração à tomate, catchup, molho e suco de tomate.

Produto/ Folato	Nível I (µg/100g)	Recuperação (%)	Nível II (µg/100g)	Recuperação (%)
----------------------------	------------------------------	----------------------------	-------------------------------	----------------------------

Tomate				
5-MetilTHF	180	90	360	92
5-FormilTHF	10	91	30	90
10-MetilTHF	25	92	50	93
10-FormilTHF	20	90	40	91
THF	50	92	100	91
Catchup				
5-MetilTHF	100	93	200	91
5-FormilTHF	10	90	20	90
10-MetilTHF	20	91	40	93
10-FormilTHF	10	91	30	93
THF	40	92	80	92
Molho de tomate				
5-MetilTHF	100	91	200	90
5-FormilTHF	10	91	20	91
10-MetilTHF	20	92	40	93
10-FormilTHF	10	91	30	93
THF	40	91	80	92
Suco de tomate				
5-MetilTHF	100	95	200	92
5-FormilTHF	10	94	20	94
10-MetilTHF	20	92	40	93
10-FormilTHF	10	91	30	93
THF	40	92	80	94

Os resultados são médias de 5 determinações em duplicata.

Tabela 2: Repetibilidade de 5-metilTHF adicionado a tomate, catchup, molho e suco de tomate.

Alimento	Concentrações obtidas para 10 determinações ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Repetibilidade (r)
Tomate	164,4	

	162,9 163,5 163,0 164,3 163,3 164,2 164,3 163,4 163,0	3,07
M ± DP %CV *	163,6 ± 0,6 0,4	
Catchup	234,4 228,9 230,4 228,4 232,5 233,4 234,1 229,4 228,9 231,1	5,83
M ± DP %CV *	231,2 ± 2,3 1,0	
Molho de tomate	223,1 220,2 218,7 223,2 222,3 218,4 222,4 220,5 221,2 220,9	5,13
M ± DP %CV *	221,1 ± 1,7 0,8	
Suco de tomate	242,6 239,1 239,3 240,6 241,6 243,7 242,3 239,5 241,2 239,3	5,00
M ± DP %CV *	240,9 ± 1,6 0,7	

Limite de confiança de 95% (t= 2,78).

* Média dos valores ± estimativa do desvio padrão %CV.

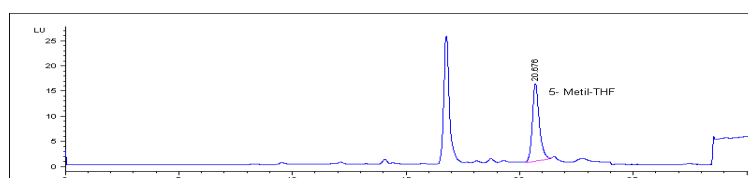
Os limites de detecção e quantificação foram 5, 30, 30, 7pg/mL e 5ng/mL e 10, 60, 60, 14pg/mL e 10ng/mL para 5-metilTHF, 5-formilTHF, 10-formilTHF, THF e 10-metilTHF, respectivamente.

2- Etapas Analíticas

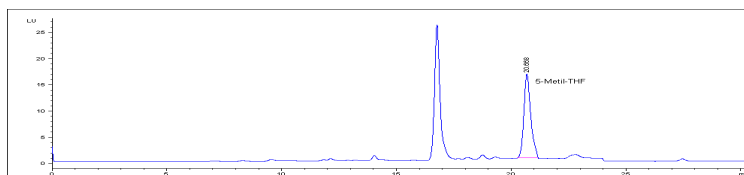
Os cromatogramas referentes às amostras de tomate tradicional e orgânico, catchup, molho e suco de tomate estão apresentados na Figura 1. Neles, o pico do 5-metilTHF, única forma de folato observada nas matrizes avaliadas, aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 20 minutos. A pureza do pico foi verificada através dos parâmetros de pureza, fornecidos pelo software HP-Chemstation, que confirmou a eficiência do sistema de separação cromatográfica. A concentração de 5-metilTHF foi avaliada por padronização externa, tendo a curva analítica apresentado boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9987 (Figura 2).

Na Tabela 3 estão apresentados os teores encontrados nas amostras de tomates orgânicos e tradicionais, onde foi possível observar que os valores variaram entre 176,0 e 326,9 μ g/100g e 208,7 a 345,1 μ g/100g para os cultivos tradicional e orgânico, respectivamente. Para os dois casos as quantidades encontradas estão próximas, ou até mesmo superiores, aos alimentos industrializados e enriquecidos com ácido fólico, como leites e cereais, disponíveis no mercado, confirmando o alto potencial do tomate, cultivado em ambos sistemas, como fonte de folatos. Os resultados obtidos após a realização da análise estatística comparativa (teste t) mostraram não haver diferença significativa ($p>0,05$) entre os teores de 5-metilTHF presentes em tomates tradicionais e orgânicos analisados nesse ensaio.

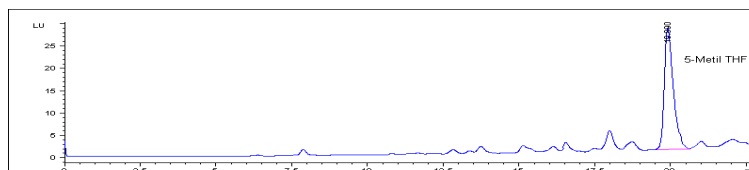
A.



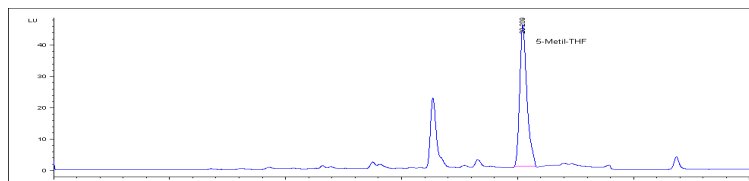
B.



C.



D.



E.

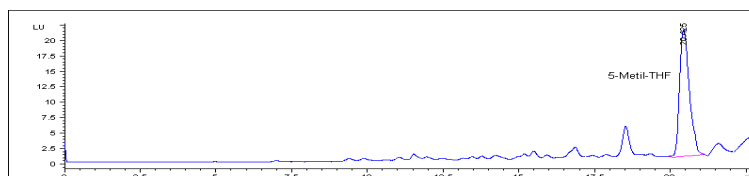


Figura 1: Perfil cromatográfico do extrato de tomate cultivado de forma tradicional (A) e orgânica (B), catchup (C), suco de tomate (D) e molho de tomate (E). Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 μ m, 250X4,6mm. Fase móvel: 100% de solução aquosa de ácido acético (2%) no início da corrida, chegando em 25 minutos a 76% de solução de ácido acético e 24% de acetonitrila. Vazão de 0,5mL/min. Detecção por fluorescência (λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} .360nm).

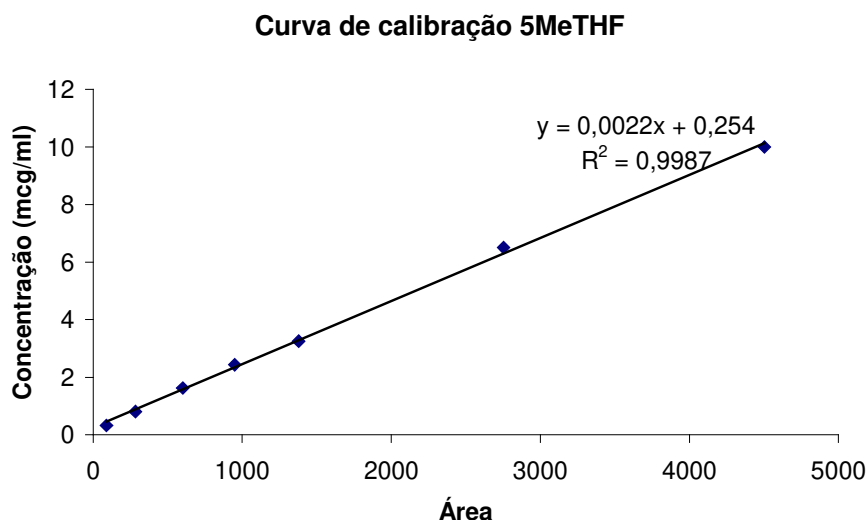


Figura 2: Curva de calibração para 5-metilTHF.

Tabela 3: Teores de 5-metilTHF em tomate tradicional e orgânico.

Alimento/Lotes		Teor de 5-metilTHF ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	
		M \pm DP	%CV
Tomate tradicional	1	193,2 \pm 1,4 a	0,7
	2	184,4 \pm 5,4 a	2,9
	3	326,9 \pm 8,1 b	2,5
	4	176,0 \pm 4,7 a	2,7
	5	195,3 \pm 9,8 a	5,0
Média dos valores		215,2 \pm 62,9	29,2
Tomate orgânico	1	208,7 \pm 8,8 c	4,2
	2	217,1 \pm 9,8 c	4,5
	3	235,9 \pm 7,5 c	3,2
	4	345,1 \pm 1,9 d	0,6
	5	239,3 \pm 9,9 c	4,1
Média dos valores		249,2 \pm 55,1	22,1

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M \pm DP %CV : média dos valores \pm estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

*** Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa.

Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão apresentadas as concentrações de 5-metilTHF encontradas nas amostras de catchup, molho e suco de tomate, respectivamente. Observa-se que para todos os produtos existe variação tanto entre marcas, quanto entre lotes da mesma marca. No caso do catchup os valores variaram entre 58,8 e 265,9 $\mu\text{g}/100\text{g}$, já para molho e suco de tomate os teores de 5-MetilTHF obtidos ficaram na faixa de 103,9 a 325,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 138,9 e 330,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente. Em todos os casos as concentrações obtidas também foram elevadas, e, como esses produtos

participam da dieta do brasileiro, pode-se, então, recomendá-los como boas fontes de folatos. Na comparação entre os valores obtidos por análise de variância (ANOVA) para as diferentes marcas de catchup detectou-se diferença significativa entre as marcas A e B, A e C, A e E, B e D ($p < 0,05$). Já para as marcas de molho de tomate verificou-se haver diferença significativa apenas entre as marcas B e C, B e E, além de C e D ($p < 0,05$). Já para suco de tomate utilizando-se o teste t, constatou-se não haver diferença significativa entre os valores para as marcas A e B ($p > 0,05$). Para todos os produtos verificou-se haver diferença significativa entre lotes, conforme destacado nas tabelas.

É importante ressaltar que os valores obtidos para os teores de 5-metilTHF nos alimentos avaliados nesse trabalho ficaram muito acima dos dados apresentados na literatura, obtidos para tomates cultivados em outros países. Tal fato, portanto, deve ser explicado, principalmente, devido a diferentes variedades e aos fatores edafoclimáticos, incluindo a incidência de luz, conforme já citado por Vahteristo et al. (1997) e Scott et al. (2000), além das diferentes composições dos solos em diferentes regiões do mundo e das distintas metodologias utilizadas.

4- CONCLUSÕES

Em relação ao método empregado, pode-se concluir, através dos parâmetros avaliados na validação, que o mesmo se mostrou eficiente para a determinação de folatos nas matrizes analisadas.

Foi possível verificar também que tanto os tomates cultivados de forma tradicional quanto os orgânicos apresentaram elevado teor de 5-metilTHF o que os qualifica como boas fontes da vitamina. Os produtos processados também mostraram conter elevados teores de 5-metilTHF podendo também serem considerados boas fontes da vitamina.

Os resultados obtidos mostraram também que o catchup apresentou a menor quantidade de folatos, quando comparado às demais matrizes, que apresentaram faixas de concentração muito próximas. Os resultados indicaram ainda que molho, suco e o próprio tomate apresentaram teores similares dessa vitamina.

Tabela 4: Concentrações de 5-metilTHF em catchup.

Catchup Marca/Lote	Concentração de 5-metilTHF ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	
	M \pm DP	%CV

CAT A1	96,1 ± 3,6 b	3,7
CAT A2	169,3 ± 0,9 a	0,5
CAT A3	265,9 ± 6,0 c	2,3
CAT A4	186,5 ± 0,7 a	0,4
CAT A5	234,7 ± 4,2 a	1,8
Média dos valores	190,5 ± 65,2	34,2
CAT B1	88,2 ± 1,6 b	1,8
CAT B2	62,4 ± 3,4 a	5,4
CAT B3	58,8 ± 1,4 a	2,4
CAT B4	66,4 ± 0,9 a	1,4
CAT B5	61,6 ± 1,6 a	2,6
Média dos valores	67,5 ± 11,9	17,6
CAT C1	108,9 ± 3,1 b	2,9
CAT C2	102,7 ± 0,6 b	0,6
CAT C3	88,0 ± 4,7 c	5,3
CAT C4	91,0 ± 0,4 a	0,4
CAT C5	93,7 ± 1,7 a	1,8
Média dos valores	96,9 ± 8,7	9,0
CAT D1	143,3 ± 2,0 a	1,4
CAT D2	136,2 ± 0,6 b	0,4
CAT D3	179,2 ± 8,3 c	4,6
CAT D4	167,9 ± 1,0 a	0,6
CAT D5	156,5 ± 2,4 a	1,5
Média dos valores	156,6 ± 17,6	11,2
CAT E 1	116,9 ± 1,1 a	0,9
CAT E2	106,4 ± 1,4 c	1,3
CAT E3	108,8 ± 4,0 a	3,7
CAT E4	124,8 ± 1,3 b	1,0
CAT E5	119,1 ± 1,8 a	1,5
Média dos valores	115,2 ± 7,6	6,6

• Valores são médias de determinações em duplicatas.

- ** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.*** Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa.

Tabela 5: Concentrações de 5-metilTHF em molho de tomate.

Molho de tomate Marca/Lote	Concentração de 5-metilTHF (µg/100g)	
	M ± DP	%CV
MOT A1	156, 2 ± 5,9 b	3,8
MOT A2	250,4 ± 2,2 c	0,9

MOT A3	225,1 ± 1,1 a	0,5
MOT A4	189,1 ± 10,3 a	5,5
MOT A5	181,6 ± 8,0 a	4,4
Média dos valores	200,5 ± 37,2	18,6
MOT B1	240,4 ± 1,1 b	0,5
MOT B2	286,2 ± 0,5 a	0,2
MOT B3	264,8 ± 1,8 a	0,7
MOT B4	286,2 ± 3,4 a	1,2
MOT B5	325,0 ± 3,0 c	0,9
Média dos valores	280,5 ± 31,2	11,1
MOT C1	171,7 ± 0,6 a	0,4
MOT C2	151,7 ± 1,0 a	0,7
MOT C3	202,8 ± 0,6 b	0,3
MOT C4	104,3 ± 2,1 a	2,0
MOT C5	103,9 ± 0,9 a	0,9
Média dos valores	146,9 ± 43,1	29,3
MOT D1	323,8 ± 1,4 b	0,4
MOT D2	263,6 ± 2,8 a	1,1
MOT D3	188,7 ± 1,2 c	0,6
MOT D4	284,0 ± 2,4 a	8,5
MOT D5	236,5 ± 1,0 a	0,4
Média dos valores	259,3 ± 50,7	19,6
MOT E 1	158,9 ± 1,9 a	1,2
MOT E2	273,8 ± 2,5 b	0,9
MOT E3	156,6 ± 1,2 a	0,8
MOT E4	200,6 ± 7,2 a	3,6
MOT E5	186,6 ± 0,6 a	0,3
Média dos valores	195,3 ± 47,7	24,4

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

*** Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa.

Tabela 6: Concentração de 5-metilTHF em suco de tomate.

Suco de tomate Marca/Lote	Concentração de 5-metilTHF (µg/100g)	
	M ± DP	%CV
SCT A1	330,8 ± 1,1 b	0,3
SCT A2	193,3 ± 1,5 a	0,8
SCT A3	184,1 ± 4,8 a	2,6
SCT A4	234,8 ± 3,4 a	1,5

SCT A5	183,7 ± 2,4 a	1,3
Média dos valores	225,3 ± 62,6	27,8
SCT B1	220,7 ± 7,0 b	3,2
SCTB2	156,6 ± 3,8 a	2,4
SCT B3	138,9 ± 2,6 a	1,9
SCT B4	196,6 ± 1,5 a	0,8
SCT B5	164,3 ± 2,2 a	1,3
Média dos valores	175,4 ± 32,8	18,7

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

*** Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2ed. rev. New York: Marcel Decker, 1991, p.453-490.
- BROWN, A.C., HU, F.B. Dietary modification of endothelial function: implications for cardiovascular disease. AJCN, v.73, p.673-686, 2001.
- CATHARINO, R.R.; LIMA, J.A.; GODOY, H.T. Metodologia para a determinação simultânea de folatos, B2 e B12 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Analyt. N.2, p.26-29, 2002.
- CAULCUTT, R., BODDY, R. Statistic for Analytical Chemists. 1st. Chapman and Hall, Londres. 1983. 253p.
- DEVLIN, T.M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 1ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1997, 1007p.
- GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. Adv. Food Nutr. Research, v.3, p.1-101, 1989.
- HAWKES, J.G.; VILLOTA, T.H. Foliates in foods: Reactivity, Stability during processing and nutritional implications. Critical Rev. Food Sci. Nutr., v.28, n.6, p.439-539, 1989.
- IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A.K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. J. Food Comp. Anal., v.16, p. 37-48, 2003.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. www.ibge.gov.br. Consulta em 01/07/2004.
- KATZUNG, B.G. Farmacologia básica e clínica. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.
- KONINGS, E.J.M et al. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. Am. J. Clin. Nutr., v.73, n.765-776, 2001.
- MARLETTA, L. et al. Food Composition Databases in Italy: Problems and Perspectives. J. Food Comp. Anal., v.13, p. 611-618, 2000.
- PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. Austr. J. Dairy Techn., vol.52, p.109-118, 1997.
- RODRIGUEZ, L.C., CAMPANA, A.M.G., BARRERO, F.A., LINARES, C.J., CEBA, M.R. Validation of analytical instrumental method by standard addition methodology. Journal of AOAC International, v. 78, n. 2, p. 471-476, 1995.
- SABA, A., MESSINA, F. Attitudes towards organic foods and risk/benefit perception associated with pesticides. Food Quality and Preference, v.12, p.45-54, 2003.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. J. Sci. Food Agric., v.80, p. 795-824, 2000.
- SEAGRI. Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Bahia. www.seagri.ba.gov.br. Consulta em 01/07/2004.

VAHTERISTO, L.T.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. J. AOAC Intern., v.80, n.2, p. 373-378, 1997.

WILLCOX, J.K.; CATIGNANI, G. L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v.43, p. 1-18, 2003.



CAPÍTULO 3

ANÁLISE DO TEOR DE FOLATOS EM BRÓCOLIS ORGÂNICO E TRADICIONAL *IN NATURA* E PERDAS NO PROCESSO DE COCÇÃO EM ÁGUA

Trabalho a ser submetido ao *Italian Journal of Food Science*.

ANÁLISE DO TEOR DE FOLATOS EM BRÓCOLIS ORGÂNICO E TRADICIONAL *IN NATURA* E PERDAS NO PROCESSO DE COZIMENTO EM ÁGUA

J. A. Lima & H. T. Godoy

**Department of Food Science – School of Food Engineering - Satate
University of Campinas – CP 6121 – CEP 13083-970 Campinas SP - Brazil**

RESUMO

O brócolis é um vegetal consumido em muitos países e citado por muitos autores como uma possível fonte de folatos. Os folatos fazem parte do grupo das vitaminas hidrossolúveis, atuando como cofatores na síntese de DNA e no ciclo da metilação. A carência de folatos, se deve principalmente a dietas inadequadas e está sendo apontada como uma das principais causas de incidência de malformações congênitas, doenças cardíacas e neurológicas além de alguns tipos de câncer. O objetivo desse trabalho foi determinar os folatos presentes em brócolis e a avaliar a influência do cozimento em água e tipo de cultivo no teor dessa vitamina. A técnica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência, incluindo uma etapa de extração com tampão fosfato, fase móvel composta por solução acidificada, coluna de C₁₈, detecção por fluorescência e quantificação por padronização externa. Na validação do método taxas de recuperação de 94 a 99%, limites de detecção de 5, 30, 30, 7pg/mL e 5ng/mL para 5-metilTHF, 5-formilTHF, 10-formilTHF, THF e 10-metilTHF, respectivamente e boa repetibilidade, comprovaram sua eficiência. Os folatos encontrados nas amostras analisadas foram o 5-metilTHF como forma predominante e o 5-formilTHF. Quanto à influência do tipo de cultivo na concentração da vitamina, observou-se no brócolis orgânico quantidade de 5-metilTHF significativamente maior do que a encontrada no mesmo vegetal cultivado de forma tradicional. Os teores da vitamina variaram entre 413,7 a 742,2µg/100g para 5-metilTHF e 4,8 a 12,8µg/100g para o 5-formil-THF. As perdas dessas formas de folatos, devidas ao cozimento em água, foram de aproximadamente 68%, sendo sua maior parte (53%) retida na água de cozimento.

ABSTRACT

Broccolis are a vegetable consumed in many countries and considered by many authors as a possible source of folates. The folates are part of the group of water-soluble vitamins, acting as cofactors in DNA synthesis and the methylation cycle. Folate deficiency is due mainly to inadequate diets and is being considered, as one of the main causes, of the incidence of congenital malformations, cardiac and neurological diseases and some types of cancer. The objective of this work was to determine the folate contents in broccoli and evaluate the effect of cooking in water and type of cultivation on the vitamin content. The technique used was high performance liquid chromatography, including an extraction step with phosphate buffer. The mobile phase was composed of an acidified solution and a C₁₈ column was used. Detection was carried out by fluorescence and quantification by external standardization. In the validation, recovery rates of 94 to 99% and detection limits of 5, 30, 30, 7 pg/mL and 5 ng/mL for 5-methylTHF, 5-formylTHF, 10-formylTHF, THF and 10-methylTHF were found, respectively and good repeatability thus proving the efficiency of the method. The folates found in the samples analyzed were 5-methylTHF, predominant form and 5-formylTHF. With respect to the influence of the type of cultivation on the concentration of the vitamin, in the organic broccoli the amount of 5-methylTHF was significantly higher than in the same vegetable cultivated in the traditional way. The vitamin contents varied between 413.7 and 742.2 µg/100g for 5-methyl-THF and from 4.8 to 12.8 µg/100g for 5-formyl-THF. The losses of these folates after cooking in water were of approximately 68%, most of it (53%) being in the cooking water.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, o avanço nos conhecimentos tornou evidente que os folatos apresentam importância vital para a saúde humana. São essenciais como cofatores na síntese de DNA e neurotransmissores, além do metabolismo de aminoácidos. A ingestão de níveis adequados de folatos são requeridos para o metabolismo normal, divisão celular, funções neurais e crescimento. Gestantes devem aumentar o aporte de folatos na dieta a fim de prevenir malformações congênitas como espinha bífida e outros defeitos no tubo neural de fetos (Czeizel e Dudás, 1992; MRC, 1991; Shaw et al., 1995). A ingestão de quantidade abaixo de 240µg folato/dia também está associada ao aumento de risco de partos prematuros e recém-nascidos com baixo peso (Scholl et al., 1996).

A deficiência dessa vitamina também está relacionada ao risco de câncer de cólon (Giovannucci et al., 1995), doenças cardiovasculares ocasionadas por elevados níveis de homocisteína (Robinson et al., 1998, Verhoff et al., 1996) e desordens cerebrais como depressão e mal de Alzheimer (Clarke et al., 1998; Riggs et al., 1996).

Dentre as principais fontes de folatos os vegetais podem ser considerados as mais importantes (Gregory III, 1989). A grande variação observada nos níveis da vitamina encontrados nesses alimentos pode ser devida aos diferentes métodos de análise utilizados nas determinações, mas, também, a fatores que influenciam no crescimento e desenvolvimento da planta. Nos vegetais os derivados de folatos e sua distribuição nas diferentes porções são afetados pela luz, já que a síntese da vitamina ocorre na fotorespiração (Carl et al., 1995; Wagner, 1995). Além disso, os folatos presentes nos vegetais estão predominantemente na forma de poliglutamatos, porém a estocagem desses alimentos podem levar à hidrólise dessa forma por conjugases endógenas (Leichter et al., 1979; Müller, 1993). Scott et al. (2000) também apontam o grau de maturação como um parâmetro importante no teor de folatos nesse tipo de alimento, já que eles participam do processo de divisão celular e, portanto, a sua quantidade é maior nos tecidos em divisão do que nos tecidos já maduros, onde não há ocorrência desse processo. Minerais como Mg^{2+} e K^{+} também são bastante importantes na produção de folatos pelos vegetais, participando de uma das etapas da biossíntese dessa vitamina. No caso do brócolis, a concentração de folatos totais determinadas por diferentes métodos por diversos autores, variou entre 65 a 189µg/100g, conforme os dados apresentados na Tabela 1. Apenas Konings et al. (2001) determinaram as diferentes formas de folatos nesse vegetal.

Tabela 1: Teor de folatos totais presentes em brócolis.

Folatos totais em brócolis ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Referências
174 \pm 14	Iwatani et al. (2003)
65 \pm 2	Konings et al. (2001)
114	Vahteristo et al. (1997)
102	De Souza e Eitenmiller (1986)
100	Gregory (1989)
133	Mullin et al. (1982)
189	Leichter et al. (1978)
169	Leichter et al. (1979)

Atualmente, o cultivo de vegetais, incluindo o brócolis, tem sido realizado pelos métodos tradicionais e também por agricultura orgânica, o que poderia acarretar em alterações na concentração de folatos, porém, estudos sobre essas diferenças não foram encontrados na literatura.

Estudos envolvendo a estabilidade de folatos em alimentos são particularmente dificultados devido às múltiplas formas existentes da vitamina e a variação na sua suscetibilidade à degradação, além da influência de vários fatores como pH, concentração de oxigênio e presença de íons metálicos (Gregory III, 1989).

Os folatos, como muitas outras vitaminas hidrossolúveis, são muito mais sujeitos a perdas por lixiviação, em alimentos cozidos em água, do que à degradação química. Leichter et al. (1979) examinaram o processo de lixiviação de folatos durante o cozimento (10 minutos em água em ebulição) para vários vegetais e observaram que entre 22 e 84% da quantidade inicial da vitamina vai para a água de cozimento. Os mesmos autores, afirmaram ainda, que a soma do teor de folatos encontrado na água de cozimento com a quantidade da vitamina retida no vegetal é equivalente ao total de folatos presente no vegetal cru. No caso do brócolis, apenas 38% dos folatos é retido no vegetal. Já Klein et al. (1979) relataram 50% de retenção dos folatos em brócolis após cozimento em água, resultados que sugerem ser a extração aquosa e não a oxidação ou degradação térmica a maior responsável pelas perdas de folatos durante o cozimento.

O objetivo do presente trabalho foi, portanto, determinar os folatos presentes em brócolis cultivados na região de Campinas (Brasil), bem como comparar sua concentração em brócolis cultivados de forma orgânica e tradicional e verificar as perdas ocorridas após o cozimento do vegetal em água.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produtos avaliados

2.1.1. Influência do tipo de cultivo

Para o estudo da influência do tipo de cultivo foram adquiridos cinco diferentes lotes de brócolis cultivados de forma tradicional e de forma orgânica no mercado da cidade de Campinas - Brasil. Os lotes foram diferenciados pela data de colheita, sendo cada lote representado por um maço de brócolis. As flores e o talo foram finamente picados e homogeneizados, antes da retirada de amostra para a análise. Todas as determinações foram feitas em duplicatas.

2.1.2. Influência de cozimento em água

Cinco diferentes lotes de brócolis (*Brassica oleracea* var. *Italica* Plenck), utilizados para o estudo da influência do cozimento em água no teor de folatos, foram adquiridos em mercados da cidade de Campinas-SP, com a preocupação de se obter lotes com datas de colheita diferentes. Cada lote foi composto por um maço de brócolis. As flores e o talo foram retirados, picados e homogeneizados, antes da retirada da amostra para análise. Dividiu-se o lote em duas porções, uma para a determinação do material cru e outra do cozido.

Para os procedimentos de cozimento pesou-se 100,0g de brócolis, adicionou-se 1.0L de água e cozinhou-se em fogo médio por cinco minutos após ebulição. Ao final do cozimento, o material foi escorrido e tanto o vegetal como a água de cozimento, foram, imediatamente, esfriadas até a temperatura ambiente, para posterior análise. O processo de cozimento e as determinações foram realizados em duplicatas, para cada lote.

O cálculo da porcentagem de perda da vitamina após o cozimento foi realizado através da diferença, em base seca, do teor de folatos no material cru e cozido.

2.2. Determinação de umidade

Utilizou-se o método por secagem em estufa (Nova Ética, 400/3ND, N° série 0766/00) a temperatura de 105°C até peso constante (aproximadamente 3h). As determinações foram feitas em triplicatas.

2.3. Determinação dos folatos

Para a análise dos folatos em brócolis, seguida pelos estudos de estabilidade após cozimento e efeito de cultivo nos teores da vitamina, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Catharino et al. (2002), adaptada para a amostra.

Desta forma, para a extração tomou-se 10,0g de brócolis, após homogeneização total da amostra. Os folatos foram extraídos com 50,0mL de tampão fosfato, composto por Na_2HPO_4 (0,25mol/L)/ KH_2PO_4 (0,37mol/L), em homogeneizador tipo Turatec. Retirou-se uma alíquota de 9,0mL do extrato e adicionou-se 500 μL de ácido tricloroacético (TCA), completando-se o volume final com tampão fosfato (balão volumétrico de 10,0mL). Seguiram-se então as etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a outra em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45 μm . O volume de 100 μL do filtrado foi injetado, imediatamente, no cromatógrafo a líquido.

Os folatos foram separados em sistema de eluição por gradiente, com 100% de solução aquosa de ácido acético (2%) a pH 2,8, chegando em 40 minutos a 76% de solução de ácido acético e 24% de acetonitrila, mantendo-se essa proporção até 45 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 15 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de fluorescência e arranjo de diodos (DAD). Para THF, 5-metilTHF, 5-formilTHF utilizou-se os comprimentos de onda (λ) de $\lambda_{\text{excitação}}$ de 290nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 360nm. Para o 10-formilAF utilizou-se o mesmo $\lambda_{\text{excitação}}$ e o $\lambda_{\text{emissão}}$ de 445nm. Já para o 10-metilAF utilizou-se o λ de 290nm, em DAD. A identificação da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação foi feita por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas para as duas formas da vitamina encontradas. Para o 5-metilTHF as concentrações foram de 30, 80, 160, 240, 330, 650, 1000 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, já para o 5-formilTHF de 5, 15, 30, 45, 60 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, sendo cada ponto, nos dois casos, representado pela média de três determinações.

2.3.1. Reagentes

Os padrões de tetraidrofolato (THF), 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-metilTHF), 10-metil- ácido-fólico (10-metilAF), 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-formilTHF), 10- formil-ácido-fólico (10-formilAF) foram adquiridos do Laboratório Dr. Schircks (Jona, Suíça). A acetonitrila grau cromatográfico, o ácido acético e o hidróxido de potássio, grau analítico foram adquiridos da Merck, Brasil. O ácido tricloroacético, Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 grau analítico, foram adquiridos da Synth, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e FHLP 04700 Millipore), com poros de 0,45 μm de diâmetro.

2.3.2. Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático com capacidade de 1 a 100 μL , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD – UV-visível) e de fluorescência, dispostos em série. O software HP-Chemstation permitiu o melhor tratamento dos dados. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 μm , 250X4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) foi utilizada para o processo cromatográfico, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C_{18} , 5 μm , 10X4,6mm d.i (Varian).

2.4. Validação da metodologia

Testes de recuperação e repetibilidade foram realizados com as amostras analisadas nesse trabalho, já que a metodologia aplicada, foi desenvolvida para outro tipo de alimento. Limites de detecção e quantificação também foram determinados para essas novas matrizes.

2.4.1. Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se testes de recuperação de padrões adicionados ao brócolis, em dois níveis diferentes de concentração. Esses valores foram escolhidos aleatoriamente. Para as análises foram utilizados 10,0g de brócolis.

Para essas determinações, analisou-se inicialmente, os teores de folatos naturalmente presentes em brócolis. A concentração de folatos na amostra foi determinada através da média de 10 análises. Posteriormente, adicionou-se quantidades

conhecidas dos folatos, seguindo-se, então, a metodologia. Para o cálculo da recuperação, de acordo com Rodriguez et al. (1995), utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração amostra})}{\text{Concentração adicionada}} \times 100\%$$

2.4.2. Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de dez determinações, nos níveis de concentração de folatos encontrados na matriz. A repetibilidade foi calculada de acordo com Calcutt e Boddy (1983) através da equação:

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

r = repetibilidade

sr = estimativa do desvio padrão

t = de Student

2.4.3. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção foi estimado por diluições sucessivas dos padrões de concentrações conhecidas das diferentes formas da vitamina, até a determinação da menor quantidade detectável, para cada uma delas, como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (Calcutt e Boddy, 1983).

2.5. Análise Estatística

Com a finalidade de se definir se existiu ou não diferença significativa entre os valores obtidos para o teor de folatos avaliados em brócolis cultivado de forma orgânica e tradicional realizou-se teste t, utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 2.01).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação da Metodologia

Na Tabela 2 estão apresentadas as taxas de recuperação obtidas. Os valores médios para as duas concentrações de folatos variaram entre 94 e 99%.

Para o ensaio de repetibilidade obteve-se os resultados apenas para 5-metilTHF e 5-formilTHF, as únicas formas de folatos que foram encontradas nas amostras de brócolis avaliadas. As faixas de repetibilidade esperadas entre dez determinações, em duplicata, de folatos estão dispostas na Tabela 3. Esperava-se que os valores fornecidos por determinações em duplicata diferissem dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada. Observou-se que a maior diferença entre os valores obtidos nas dez determinações, são menores que o valor de “r” calculado, comprovando a boa repetibilidade do método aplicado para as determinações em brócolis.

Os limites de detecção (LOD) foram 5, 30, 30, 7pg/mL, 5ng/mL para 5-metilTHF, 5-formilTHF, 10-formilTHF, THF e 10-metilTHF, respectivamente. Os limites de quantificação foram considerados como sendo duas vezes o LOD.

Tabela 2: Recuperação dos padrões de folatos adicionados às amostras de brócolis.

Folatos	Nível I	Recuperação (%)	Nível II	Recuperação (%)
5-metilTHF	1,00µg/100mL	96	0,50µg/100mL	99
5-formilTHF	0,20µg/100mL	98	0,10µg/100mL	95
10-metilTHF	0,10µg/100mL	97	0,05 µg/100mL	94
10-formilTHF	0,14 µg/100mL	97	0,07µg/100mL	96
THF	0,20 µg/100mL	96	0,10µg/100mL	97

Os resultados são médias de cinco determinações.

Tabela 3: Repetibilidade, em brócolis, nas determinações de 5-metilTHF e 5-formilTHF.

Teor de 5-MeTHF (µg/100g)	Repetibilidade (r)	Teor de 5-ForTHF (µg/100g)	Repetibilidade (r)
420,36	4,83	6,45	3,00
421,45		6,98	
420,98		5,74	
423,89		6,02	
422,69		5,73	
421,87		4,99	
419,45		6,12	
423,96		5,27	
423,36		5,48	
421,37		6,14	
421,9 ± 1,5 0,4% *		5,9 ± 0,6 10,2%*	

Limite de confiança de 95% (t= 2.78)* Média dos valores ± estimativa do desvio padrão, coeficiente de variação.

3.2. Etapa analítica

Na Figura 1 estão apresentados os cromatogramas obtidos através da injeção de padrões (A) e após a análise de folatos em brócolis (B). Neles, os picos de 5-metilTHF e 5-formilTHF aparecem isolados com tempos de retenção de aproximadamente 25,7 e 28,6, respectivamente.

A curva analítica traçada por padronização externa apresentou boa linearidade na faixa de concentração de 30-1000 μ g/100mL e 3-50 μ g/100mL, para 5-metilTHF e 5-formilTHF, os coeficientes de correlação 0,9987 e 0,9996, respectivamente (Figura 2).

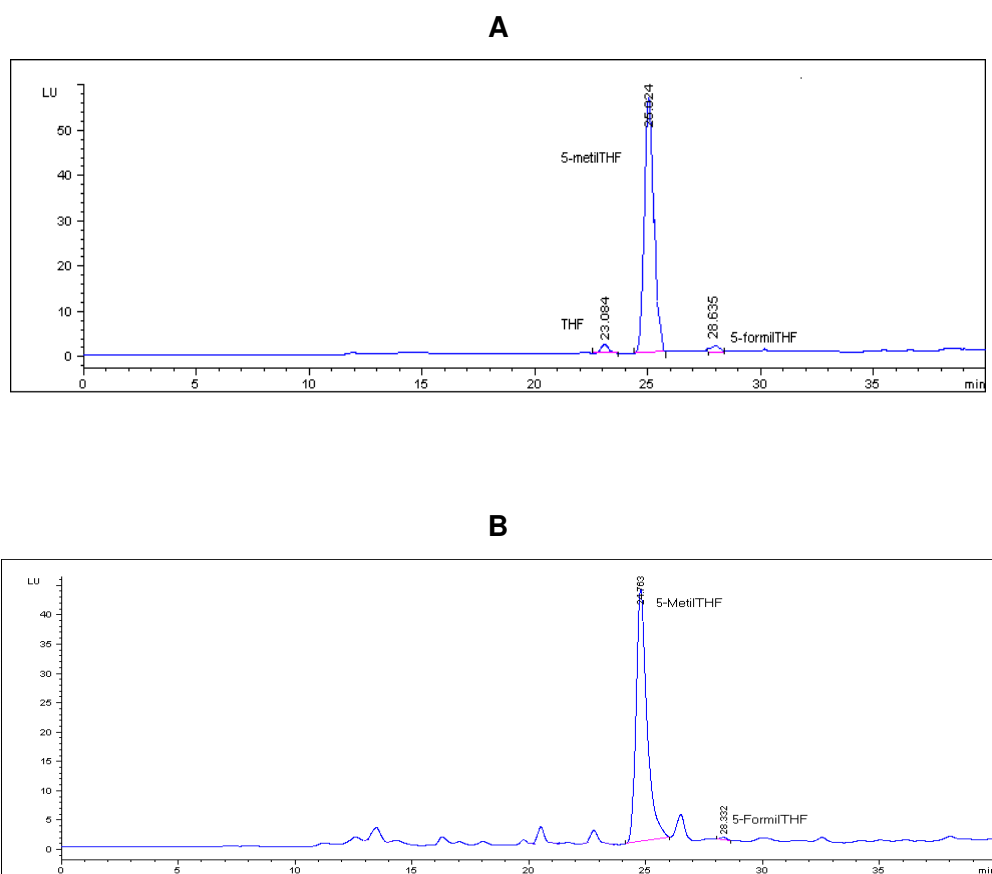


Figura 1: Perfil cromatográfico dos padrões de folatos (A) e do extrato de brócolis (B). Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 μ m, 250X4,6mm. Fase móvel: 100% de solução aquosa de ácido acético (2%) no início da corrida, chegando em 25 minutos a 76% de solução de ácido acético e 24% de acetonitrila. Vazão de 0,5mL/min. Detecção por fluorescência (λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} .360nm).

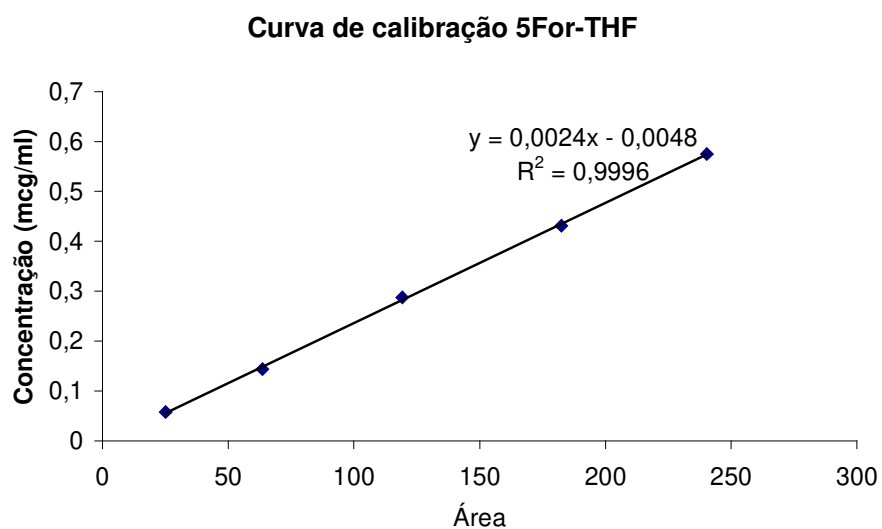
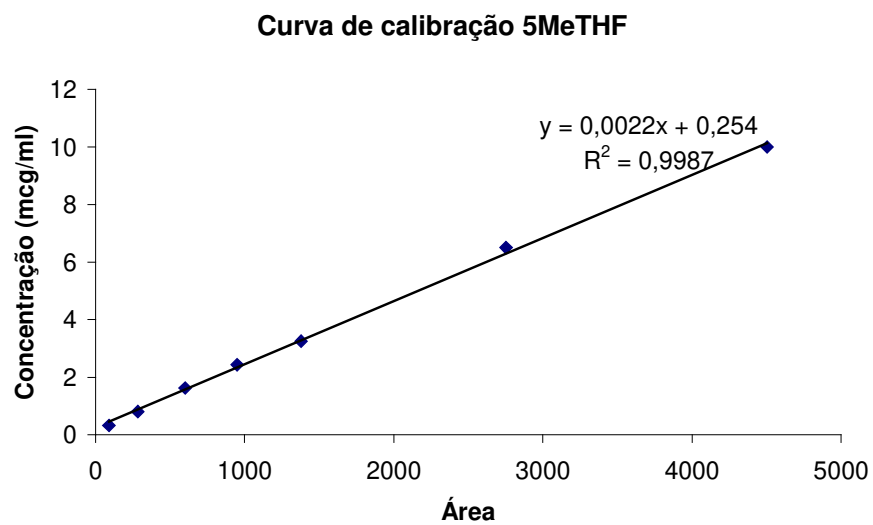


Figura 2: **Curva de calibração de 5-metilTHF e 5-formilTHF.**

3.2.1. Influência do tipo de cultivo

Na Tabela 4 estão apresentados os valores dos teores de 5-metilTHF e 5-formilTHF, obtidos após a análise de brócolis orgânico e tradicional. Os resultados mostraram haver diferença significativa no teor de folatos totais entre os diferentes tipos

de cultivos. Os teores de 5-metilTHF foram significativamente superiores nos brócolis orgânicos, já os teores de 5-formilTHF não apresentaram diferença em relação ao tipo de cultivo.

Tabela 4. Teores de folatos em brócolis cultivado em sistema tradicional e orgânico.

Cultivo/Lote		Teor de 5-metilTHF ($\mu\text{g}/100\text{g}$) M \pm DP %CV		Teor de 5-formilTHF ($\mu\text{g}/100\text{g}$) M \pm DP %CV	
Tradicional	1	413,7 \pm 6,3	1.5	10.7 \pm 0.7	6.5
	2	482,7 \pm 4,7	1.0	12.8 \pm 1.0	7.8
	3	742,2 \pm 8,4	1.1	4.8 \pm 0.5	10.4
	4	441,7 \pm 4,6	1.0	6.1 \pm 0.4	6.6
	5	679,9 \pm 4,0	0.6	4.8 \pm 0.7	14.6
Média dos lotes		552,0 \pm 148,8 a	27,0	7,8 \pm 3,7 a	77,0
Orgânico	1	954.0 \pm 6.5	0.7	12.5 \pm 0.8	6.4
	2	1265.3 \pm 10.6	0.8	13.6 \pm 0.5	3.7
	3	1706.0 \pm 16.4	0.1	7.9 \pm 0.4	5.1
	4	1739.7 \pm 10.2	0.6	8.7 \pm 0.7	8.1
	5	959.6 \pm 8.1	0.8	8.3 \pm 1.0	10.2
Média dos lotes		1324,9 \pm 384,7 b	29.0	10,2 \pm 2,6 a	25.5

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M \pm DP %CV : média dos valores \pm estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

*** letras diferentes na mesma coluna representa haver diferença significativa ($p < 0,05$).

3.1.2. Influência do cozimento em água

Para a avaliação da estabilidade dos folatos após o cozimento de brócolis em água, inicialmente, determinou-se a umidade (%) referente a cada lote analisado no trabalho. Na Tabela 5 encontram-se os valores obtidos nesse ensaio.

Nos lotes de brócolis avaliados, conforme já mencionado, apenas 5-metilTHF e 5-formilTHF foram detectados. A concentração das duas formas da vitamina, obtida em cinco diferentes lotes de brócolis (*in natura* e cozido) e na água de cozimento, estão apresentadas na Tabela 6. Observando-se os valores nota-se que aproximadamente 53% do teor de 5-metilTHF e 5-formilTHF presente em brócolis *in natura* passaram para a água de cozimento. Esse fato está de acordo com as afirmações de Leichter et al. (1979) de que a maior parte da vitamina é perdida por lixiviação, em vegetais submetidos ao cozimento em água.

Tabela 5: **Determinação da umidade das amostras de brócolis cozidas e *in natura***

Brócolis/Lotes		Umidade (%)	
		M ± DP	%CV
<i>In natura</i>	1	86,2 ± 0,9	1,0
	2	86,0 ± 0,2	0,2
	3	87,5 ± 0,1	0,1
	4	88,0 ± 0,1	0,1
	5	87,3 ± 0,5	0,6
Média dos lotes		87,0 ± 0,9	1,0
Cozido	1	91,2 ± 0,1	0,1
	2	91,1 ± 0,1	0,1
	3	90,0 ± 0,4	0,4
	4	90,6 ± 0,1	0,1
	5	91,8 ± 0,3	0,3
Média dos lotes		90,9 ± 0,7	0,8

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

Na Tabela 7 estão apresentados os teores obtidos para os mesmos lotes, em base seca, e a porcentagem de perda das duas formas da vitamina após o cozimento em água. Observa-se que os valores para 5-metilTHF variaram de 2997,8 a 5937,68µg/g e de 931,8 a 1763,0µg/g, para brócolis *in natura* e cozido, respectivamente. No caso de 5-formilTHF os teores ficaram entre 37,8 a 91,4µg/g e 12,0 a 24,7µg/g, para as mesma amostras. Observou-se, portanto, uma grande variação entre os lotes, tanto para 5-metilTHF quanto para 5-formilTHF, devida provavelmente, a diferentes condições edafoclimáticas durante o plantio e grau de maturação, já que a síntese de folatos pelos vegetais é bastante influenciada por esses fatores. Quanto à porcentagem de perda das diferentes formas da vitamina verificou-se que para o 5-metilTHF e para o 5-formilTHF as perdas médias foram de aproximadamente 67 e 70%, valores superiores aos declarados por Klein et al. (1979) e Leichter et al. (1979) que observaram perdas de 50% e 62%, respectivamente, do teor de folatos totais, utilizando método microbiológico, após o cozimento de brócolis em água. A solubilidade dos folatos em água é uma característica que influencia fortemente em sua perda, principalmente por lixiviação, quando ocorre contato direto do vegetal com a água em ebulição. Os resultados obtidos neste estudo revelam que o brócolis analisado

apresenta alto teor de folatos e as perdas ocorridas durante o processo de cozimento devem ser consideradas nos inquéritos de consumo alimentar, instrumentos necessários em estudos epidemiológicos.

Tabela 6: Teores de folatos em cinco diferentes lotes de brócolis, *in natura* e cozido e na água de cozimento.

Brócolis/ Folatos	In natura		Cozido		Água de Cozimento	
	M ± DP	%CV	M ± DP	%CV	M ± DP	%CV
5-MetilTHF (µg/100g)						
1	413,7 ± 7,3	1,7	82,0 ± 4,2	5,1	250,3 ± 3,8	1,5
2	482,7 ± 4,7	1,0	115,0 ± 3,9	3,4	272,4 ± 9,4	3,4
3	742,2 ± 5,4	0,7	176,3 ± 5,7	3,2	401,6 ± 7,8	1,9
4	441,7 ± 4,6	1,0	135,3 ± 5,6	4,1	202,1 ± 5,4	2,7
5	679,9 ± 4,0	0,6	126,9 ± 3,6	2,8	306,7 ± 6,1	2,0
Média dos valores	552,0 ± 148,9	27,0	127,1 ± 34,2	26,9	286,6 ± 74,6	26,0
5- FormilTHF (µg/100g)						
1	10,7 ± 0,7	6,5	1,9 ± 0,1	5,3	6,8 ± 0,1	1,5
2	12,8 ± 1,0	7,8	2,2 ± 0,2	9,1	8,0 ± 0,1	1,2
3	4,8 ± 0,5	10,4	1,2 ± 0,1	8,3	2,1 ± 0,2	9,5
4	6,1 ± 0,4	6,6	1,4 ± 0,1	7,1	2,8 ± 0,1	3,6
5	4,8 ± 0,7	14,6	1,1 ± 0,2	18,2	2,0 ± 0,1	5,0
Média dos valores	7,8 ± 3,7	47,4	1,6 ± 0,5	31,3	4,3 ± 2,8	65,1

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

4. CONCLUSÕES

O método utilizado se mostrou bastante eficiente e adequado para a determinação de folatos em brócolis, visto que todos os parâmetros avaliados na sua validação mostraram resultados positivos.

A avaliação da influência do tipo de cultivo na concentração das duas diferentes formas de folatos permite concluir que o brócolis cultivado de forma orgânica apresenta maior quantidade de 5-metilTHF, enquanto o teor de 5-formilTHF permanece praticamente inalterado, comparando os valores obtidos para o mesmo vegetal, cultivado de forma tradicional.

Observando-se os altos teores de 5-metilTHF e 5-formilTHF encontrados no brócolis pôde-se concluir que esse vegetal pode ser considerado uma excelente fonte da vitamina. Entretanto, o processo de cozimento em água acarreta em consideráveis perdas dos folatos, por lixiviação, indicando ser importante incentivar o aproveitamento da água de cozimento, a fim de que uma maior quantidade de folatos possa ser ingerida.

Tabela 7: Folatos em brócolis em base seca e porcentagem de perda após cozimento.

Brócolis/Folato	In natura		Cozido		% Perda
	M ± DP	%CV	M ± DP	%CV	
5-MetilTHF (µg/100g)					
1	2997,8 ± 51,3	1,7	931,8 ± 49,7	5,3	68,9
2	3447,8 ± 32,4	0,9	1292,1 ± 40,2	3,1	62,6
3	5937,6 ± 43,7	0,7	1763,0 ± 63,4	3,6	70,3
4	3680,8 ± 49,2	1,3	1439,4 ± 64,4	4,5	60,9
5	5353,5 ± 37,1	0,7	1547,6 ± 42,5	2,7	71,0
Média dos valores	4283,5 ± 1284,1		1356,6 ± 344,8		66,7 ± 4,7
5- FormilTHF (µg/100g)					
1	77,5 ± 5,1	6,6	21,6 ± 1,1	5,1	72,1
2	91,4 ± 7,1	7,8	24,7 ± 2,2	8,9	72,9
3	38,4 ± 4,0	10,4	12,0 ± 1,0	8,3	68,7
4	50,8 ± 3,3	6,5	14,9 ± 1,1	7,4	70,7
5	37,8 ± 5,5	14,6	13,4 ± 2,4	17,9	64,5
Média dos valores	59,2 ± 24,1		17,3 ± 5,5		69,8 ± 3,4

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carl, G.F., Hudson, F.Z., McGuire, B.S. 1995. Rat liver subcellular folate distribution shows association of formyltetrahydropteroylpentaglutamates with mitochondria and methyltetrahydropteroylhexaglutamates with cytoplasm. *J. Nutr.* 125: 2096.
- Catharino, R.R.; Lima, J.A.; Godoy, H.T. 2002. Metodologia para a determinação simultânea de folatos, B2 e B12 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *Analyt.* 2: 26.
- Caulcutt, R., Boddy, R. 1983. *Statistic for Analytical Chemists*. 1st. Chapman and Hall, Londres. 253p.
- Clarke, R., Smith, D., Jobst, K.A, Refsum, H., Sutton, L., Ueland, P.M. 1998. Folate, vitamin B₁₂ and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.*, 55: 1449.
- Czeizel A.E., Dudás, I. 1992. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. Engl. J. Med.* 327: 1832.
- DeSouza, S.C.; Eitenmiller, R.R. 1986. Effects of processing and storage on the folate content of spinach and broccoli. *J. Food Sci.* 51: 526.
- Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Fuchs, C., Rosner, B.A., Speitzer, F.E., Willett, W.C. 1995. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurse's Health Study. *Ann. Intern. Med.* 129: 517.
- Gregory III, J.F. 1989. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv. Food Nutr. Res.* 3:1.
- Iwatani, Y., Arcot, J., Shrestha, A.K. 2003. Determination of folate contents in some Australian vegetables. *J. Food Comp. Anal.* 16: 37.

- Klein, B.P., Lee, H.C., Reynolds, P.A., Wangles, N.C. 1979. Folacin content in microwave and conventionally cooked spinach. *J. Food Sci.*46(2):286.
- Konings, E.J.M. Roomans, H.H.S., Dorant, E., Goldbohm, R.A., Saris, W.H.M., Brandt, P.A. 2001. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:765.
- Leichter, J.; Switzer, V.P.; Landymore, A.F. 1978. Effect of cooking on folate content of vegetables. *Nutr. Rep. Int.* 18(4): 475.
- Leichter, J.; Landymore, A.F.; Krumdieck, C.L. 1979. Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effect on the determination of free folate content. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 92.
- MRC Vitamin Study Research Group. 1991. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet.* 338: 131.
- Müller H. 1993. Bestimmung der Folsäure –Gehalt von Gemüse und Obst mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196: 137.
- Mullin, W.J.; Wood, D.F.; Howsam, S.G. 1982. Some factors affecting content of spinach, swiss chard, broccoli and brussels sprouts. *Nutr. Rep. Int.* 26(1): 7.
- Riggs, K.M., Apiro, A. III, Tucker, K., Rush, D. 1996. Relations of vitamin B12, vitamin B6, folate and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 306.
- Robinson, K., Arheart, K., Refsum, H., Brattström, L., Boers, G., Ueland, P., Rubba, P., Palma-Reis, R., Meleasy, R., Daly, L., Witteman, J., Graham, I. 1998. Low circulating folate and vitamin B₆ concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease and coronary artery disease. *Circulation* 97: 437.

- Rodriguez, L.C., Campana, A.M.G., Barrero, F.A., Linares, C.J., Ceba, M.R. 1995. Validation of analytical instrumental method by standard addition methodology. *Journal of AOAC Intern.* 78(2): 471.
- Scholl, T.O., Hediger, M.L., Schall, J.L., Khoo, C.S., Fisher, R.L. 1996. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 520.
- Scott, J.; Rébeille, F.; Fletcher, J. 2000. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J. Sci. Food Agric.* 80: 795.
- Shaw, G.M., Schaffer, D., Velie, E.M., Morland, K., Harris, J.A. 1995. Periconceptional vitamin use dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 6: 219.
- Vahteristo, L.T.; Ollilainen, V.; Varo, P. 1997. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. *J. AOAC Intern.* 80(2): 373.
- Verhoff, P., Stampfer, M.J., Buring, J.E., Gaziano, J.M., Allen, R.H., Stabler, S.P., Reynolds, R.S., Kok, F.J., Hennekens, C.H., Willett, W.C. 1996. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B₆, B₁₂ and folate. *Am. J. Epidemiol.* 143: 845.
- Wagner, C. 1995. Biochemical role of folate in cellular metabolism. In *Folate in "Health and Disease"*, ed. L. Bailey. p.23. Marcel Dekker, N. York.



CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ESPINAFRE – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TIPO DE CULTIVO, ÉPOCA DE PLANTIO E COZIMENTO

Trabalho a ser submetido ao *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM ESPINAFRE – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TIPO DE CULTIVO, ÉPOCA DE PLANTIO E COZIMENTO

Juliana A. Lima & Helena T. Godoy

Department of Food Science – School of Food Engineering - State University of Campinas – CP 6121 – CEP 13083-970 Campinas SP - Brazil

RESUMO

Dentre as vitaminas hidrossolúveis do grupo B, os folatos têm sido apontados como um dos componentes mais importantes, principalmente, por atuarem diretamente na síntese de DNA. Dessa forma, a carência dessa vitamina, causada na maioria dos casos por ingestão deficiente, tem sido associada a diversos problemas incluindo malformações congênitas, doenças cardíacas e degenerativas, anemia megaloblástica e alguns tipos de câncer, entre outros. Alimentos como vegetais verdes escuros, leveduras e fígados são considerados as principais fontes de folatos. Entre os vegetais, o espinafre tem se destacado como uma das principais fontes, no entanto, dados com relação ao teor de folatos em espinafres cultivados no Brasil não foram encontrados na literatura. Assim, o objetivo desse trabalho foi a determinar os teores de folatos em espinafre e avaliar o efeito do tipo de cultivo, época de plantio e cozimento em água, nos teores dessa vitamina. Para tanto utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, incluindo uma etapa de extração com tampão fosfato, limpeza do extrato, filtração e injeção no cromatógrafo. As condições cromatográficas consistiram de fase móvel composta por solução aquosa ácida e acetonitrila e coluna de C₁₈. Para garantia da confiabilidade dos resultados a metodologia foi validada para o espinafre. O método se mostrou eficiente na separação das diferentes formas de folatos, com limites de detecção de 5, 30, 30, 7pg/mL e 5ng/mL para 5-metilTHF, 5-formilTHF, 10-formilTHF, THF e 10-metilTHF, respectivamente. Além da boa repetibilidade, as taxas de recuperação para as formas da vitamina variaram entre 96 e 102%. Espinafres cultivados de forma tradicional e orgânica não apresentaram diferença significativa nos teores de folatos, assim como também não se observou diferença significativa entre valores obtidos em diferentes períodos do ano. Os teores de 5-metilTHF e do 5-formilTHF, em base seca, variaram de 4260,3 a 8504,8µg/g e 86,8 a 183,3µg/g, respectivamente. O cozimento em água resultou em perdas de aproximadamente 79% para o 5-metilTHF e 66% para o 5-formilTHF. Com

base na determinação dos teores de folatos presentes na água de cozimento, pode-se afirmar que as perdas se deram, principalmente, devido ao processo de lixiviação.

ABSTRACT

Of the water-soluble vitamins B group, the folates have been pointed out as one of the most important components, mainly for acting directly on DNA synthesis. In this way, the lack of this vitamin, caused in the majority of cases for deficient ingestion, has been associated with many problems including congenital malformations, cardiac and degenerative diseases, megaloblastic anemia and some types of cancer, amongst others. Foods such as dark greens vegetables, yeasts and liver are considered the principal sources of folates. Amongst the vegetables, stands out as one of the main sources, however, no data on the folate contents in the spinach cultivated in Brazil have been found in the literature. Thus, the objective of this work was to determine folates contents in spinach, to evaluate of the type of cultivation and planting period influence and cooking in water on the level of the vitamin. The determination was carried out by high performance liquid chromatography, including an extraction step with phosphate buffer, clean-up of the extract, filtration and injection into the chromatograph. The chromatographic conditions consisted of a mobile phase composed of an acid solution and acetonitrile and a C₁₈ column. To guarantee the trustworthiness of the results, the methodology was validated for spinach. The method was shown to be efficient in the separation of the different forms of folates, with detection limits of 5, 30, 30, 7pg/mL and 5ng/mL for 5-methylTHF, 5-formylTHF, 10-formylTHF, THF and 10-methylTHF, respectively. In addition to good repeatability, the recovery rates for the different forms of vitamin varied between 96 and 102%. There was no significant difference in folate contents between spinach cultivated of traditional and organic ways and there was also no significant difference between the values obtained at different periods of the year. The values for 5-methylTHF and 5-formylTHF, on a dry weight base, varied from 42060,3 to 8504,8µg/g and 86,8 to 183,3µg/g, respectively. Cooking in water resulted in approximately 66% losses of 5-methylTHF and 47% of 5-formylTHF. The majority of these losses were due to leaching.

1. INTRODUÇÃO

Os folatos são compostos pertencentes ao grupo das vitaminas hidrossolúveis do complexo B. A história da descoberta dessa vitamina teve início em 1935, quando começaram a ser descritos uma série de distúrbios, decorrentes da deficiência nutricional de um composto pertencente à família do ácido pteroilglutâmico, cujo o protótipo do grupo era o ácido fólico (Devlin, 1987). São atualmente considerados nutricionalmente essenciais por serem precursores de uma grande variedade de derivados que atuam como coenzimas nas reações de transferência de carbono. Cada uma das diferentes formas de folatos que são sintetizadas a partir de reações de metilação e replicação celular no organismo humano, desempenha um papel específico no metabolismo intracelular (Hawkes e Villota, 1989). Essa vitamina está presente em várias fontes incluindo vegetais verdes escuros, leveduras, fígados, grãos, produtos à base de leite fermentado entre outros, sendo o 5-metiltetraidrofolato (5-metilTHF) o congênera majoritário.

As deficiências nutricionais estão se tornando uma das maiores causas de preocupação em relação ao bem estar da população mundial. No caso particular da deficiência de folatos, um dos maiores problemas que acometem o organismo humano são os defeitos causados na síntese de ácidos nucleicos. No grupo das vitaminas hidrossolúveis, os folatos parecem ser um dos componentes mais importantes fisiológica e bioquimicamente para as funções metabólicas normais no homem (Hawkes e Villota, 1989). Dentre os principais problemas causados pela deficiência de folatos estão as malformações congênitas, que têm desencadado campanhas de incentivo ao seu consumo em vários países, além de problemas cardíacos, associado ao acúmulo de homocisteína no sangue, doenças degenerativas, incluindo mal de Alzheimer, por dificultar a síntese de mielina e anemia megaloblástica (Parodi, 1997; Scott et al., 2000; Iwatani et al., 2003, Gregory, 1989, Konings et al., 2001, Cho et al., 2002, Yon e Hyun, 2003).

Em se tratando do teor de folatos, observa-se uma grande variação entre os valores apontados para um mesmo alimento. Particularmente para o espinafre, considerado uma das maiores fontes dessa vitamina, os dados apresentados na literatura variam de 95,5 a 1540µg/100g, conforme apresentado na Tabela 1. Esse fato pode ser explicado como resultado de variações edafoclimáticas, já que a síntese de folatos em vegetais é dependente de fatores como incidência de luz e presença de minerais no solo

(Scott et al, 2000), da variedade de espécies, além da própria metodologia empregada na sua determinação.

Nos últimos anos tem crescido a oferta de alimentos cultivados de formas alternativas, como a agricultura orgânica e a hidroponia. Entretanto, há pouquíssimos dados sobre a influência do tipo de cultivo nos níveis de nutrientes. Em relação aos folatos, não há nenhuma avaliação a respeito de possíveis alterações decorrentes da aplicação de diferentes técnicas de cultivo.

Tabela 1: Teores de folatos totais obtidos para espinafre em diversos estudos.

Espinafre Folatos totais (µg/100g)	Referências
302 ± 17	Iwatani et al. (2003)
261 ± 92	Yon et al. (2003)
95,5	Freisleben et al. (2003)
100	Konings et al. (2001)
193	Shrestha et al. (2000)
364	Lin e Lin (1999)
224	Aiso e Tamura (1998)
1540	Clifford et al. (1991)
150	McCance e Windson's (1991)
251	De Souza e Etenmemiler (1986)
300	Kirsch e Chen (1984)
284	Chen et al. (1983)
198	Mullin et al. (1982)

Os folatos apesar de estarem naturalmente presentes em muitos alimentos são sensíveis a parâmetros como temperatura, oxigênio e luz, entre outros. Leichter et al. (1978) investigaram o efeito do cozimento no conteúdo de folatos em vegetais e observaram que a água de cozimento, em geral, apresentava maior quantidade de folatos do que o próprio vegetal cozido. Um balanço de massa realizado antes e após o processo de cozimento indicou que a maior perda da vitamina ocorre devido ao processo de lixiviação, quando comparada à destruição efetiva da vitamina. Avaliando a etapa do

processo de branqueamento, no teor da mesma vitamina em espinafre, Chen et al. (1983) constataram perdas em torno de 33%, também devido a lixiviação. Klein et al. (1979) reportaram uma retenção de 78 a 100% de folatos totais avaliados em espinafre e grãos submetidos ao cozimento em água.

Desta forma, foram objetivos desse trabalho a determinação e comparação dos teores de folatos em espinafres cultivados em sistema tradicional e orgânico, verificação das diferentes épocas de plantio no teor da mesma e avaliação da estabilidade da vitamina após o cozimento em água.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Produtos avaliados

2.1.1. Influência do tipo de cultivo

Para a avaliação da influência do tipo de cultivo nos teores de folatos foram adquiridos cinco diferentes lotes de espinafre (*Spinacea oleracea*) cultivados de forma tradicional e de forma orgânica. Os lotes foram diferenciados pela data de colheita, sendo cada lote representado por um maço de espinafre, que foi finamente picado e homogeneizado. Apenas as folhas foram utilizadas. Todas as determinações foram feitas em duplicatas imediatamente após a aquisição do material.

2.1.2. Influência da época de plantio

Para o estudo da influência da época de cultivo nos teores de folatos cinco diferentes lotes de espinafre, procedentes de Campinas no período de setembro a novembro de 2002 e outros cinco diferentes lotes, produzidos nos meses de maio a julho de 2003 foram analisados, para a avaliação da influência do período de plantio no teor de folatos naturalmente presentes em espinafre. Os lotes mais uma vez foram diferenciados pela data de colheita, sendo cada um, representado por um maço de espinafre. As folhas foram retiradas, picadas e homogeneizadas antes da retirada da amostra para análise.

2.1.3. Influência do cozimento em água

Para a determinação da influência do cozimento em água na estabilidade dos folatos cinco diferentes lotes de espinafre foram adquiridos em mercados da cidade de Campinas-SP, com datas de colheita diferentes. Cada lote foi composto por um maço de espinafre. As folhas foram separadas, picadas. Dividiu-se o lote em duas porções, uma para a determinação do material cru e outra no cozido.

Para os ensaios de cozimento, pesou-se 100,0g de espinafre, adicionou-se 1,0L de água e cozinhou-se em fogo médio por cinco minutos após ebulição. Ao final do cozimento, imediatamente as folhas foram escorridas. Tanto as folhas como a água de cozimento foram imediatamente esfriadas até a temperatura ambiente, para posterior análise. O processo de cozimento e as determinações foram realizados em duplicatas, para cada lote. O cálculo da porcentagem de perda pelo cozimento foi feita através da diferença, em base seca, do conteúdo de folatos no material cru e cozido.

2.2. Determinação de umidade

Utilizou-se o método por secagem em estufa (Nova Ética, 400/3ND, N° série 0766/00) a temperatura de 105°C até peso constante (aproximadamente 3h). As determinações foram feitas em triplicatas.

2.3. Determinação de folatos

Para a análise dos folatos em espinafre, seguida pelos estudos de estabilidade após cozimento, efeito de cultivo e clima, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Catharino et al. (2002), adaptada à matriz.

Para a extração tomou-se 10,0g de espinafre, após homogeneização total da amostra. Os folatos foram extraídos com 50,0mL de tampão fosfato, composto por Na_2HPO_4 (0,25mol/L)/ KH_2PO_4 (0,37mol/L), em homogeneizador tipo Turatec. Retirou-se uma alíquota de 9,0mL do extrato e adicionou-se 500 μL de ácido tricloroacético (TCA), completando-se o volume final com tampão fosfato (balão volumétrico de 10,0mL). Seguiram-se então as etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a outra

em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado, imediatamente, no cromatógrafo a líquido, com um volume de injeção de 100µL.

Os folatos foram separados em sistema de eluição por gradiente, iniciando com 100% de solução aquosa de ácido acético (2%), a pH 2,8, chegando em 25 minutos a 76% de solução de ácido acético e 24% de acetonitrila, mantendo-se essa proporção até 30.0 minutos, com vazão de 0,5mL/min. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 15 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de fluorescência e arranjo de diodos (DAD). Para THF, 5-metilTHF, 5-formilTHF utilizou-se o comprimento de onda de leitura (λ) a λ excitação de 290nm e λ emissão de 360nm. Para o 10-formilAF utilizou-se o mesmo λ excitação e o λ emissão de 445nm. Já para o 10-metilAF utilizou-se o λ de 290nm, em DAD. A identificação das diferentes formas da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção e fluorescência, obtidos. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação foi feita por padronização externa, através das curvas analíticas. Para 5-metilTHF as concentrações foram de 30, 80, 160, 240, 330, 650, 1000µg/100mL, já para 5-formilTHF de 5, 15, 30, 45, 60µg/100mL, sendo cada ponto, para os dois casos, representado pela média de três determinações.

2.3.1. Reagentes

Os padrões de tetraidrofolato (THF), 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-metilTHF), 10-metil- ácido-fólico (10-metilAF), 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-formilTHF), 10- formil-ácido-fólico (10-formilAF) foram adquiridos do Laboratório Dr. Schircks (Jona, Suíça). A acetonitrila grau cromatográfico, o ácido acético e o hidróxido de potássio, grau analítico foram adquiridos da Merck, Brasil. O ácido tricloroacético, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ grau analítico, foram adquiridos da Synth, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e FHLP 04700 Millipore), com poros de 0,45µm de diâmetro.

2.3.2. Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático com capacidade de 1 a 100µL, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD – UV-visível) e de fluorescência, dispostos em sequência. O sistema é controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu o melhor tratamento dos dados. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 250X4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) foi utilizada para o processo cromatográfico, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5µm, 10X4,6mm d.i (Varian).

2.4. Validação da metodologia

Testes de recuperação e repetibilidade foram realizados com as amostras aqui analisadas, já que a metodologia aplicada foi desenvolvida para outros tipos de alimentos. Limites de detecção e quantificação também foram determinados para essa nova matriz.

2.4.1. Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se testes de recuperação de padrões adicionados ao espinafre, em dois níveis diferentes de concentração. Esses valores foram escolhidos aleatoriamente. Para as análises foram utilizados 10,0g de espinafre.

Para essas determinações, analisou-se inicialmente, os teores de folatos naturalmente presentes em espinafre, através da média de 10 análises. Posteriormente, adicionou-se quantidades conhecidas dos folatos, seguindo-se, então, a metodologia. Para o cálculo da recuperação, de acordo com Rodriguez et al. (1995), utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração amostra})}{\text{Concentração adicionada}} \times 100\%$$

2.4.2. Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de dez determinações, nos níveis de concentração de folatos encontrados nas matrizes. A repetibilidade foi calculada de acordo com Calcutt e Boddy (1983) através da equação:

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

r = repetibilidade

sr = estimativa do desvio padrão

t = de Student

2.4.3. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção foi estimado por diluições sucessivas dos padrões de concentrações conhecidas das diferentes formas da vitamina, até a determinação da menor quantidade detectável para cada uma delas como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (Calcutt e Boddy, 1983).

2.5. Análise Estatística

Com a finalidade de se definir se existia ou não, diferença significativa entre os valores obtidos, para o teor de folatos encontrados em espinafres cultivados de forma orgânica e tradicional e, entre os diferentes lotes do mesmo vegetal analisados em diferentes épocas do ano, realizou-se teste t, utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 2.01).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação da metodologia

As taxas de recuperação dos padrões de folatos obtidas estão apresentadas na Tabela 2. Observa-se que os valores variaram de 96 a 102% indicando uma boa eficiência do processo de extração das diferentes formas da vitamina.

A Tabela 3 apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre dez determinações, em duplicata, de 5-metilTHF e 5-formilTHF, as únicas formas de folatos

encontradas nas amostras analisadas. Esperava-se que os valores fornecidos por determinações em duplicata diferissem dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada. Observou-se que a maior diferença entre os valores obtidos nas dez determinações, são menores que o valor de “r” calculado, comprovando a boa repetibilidade do método aplicado para as determinações em espinafre.

Os limites de detecção encontrados foram de 5, 30, 30, 7pg/mL e 5ng/mL para 5-metilTHF, 5-formilTHF, 10-formilTHF, THF e 10-metilTHF, respectivamente. Considerou-se o limite de quantificação duas vezes o limite de detecção, sendo portanto, 10, 60, 60, 14pg/mL e 10ng/mL os valores para as mesmas formas de folatos.

Tabela 2: Recuperação dos padrões de folatos adicionados a amostras de espinafre.

Folatos	Nível I	Recuperação (%)	Nível II	Recuperação (%)
5-metilTHF	0,36µg/mL	102	0,18µg/mL	99
5-formilTHF	0,20µg/mL	99	0,10µg/mL	96
10-metilAF	0,10µg/mL	96	0,05µg/mL	97
10-formilAF	0,16µg/mL	97	0,08µg/mL	97
THF	0,20µg/mL	98	0,10µg/mL	96

Os resultados são médias de cinco determinações.

Tabela 3: Repetibilidade de em espinafre 5-metilTHF e 5-formilTHF.

Teor de 5-metilTHF (µg/100g)	Repetibilidade (r)	Teor de 5-formilTHF (µg/100g)	Repetibilidade (r)
240,79	2,99	6,77	2,26
240,94		6,42	
241,82		6,07	
241,37		6,40	
242,07		6,43	
240,63		6,19	
241,87		6,29	
240,45		6,47	

241,68		5,88	
240,94		5,68	
241,3 ± 0,6 0,2% *		6,3 ± 0,3 4,7% *	

Limite de confiança de 95% (t= 2,78)

* Média dos valores ± estimativa do desvio padrão,%CV

3.2. Etapa analítica

Apenas duas formas da vitamina foram detectadas e identificadas, sendo o tempo de retenção para 5-metilTHF e para 5-formilTHF de aproximadamente 20,5 e 22,6 minutos, respectivamente, conforme apresentado na Figura 1, onde é possível observar-se o perfil cromatográfico do extrato de espinafre e dos padrões de folatos. Konings et al. (2001) encontraram também o 10-formilAF, além das formas de folatos encontradas nesse trabalho, para amostras de espinafre obtidas nos Países Baixos.

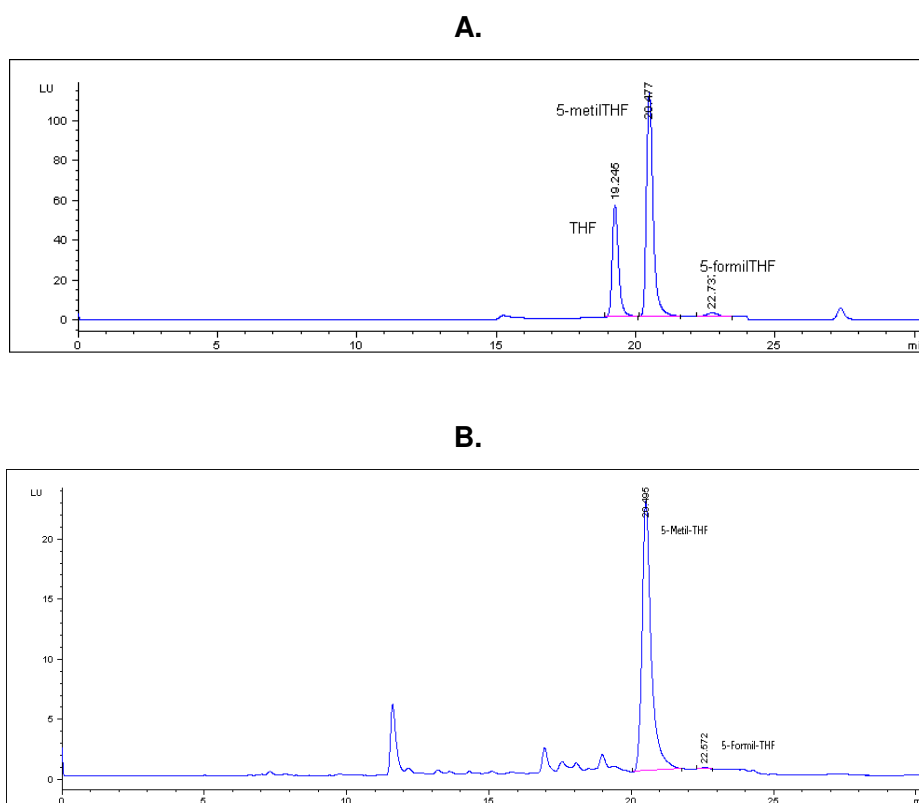


Figura 1: Perfil cromatográfico dos padrões de folatos (A) e do extrato de espinafre (B). Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 250X4,6mm. Fase móvel: 100% de solução aquosa de ácido acético (2%)

no início da corrida, chegando em 25 minutos a 76% de solução de ácido acético e 24% de acetonitrila. Vazão de 0,5mL/min. Detecção por fluorescência (λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} .360nm).

A curva analítica traçada por padronização externa apresentou boa linearidade na faixa de concentração de 30-1000 μ g/100mL e 5-60 μ g/100mL, para 5-metilTHF e 5-formil-THF, com coeficientes de correlação de 0,9997 e 0,9996, respectivamente (Figura 2).

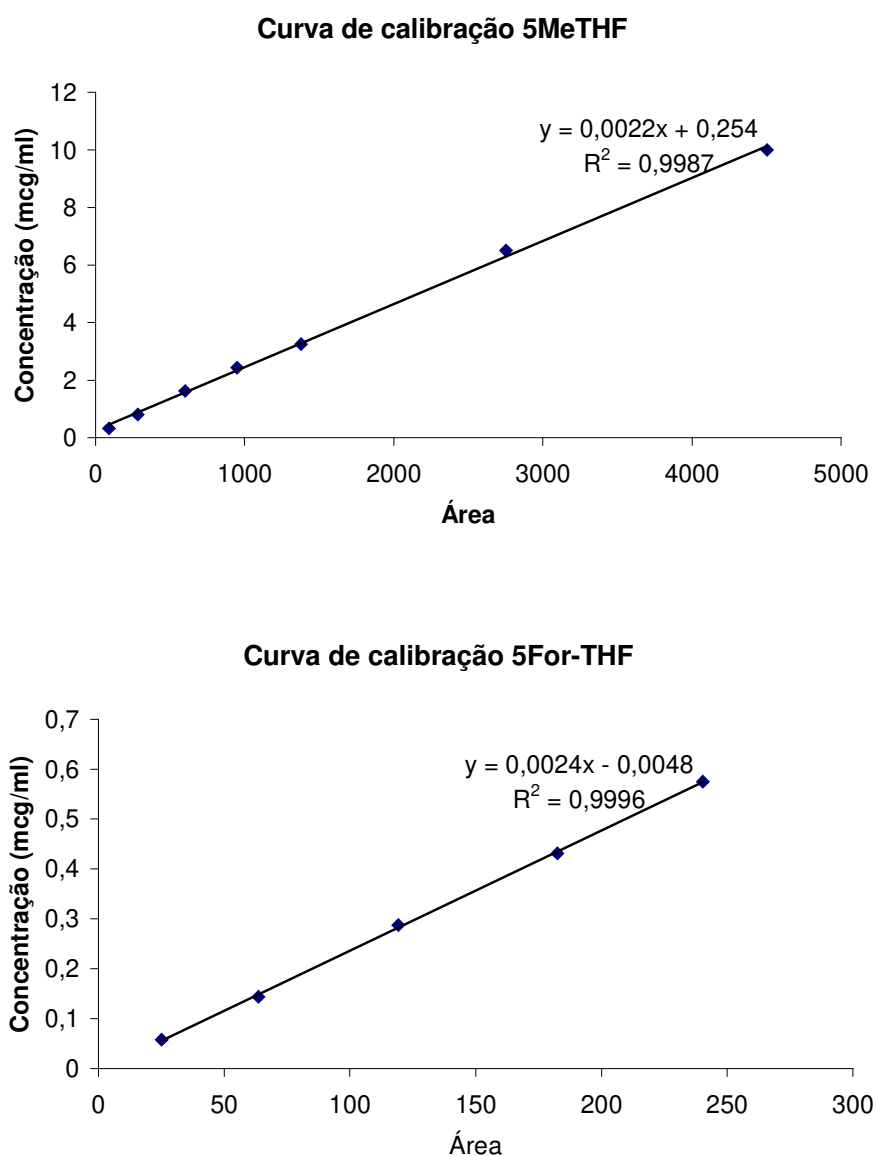


Figura 2: **Curvas de calibração de 5-metilTHF e 5-formilTHF.**

3.2.1. Influência do tipo de cultivo

Para a determinação dos teores da vitamina em espinafres cultivados nos dois sistemas (tradicional e orgânico) foram avaliados cinco diferentes lotes de um mesmo produtor e os dados referentes aos teores de 5-metilTHF e 5-formilTHF se encontram na Tabela 4. O 5-metilTHF foi a forma predominante de folato encontrada, tanto no espinafre cultivado de forma tradicional, como no orgânico, representando, em média, 99% do teor de folatos totais. Observa-se que para os diferentes lotes de espinafre cultivados de forma tradicional o teor de 5-metilTHF variou de 386,0 a 550,4µg/100g, já para 5-formilTHF os valores ficaram entre 4,0 e 6,3µg/100g. No caso dos lotes de espinafre orgânico, os valores para essas mesmas formas da vitamina também oscilaram entre 295,3 e 599,9µg/100g e 5,0 a 7,7µg/100g, respectivamente. Observou-se diferença significativa ($p<0,05$) nos teores de folatos entre os lotes, cultivados pelas duas formas, porém, entre os valores médios obtidos para os dois tipos de cultivo não houve diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 4. Teores de folatos em espinafre cultivado de forma tradicional e orgânica

Cultivo/ Lote	Teor de 5-metilTHF		Teor de 5-formilTHF	
	(µg/100g)		(µg/100g)	
	M ± DP	%CV	M ± DP	%CV
1	550,4 ± 4,5 a	0,8	6,3 ± 0,6 a	9,5
2	511,5 ± 8,6 b	1,7	6,1 ± 0,5 a	8,2
Tradicional 3	386,0 ± 7,3 c	1,9	4,3 ± 0,3 b	7,0
4	520,3 ± 5,6 a	1,1	4,0 ± 0,5 b	12,5
5	397,8 ± 6,9 c	1,7	5,8 ± 0,4 a	6,9
Média dos lotes	473,2 ± 75,7	15,9	5,3 ± 1,1	20,7
1	599,9 ± 4,5 a	0,8	7,7 ± 0,5 a	6,5
2	295,3 ± 2,9 c	1,0	6,9 ± 0,5 a	7,3
Orgânico 3	558,9 ± 6,9 b	1,2	7,2 ± 0,4 a	5,6
4	302,7 ± 7,4 c	2,4	5,9 ± 0,2 b	3,4
5	590,4 ± 4,1 a	0,7	5,0 ± 0,2 b	4,0

Média dos lotes	469,4 ± 156,3 33,3	6,5 ± 1,1 16,9
-----------------	--------------------	----------------

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

***letras iguais na mesma coluna, para o mesmo tipo de cultivo, significa não haver diferença significativa (p>0,05).

3.2.2. Influência da época de plantio

Para a avaliação da influência da época de plantio nos teores de folatos presentes, avaliou-se cinco diferentes lotes de um período de temperaturas tradicionalmente mais altas (setembro-novembro/2002) e de outro de temperaturas mais baixas (maio-julho/2003). Os resultados mostraram que os teores de 5-metil-THF variaram de 225,8 a 527,3µg/100g no período de setembro a novembro e de 386,0m a 550,4 no período de maio a julho, enquanto os teores de 5-formil-THF ficaram entre 4,6 e 7,8µg/100g e 4,0 e 6,3 µg/100g, nos mesmos períodos avaliados. Os valores estão apresentados na Tabela 5. A análise estatística dos dados mostrou não haver diferença significativa entre os valores obtidos para as diferentes estações do ano avaliadas (p>0.05), entretanto, entre lotes foi verificada diferença significativa.

Tabela 5: **Teores de folatos em espinafres cultivados em diferentes épocas do ano.**

Lote/Período	Setembro – Novembro	
	2002	
	5-metilTHF (µg/100g) M ± DP %CV	5-formilTHF (µg/100g) M ± DP %CV
Espinafre 1	527,3 ± 9,5 b 1,8	7,8 ± 0,5 a 6,4
Espinafre 2	485,6 ± 2,9 a 0,6	7,5 ± 0,3 a 4,0
Espinafre 3	274,4 ± 3,8 a 1,4	5,1 ± 0,4 a 7,8
Espinafre 4	225,8 ± 2,3 a 1,0	4,6 ± 0,2 a 4,4
Espinafre 5	255,8 ± 10,9 a 4,3	9,9 ± 0,5 a 5,1
Média dos lotes	353,8 ± 141,2 40,0	7,0 ± 2,2 31,4
Lote/Período	Maio – Junho	
	2003	

	5-metilTHF (µg/100g) M ± DP %CV	5-formilTHF (µg/100g) M ± DP %CV
Espinafre 1	550,4 ± 4,5 b 0,8	6,3 ± 0,6 a 9,5
Espinafre 2	511,5 ± 8,6 a 1,7	6,1 ± 0,5 a 8,2
Espinafre 3	386,0 ± 7,3 a 1,9	4,3 ± 0,3 a 7,0
Espinafre 4	520,3 ± 5,6 a 1,1	4,0 ± 0,5 b 12,5
Espinafre 5	397,8 ± 6,9 a 1,7	5,8 ± 0,4 a 6,9
Média dos lotes	473,2 ± 75,7 15,9	5,3 ± 1,1 20,7

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

***letras iguais na mesma coluna, para o mesmo tipo de cultivo, significa não haver diferença significativa (p>0,05).

3.2.3. Influência do cozimento em água

Para o estudo do efeito de cozimento, em relação ao teor de folatos determinou-se, inicialmente, a umidade (%) referente a cada lote analisado no trabalho. Na Tabela 6 encontram-se os valores obtidos nessa determinação. Para os lotes de espinafre *in natura* a umidade média foi 94,4%, enquanto que para o vegetal cozido o valor obtido foi 92,9%.

Tabela 6: **Determinação da umidade das amostras de espinafre *in natura* e cozidas.**

Espinafre/lotes	Umidade (%)	
	M ± DP	%CV
1	93,8 ± 0,3	0,3
2	94,2 ± 0,1	0,1
<i>In natura</i> 3	94,7 ± 0,4	0,4
4	94,7 ± 0,1	0,1
5	94,6 ± 0,1	0,1
Média dos lotes	94,4 ± 0,4	0,4
1	92,2 ± 0,3	0,3
2	92,5 ± 0,5	0,5
Cozido 3	93,2 ± 0,4	0,4

4	93,3 ± 0,3	0,3
5	93,2 ± 0,4	0,4
Média dos lotes	92,9 ± 0,5	0,5

M ± DP – média dos valores e estimativa do desvio padrão de determinações em triplicata.

%CV – coeficiente de variação.

A Tabela 7 apresenta os teores de folatos determinados, em cinco diferentes lotes, de espinafre cru e cozido, bem como a concentração das diferentes formas da vitamina na água de cozimento. Para essas amostras apenas 5-metilTHF e 5-formilTHF foram detectados e constatou-se que aproximadamente 58% do teor de 5-metilTHF e 39% de 5-formil-THF migraram para a água de cocção, sendo parte (aproximadamente 25%) dessas duas formas da vitamina, provavelmente, degradada durante esse processamento caseiro. Essa constatação corrobora com as afirmações de Leichter et al. (1978) e Chen et al. (1983) que, também, verificaram que a maior perda da vitamina se deve a lixiviação.

Tabela 7: Teores de folatos em espinafre *in natura*, cozido e na água de cozimento.

Espinafre/ Folatos	<i>In natura</i>		Cozido		Água de Cozimento	
	M ± DP	%CV	M ± DP	%CV	M ± DP	%CV
5-MetilTHF (µg/100g)						
1	527,3 ± 9,5	1,8	117,4 ± 4,1	3,5	300,3 ± 4,9	1,6
2	485,6 ± 12,9	2,7	95,5 ± 11,5	12,0	320,6 ± 2,9	0,9
3	274,4 ± 3,8	1,4	83,5 ± 2,4	2,9	148,2 ± 2,7	1,8
4	225,8 ± 7,3	3,2	77,0 ± 4,8	6,2	126,8 ± 5,9	4,7
5	255,8 ± 10,9	4,3	64,5 ± 3,7	5,7	130,1 ± 2,2	1,7
Média dos valores	353,8 ± 141,2	40,0	87,6 ± 20,1	22,9	205,2 ± 96,7	7,1
5- FormilTHF						

($\mu\text{g}/100\text{g}$)					
1	7,8 \pm 0,5	6,4	3,2 \pm 0,2	6,3	3,5 \pm 0,5 14,3
2	7,5 \pm 0,3	4,0	3,6 \pm 0,3	8,3	2,4 \pm 0,1 4,2
3	5,1 \pm 0,4	7,8	2,2 \pm 0,1	4,6	1,7 \pm 0,1 5,9
4	4,6 \pm 0,2	4,4	2,1 \pm 0,1	4,8	1,5 \pm 0,2 13,3
5	9,9 \pm 0,5	5,1	4,0 \pm 0,4	10,0	4,6 \pm 0,1 2,2
Média dos valores	7,0 \pm 2,2	31,4	3,0 \pm 0,8	26,7	2,7 \pm 1,3 48,1

* Valores são médias de determinações em duplicatas,

** M \pm DP %CV : média dos valores \pm estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

Na Tabela 8 estão os valores obtidos para os mesmos lotes, porém, em base seca, antes e após o cozimento, além da porcentagem de perda da vitamina. Observa-se que os valores para 5-metilTHF variaram de 4260,3 a 8504,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e de 948,5 a 1505,1 $\mu\text{g}/100\text{g}$, para espinafre cru e cozido, respectivamente. Já para o 5-formilTHF os teores ficaram entre 86,8 e 183,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e entre 31,3 e 51,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$, para as mesma amostras. Observou-se também uma grande variação entre os lotes, tanto para 5-metilTHF quanto para 5-formilTHF, que provavelmente se devem às diferentes condições edafoclimáticas ocorridas durante o plantio, já que a síntese de folatos pelos vegetais é bastante influenciada por fatores como luz e composição do solo. Quanto a porcentagem de perda das diferentes formas da vitamina, verificou-se que para 5-metilTHF elas foram de aproximadamente 80% e para 5-formilTHF 66%, o que confirma a afirmação de alguns autores (Hawkes e Villota, 1989) de que o 5-formilTHF seja mais estável do que o 5-metilTHF. Os valores obtidos neste trabalho foram superiores aos declarados por Chen et al. (1983) que observaram perda de 33% no teor de folatos totais, utilizando um método microbiológico, após o cozimento de espinafre em água.

Esses dados são muito importantes e indicam a estabilidade dessa vitamina quando o espinafre é consumido após cozimento em água, sua forma mais comum de ingestão, além de colaborar com pesquisas realizadas na área de saúde, que relacionam o consumo de determinados tipos de alimentos pela população, com a diminuição ou aumento de incidência de doenças carenciais ou crônicas.

Tabela 8: Teores de folatos em cinco diferentes lotes de espinafre *in natura* e cozido, em base seca e porcentagem de perda.

Espinafre/Folato	<i>In natura</i>		Cozido		% Perda
	M ± DP	%CV	M ± DP	%CV	
5-MetilTHF (µg/100g)					
1	8504,8 ± 153,2	1,8	1505,1 ± 52,6	3,5	82,3
2	8372,4 ± 222,4	2,7	1273,3 ± 153,3	12,0	84,8
3	5177,3 ± 71,7	1,4	1227,9 ± 35,3	2,9	76,3
4	4260,3 ± 137,7	3,2	1149,2 ± 71,6	5,8	73,0
5	4737,0 ± 184,8	3,9	948,5 ± 54,4	6,2	79,9
Média dos valores	6210,4 ± 2060,3	33,2	1220,8 ± 201,8	16,5	79,3 ± 4,7 5,9
5- FormilTHF (µg/100g)					
1	125,8 ± 8,1	6,4	41,0 ± 2,6	6,3	67,4
2	129,3 ± 5,2	4,0	48,0 ± 4,0	8,3	62,9
3	96,2 ± 7,5	7,8	32,3 ± 1,5	4,6	66,4
4	86,8 ± 3,8	4,4	31,3 ± 1,5	4,8	63,9
5	183,3 ± 9,3	5,1	58,8 ± 5,9	10,0	67,9
Média dos valores	124,9 ± 37,8	30,3	42,3 ± 11,5	27,2	65,7 ± 2,2 3,3

* Valores são médias de determinações em duplicatas.

** M ± DP %CV : média dos valores ± estimativa do desvio padrão % coeficiente de variação.

4. CONCLUSÕES

Os ensaios realizados para a validação do método indicaram que o mesmo se mostrou bastante adequado para a determinação de folatos em espinafre.

A determinação do efeito de cozimento no teor da vitamina mostrou que para as duas formas de folatos avaliadas a maior parte da vitamina é perdida por lixiviação, indicando que outros métodos de cocção como vapor ou refogado possam preservar uma maior quantidade da vitamina. Para evitar perdas de folatos, a água de cozimento também deve ser ingerida, já que dada a sua consistência o espinafre raramente é consumido sem cozimento.

Em relação à influência do tipo e época de cultivo, considerando-se não haver diferença significativa entre os lotes avaliados nos dois ensaios, pode-se concluir que o tipo de cultivo e a época de plantio não parecem causar diferença no teor de folatos presentes nas amostras de espinafres analisadas nesse trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISO, K.; TAMURA, T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation for α -amilase and protease treatments. J. Nutr. Sci. Vitam., v.44, p. 361-370, 1998.
- CAULCUTT, R., BODDY, R. Statistic for Analytical Chemists. 1st.Chapman and Hall, Londres. 1983. 253p.
- CATHARINO, R.R.; LIMA, J.A.; GODOY, H.T. Metodologia para a determinação simultânea de folatos, B2 e B12 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Analyt., n.2, p.29, 2002
- CHEN, T.S.; SONG, Y.O.; KIRSH, A.J., Effects of blanching, freezing and storage on folacin content of spinach. Nutr. Rep. Intern., v.28, p. 17-324, 1983.
- CHO, S., JOHNSON, G., SONG, W.O. Folate Content of Foods: Comparison Between Databases Compiled and After New FDA Fortification Requirements. J. of Food Comp. Anal., vol. 15, p.293-307, 2002.
- CLIFFORD, A.J. et al. Bioavailability of Food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. Vitamins, v. 22, p.445-453, 1991.
- DESOUZA, S.C.; EITENMILLER, R.R. Effects of processing and storage on the folate content of spinach and broccoli. J. Food Sci., v.51, p.526-628, 1986.

DEVLIN, T.M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 1ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998, 1007p.

FREISLEBEN, A.; SCHIEBERLE, P.; RYCHLIK, M. Comparison of folate quantification in foods by HPLC-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using HPLC-tandem mass spectrometry. Anal. Biochem., v.31, p. 247-255, 2003.

GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. Adv. Food Nutr. Research, v.3, p.1-101, 1989.

HAWKES, J.G.; VILLOTA, T.H. Folates in foods: Reactivity, Stability during processing and nutritional implications. Critical Rev. Food Sci. Nutr., v.28, n.6, p.439-539, 1989.

IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A.K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. J. Food Comp. Anal., v.16, p. 37-48, 2003.

KIRSCH, A.J.; CHEN, T.S. Comparison of conjugase treatment procedures in the microbiological assay of food folacin. J. Food Sci., v.49, p.94-98, 1984.

KLEIN, B.P. et al. Folacin content in microwave and conventionally cooked spinach. J. Food Sci., v.46, n.2, p.286-292, 1979.

KONINGS, E.J.M. et al. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. Am. J. Clin. Nutr., v.73, n.765-776, 2001.

LEICHTER, J.; SWITZER, V.P.; LANDYMORE, A.F. Effect of cooking on folate content of vegetables. Nutr. Rep. Int., v.18, n.4, p. 475-482, 1978.

LIN, B.F.; LIN, R.F. Effect of chinese stir-fry cooking on folate content of vegetables. J. Chinese Agric. Chem. Soc., v.37, p. 443-454, 1999.

McCANE, R.A.; WIDDOWSON, E.M. The Composition of foods. 5th Edn. Cambridge: The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1991, 462p.

MULLIN, W.J.; WOOD, D.F.; HOWSAM, S.G. Some factors affecting content of spinach, swiss chard, broccoli and brussels sprouts. Nutr. Rep. Int., v.26, n.1, p.7-11, 1982.

PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. Austr. J. Dairy Techn., vol.52, p.109-118, 1997.

RODRIGUEZ, L.C.; CAMPANA, A.M.G.; BARRERO, F.A.; LINARES, C.J.; CEBA, M.R. Validation of analytical instrumental method by standard addition methodology. Journal of AOAC International, v. 78, n. 2, p. 471-476, 1995.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. J. Sci. Food Agric., v.80, p. 795-824, 2000.

SHRESTHA, A.K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by trypsin and trypsin treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. Food Chem., v.71, p. 545-552, 2000.

YON, M.; HYUN, T.H. Folate content of foods commonly consumed in Korea measured after trypsin extraction. Nutr. Res., v.23, p.735-746, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

O método empregado na determinação de folatos se mostrou eficiente para a avaliação dessa vitamina em tomates e seus produtos processados, brócolis e espinafre.

Para as determinações em tomates foi possível verificar-se que tanto os cultivados de forma tradicional, quanto os orgânicos, apresentaram quantidades elevadas de 5-metilTHF o que os qualifica como excelentes fontes da vitamina. Os produtos processados também mostraram conter teores desejáveis da mesma forma de folato e, portanto, também podem ser considerados boas fontes da vitamina.

Para brócolis foram obtidos altos teores de 5-metilTHF e 5-formilTHF e pode-se concluir que esse vegetal, também, pode ser considerado uma ótima fonte da vitamina. A comparação entre os teores do mesmo vegetal, cultivado de forma orgânica e tradicional, indicou que o brócolis orgânico apresentou maior quantidade de 5-metilTHF, enquanto o teor de 5-formilTHF permaneceu praticamente inalterado. O processo de cozimento em água acarretou consideráveis perdas de folatos, sendo portanto, aconselhável o aproveitamento da água de cozimento.

Finalmente, constatou-se que os teores de folatos, nos lotes de espinafre analisados, também são bastante altos. Em relação à influência do tipo e época de cultivo não houve diferença significativa, entre os lotes avaliados nos dois ensaios. A determinação do teor da vitamina mostrou que para as duas formas de folatos encontradas (5-metilTHF e 5-formil-THF) a maior parte também é perdida por lixiviação, indicando que a água de cozimento também deveria ser aproveitada ou outras formas de preparo desse vegetal deveriam ser utilizadas.

Dessa forma, os vegetais cultivados na região de Campinas-SP apresentaram altos teores de folatos, superiores aos relatados por autores, que avaliaram os mesmos alimentos cultivados em outros países. Porém, o efeito de cozimento em água levou a grandes perdas da vitamina, tanto para brócolis quanto para espinafre, sendo recomendável, então que se aproveite a água de cozimento.

SUGESTÕES

Em relação ao tema folatos em vegetais sugere-se que sejam feitos trabalhos que controlem todas as variáveis envolvidas no cultivo de vegetais, realizado por diferentes técnicas, a fim de se avaliar o efeito das mesmas no teor das diferentes formas de folatos.

Estudos em relação à biodisponibilidade de folatos naturalmente presentes em alimentos seriam extremamente relevantes e, portanto, recomenda-se que sejam realizados.

Avaliações das perdas de folatos decorrentes de diferentes formas de cozimento, também seriam de grande valia, para o maior controle dos níveis de ingestão da vitamina pela população.