

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA
Departamento de Ciências de Alimentos

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO
E NICOTINAMIDA EM ALIMENTOS ENRIQUECIDOS.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por TANIA DA SILVEIRA AGOSTINI e aprovada pela Comissão Julgadora em 27.11.96.

Campinas, 27 de novembro de 1996

Profa. Dra. HELENA TEIXEIRA GODDY
Presidente da Banca

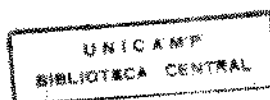


Tânia da Silveira Agostini
Mestre em Ciências de Alimentos

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

Campinas, 1996.



9307845

CIDADE	BC
CHAMADA:	
T/Unicamp	
Ag 75d	
V. E.	
TELEFONO BC	29426
PRUC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/02/97
N.º CPD	

CM - 00096667 - 1


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


Ag75d Agostini, Tânia da Silveira
Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆ ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos./ Tânia da Silveira Agostini. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.


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


1. Alimentos enriquecidos. 2. Vitamina B - Complexo.
3. Vitaminas - Análise. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência.
I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.


BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
(orientadora)


Prof. Dra. Myrna Sabino
(membro)


Prof. Dra. Marilene D. V. Pentead
(membro)


Dr. Paulo R. N. Carvalho
(membro)


Prof. Dra. Maria do Carmo Guedes
(membro)

Prof. Dr. João Bosco Faria
(membro)

Prof. Dra. Hillary Castle de Menezes
(membro)

Campinas, de novembro de 1996.

Ainda que eu falasse línguas,
as dos homens e as dos anjos,

...Ainda que eu tivesse o
conhecimento de todos os mistérios
e de toda a ciência;

...se não tivesse o amor,
eu nada seria.

1 Cor. 13,1-2

O tempo não para,
só a a saudade faz as
coisas pararem no tempo.

Mário Quintana

*Aos meus pais,
Mauro e Miralda,
pelo carinho de sempre
e pela compreensão desta nova etapa,*

*Ao Carlos,
pelo carinho e pelo companheirismo
no dia a dia,*

dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy pela orientação, pelo apoio e pela intensa disponibilidade, principalmente durante as correções finais do trabalho,

às auxiliares, às técnicas, às professoras, aos colegas e amigos do laboratório de Análise de Alimentos, pelos auxílios prestados e pela amizade,

às secretárias e aos funcionários das secretarias de Ciências de Alimentos e de Pós-Graduação, pela atenção dispensada,

aos Drs (as) Marilene D. V. Penteadó, Myrna Sabino, João Bosco Faria, Paulo R. N. Carvalho, Hillary C. de Menezes e Maria do Carmo Guedes pelas sugestões apresentadas na redação final desta tese,

ao Centro Nacional de Pesquisa na Agroindústria Tropical (CNPAT) - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela liberação das atividades funcionais, em colaboração com o desenvolvimento deste trabalho,

à CAPES, pelos auxílios concedidos,

ao Centro Universitário Poveda e a todos aqueles que me acompanharam e colaboraram, direta e indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho,

agradeço.

CONTEÚDO

RESUMO	i
SUMMARY	iii
INTRODUÇÃO	1
Referências bibliográficas	4
Capítulo 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1 Vitaminas	8
1.1.1 Vitaminas lipossolúveis	8
1.1.2 Vitaminas hidrossolúveis	9
1.1.2.1 Fontes alimentares	10
1.1.2.2 Aspectos bioquímicos	12
1.1.2.3 Necessidades nutricionais	16
1.1.2.4 Causas de deficiências	19
1.1.2.5 Biodisponibilidade e estabilidade	20
1.2 Adição de vitaminas nos alimentos	23
1.2.1 Aditivos	23
1.2.2 Enriquecimento	23
1.2.2.1 Natureza do enriquecimento	24
1.2.2.2 Legislação internacional	24
1.2.2.3 Legislação brasileira	26
1.2.2.4 Formas vitamínicas comerciais	27
1.2.2.5 Tendências	29
1.3 Métodos para determinação de vitaminas do complexo B	31
1.3.1 Métodos clássicos	31
1.3.2 Métodos oficiais	32
1.3.3 Métodos por CLAE	34
1.3.3.1 Extração	35
1.3.3.2 Limpeza do extrato	37
1.3.3.3 Etapa cromatográfica	38
1.3.3.4 Sistema de detecção	42

1.3.3.5 Identificação.....	44
1.3.3.6 Quantificação.....	45
1.3.4 Outros métodos	45
1.3.5 Validação da metodologia.....	45
1.4 Referências bibliográficas	52

Capítulo 2- AVALIAÇÃO DAS ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM BISCOITOS ENRIQUECIDOS.....	62
Resumo.....	62
Abstract.....	63
2.1 Introdução	63
2.2 Material e métodos	66
2.2.1 Material	66
2.2.2 Métodos	67
2.2.2.1 Avaliação dos parâmetros cromatográficos	67
2.2.2.2 Avaliação dos procedimentos de clarificação do extrato	68
2.2.2.3 Avaliação dos procedimentos de extração	69
2.2.2.4 Detecção e identificação	71
2.2.2.5 Avaliação dos procedimentos de quantificação	71
2.3 Resultados e discussão	72
2.3.1 Avaliação dos parâmetros cromatográficos	72
2.3.1.1 Fase móvel	72
2.3.1.2 Coluna	76
2.3.2 Avaliação dos procedimentos de clarificação do extrato	77
2.3.3 Avaliação dos procedimentos de extração	77
2.3.4 Avaliação dos procedimentos de quantificação	82
2.4 Conclusões	85
2.5 Referências bibliográficas	86

Capítulo 3- OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM ALIMENTOS ENRIQUECIDOS	88
Resumo.....	88
Abstract.....	89
3.1 Introdução	90
3.2 Material e métodos	92
3.2.1 Material	92
3.2.2 Reagentes	92
3.2.3 Equipamento	93
3.2.4 Métodos	93
3.2.4.1 Metodologia analítica.....	93
3.2.4.2 Validação da metodologia	94
3.3. Resultados e discussão	99
3.3.1. Etapas Analíticas.....	99
3.3.2 Validação do método.....	102
3.4 Conclusões	110
3.5 Referências bibliográficas	111
Capítulo 4- DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM BISCOITOS ENRIQUECIDOS	114
Resumo.....	114
Abstract.....	115
4.1 Introdução	116
4.2 Material e métodos	117
4.2.1 Material	117
4.2.2 Reagentes	118
4.2.3 Equipamento	118
4.2.4 Métodos	118
4.2.4.1 Extração	118

4.2.4.2 Cromatografia	119
4.2.4.3 Determinação de pH	119
4.3 Resultados e discussão	120
4.4 Conclusões	131
4.5 Referências bibliográficas	132
Capítulo 5- DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM ALIMENTOS ENRIQUECIDOS.....	134
Resumo.....	134
Abstract.....	135
5.1 Introdução	136
5.2 Material e métodos	138
5.2.1 Material	138
5.2.2 Reagentes	138
5.2.3 Equipamento	139
5.2.4 Métodos	139
5.2.4.1 Extração	139
5.2.4.2 Cromatografia	139
5.2.4.3 Determinação de pH	140
5.3 Resultados e discussão	140
5.4 Conclusões	152
5.5 Referências bibliográficas	152
Capítulo 6- APLICAÇÃO DA CLAE NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM LEITES E DERIVADOS LÁCTEOS ENRIQUECIDOS.....	154
Resumo.....	154
Abstract.....	155
6.1 Introdução	156
6.2 Material e métodos	157
6.2.1 Material	157
6.2.2 Reagentes	158

6.2.3 Equipamento	158
6.2.4 Métodos	159
6.2.4.1 Extração	159
6.2.4.2 Cromatografia	159
6.2.4.3 Determinação de pH	160
6.3 Resultados e discussão	160
6.4 Conclusões	167
6.5 Referências bibliográficas	168
CONCLUSÕES	169
SUGESTÕES	171
ANEXOS	172

RESUMO

O controle dos níveis de enriquecimento de alimentos, pela adição de vitaminas, tem sido dificultado, especialmente, pela falta de metodologias apropriadas. Visando suprir esta deficiência, foi desenvolvida e avaliada uma metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método desenvolvido foi aplicado na determinação dessas vitaminas em 50 diferentes tipos/marcas de alimentos enriquecidos, como biscoitos de maisena (marca comercial grafada com Z, registrada), de leite, maria, coco e recheados, farinhas de cereais, farinhas lácteas, flocos de milho, macarrões, bebidas lácteas aromatizadas, leite em pó e esterilizado, bebida dietética e um complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular.

As vantagens do método proposto, em relação aos métodos oficiais, são, além da determinação simultânea de 4 vitaminas (B₁, B₂, B₆ e PP, incluindo as duas formas desta última, ácido nicotínico e nicotinamida), simplicidade e versatilidade das etapas de extração e limpeza, utilização de reagentes com menores níveis de toxicidade, uso de detector UV, em substituição ao de fluorescência, eliminação de reações de derivação e rapidez.

A extração multivitamínica é feita com ácido sulfúrico diluído, através de vibração ultra-sônica. A precipitação do extrato com metanol, seguida de refrigeração, é satisfatória tanto na eliminação de interferentes, quanto na prevenção de precipitação na coluna cromatográfica. A eluição por gradiente é importante para a obtenção de boa resolução das vitaminas, sendo que todas as vitaminas são eluídas em 23 min de corrida. O tempo

necessário para o re-equilíbrio da coluna é de 20 min. A detecção é feita na região do ultravioleta e a quantificação é feita por curvas de padronização externa.

Os limites de detecção e recuperação, nos níveis médios de enriquecimento, foram, respectivamente, 0,04 µg/ml e 102% para a vitamina B₁, 0,03 µg/ml e 96% para a B₂, 0,08 µg/ml e 106% para a B₆, 0,10 µg/ml e 105% para a nicotinamida e 0,03 µg/ml e 81% para o ácido nicotínico. Os testes de repetibilidade, nos níveis de enriquecimento, apresentaram um coeficiente de variação médio inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Entre os alimentos enriquecidos analisados, todos os diferentes tipos de biscoitos, de 1 única marca, apresentaram apenas 30 % dos valores de vitamina B₂ descritos nas embalagens dos produtos; os flocos de milho, de 4 diferentes marcas, apresentaram menos de 30% dos níveis vitamínicos declarados; macarrões, de 1 única marca, não apresentaram nenhuma das vitaminas descritas nas embalagens do produto e o complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular apresentou níveis de B₁, B₂ e nicotinamida superiores a 300% dos valores declarados. Menores variações também foram observadas em alguns dos outros produtos analisados. Os resultados obtidos neste trabalho, além de demonstrarem as vantagens e aplicabilidade da metodologia desenvolvida, apontam para a necessidade de maior rigor no controle das taxas de enriquecimento destes alimentos.

SUMMARY

The control of enrichment levels in foods is difficult mainly due to the lack of appropriate analytical methodology. A new method for the simultaneous determination of nicotinamide, nicotinic acid, riboflavin, thiamin and pyridoxine in enriched Brazilian foods by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and evaluated. The new method was employed to determine the vitamin B group in a survey of fifty products, such as cornflour, milk, coconut and sandwich biscuits, cereal flour, lacteous flours, corn flakes, macaroni, flavored milk, whole and skim milk powder, acidified milk powder, sterilized whole milk, flavored diet drinks and flavored mix for milk-based diet drink.

In addition to the simultaneous determination of four vitamins (B_1 , B_2 , B_6 and two different forms of PP), the advantages of the method developed are: simplicity and improvement in the extraction and cleaning procedures, no use of toxic reagents, use of the UV detector instead of the fluorescent detector, elimination of derivatization reactions and speed in comparison with the official methods. The multivitamin extraction with sulfuric acid in an ultrasonic wave vibrator proved effective. The methanol solution provided partial purification of the extract and prevented precipitation on the analytical column. Nevertheless, a gradient elution was necessary in order to get good resolution of the compounds. As the amounts of vitamins in enriched foods are normally greater than usual, the detection can be made using a UV detector. Quantitative data were obtained using calibration curves constructed by plotting peak area versus concentration. Quantification limits of the method and recoveries, in average enrichment levels, were 0.04 $\mu\text{g/ml}$ and 102% for vitamin B_1 , 0.03 $\mu\text{g/ml}$ and 96% for B_2 , 0.08 $\mu\text{g/ml}$ and 106% for B_6 , 0.10 $\mu\text{g/ml}$ and 105% for nicotinamide and 0.03 $\mu\text{g/ml}$ and 81% for nicotinic acid, respectively. Repeated injections showed a relative standard deviation lower than 5% for

vitamin B₁, B₂ and nicotinamide, 10% for vitamin B₆ and 13% for nicotinic acid, respectively.

In some of the products analyzed the vitamin levels agreed with those printed on the package. Although some slight quantitative variations were found within biscuits, one sample had levels of riboflavin 35% lower than the value stated on the package. Of five different corn cereal brands, only one had the declared vitamin content, the others were 30% lower. No B-group vitamins were detected in one brand of enriched macaroni, except for the nicotinic acid naturally present in the flour. On the other hand, one flavored milk drink exhibited vitamins levels 200% higher than the amounts stated on the label and one milk drink mix had thiamin, riboflavin and nicotinamide levels 3 to 5 times greater than stated. These results suggest an absence of control of the amount of vitamins in enriched foods.

INTRODUÇÃO

O enriquecimento de alimentos, com vitaminas, tem sido uma prática comum em vários países como EUA [MAXWELL, 1990], Rússia [AUGUSTIN *et alii*, 1982], Canadá [RANUM, 1991], França [GASSIN, 1991], Suíça [WALTER, 1994] e Inglaterra [RICHARDSON, 1990]. O enriquecimento é feito com a finalidade de corrigir deficiências nutricionais de uma população, de obter um balanço calórico nutricional adequado, de suprir inferioridades nutricionais de produtos novos lançados no mercado e de atender aos padrões de identidade e regulamentos nutricionais já existentes.

Embora vários alimentos enriquecidos estejam sendo lançados nas prateleiras dos supermercados brasileiros, estes produtos não são dirigidos para aquela parcela da população que parece apresentar os maiores riscos nutricionais. O processo de enriquecimento tem sido parte de uma estratégia promocional de *marketing*, visando, principalmente, o aumento da comercialização dos produtos. O sucesso do programa é garantido pelo aceite e pelo consumo dos alimentos oferecidos. A estabilidade dos nutrientes, a segurança contra ingestões excessivas e o custo do produto acabado devem ser mantidos.

A legislação brasileira define como alimentos enriquecidos todos aqueles aos quais forem adicionados nutrientes, seja visando a reposição de perdas pelo processamento, seja suplementando o alimento com níveis nutricionais superiores ao seu conteúdo normal. Com relação ao complexo B, permite a adição das vitaminas B₁, B₂, B₆, fator PP, cobalamina e ácido fólico em alimentos que devem fornecer, na porção média diária ingerida, 60%, no mínimo, das recomendações para adultos. Permite, ainda, a adição de níveis superiores, em até 100%, para compensar eventuais perdas

durante o armazenamento, desde que o alimento apresente necessidade comprovada. A única proibição é com relação a adição de vitaminas em bebidas alcóolicas [ABIA, 1992].

Os critérios gerais para seleção da fonte alimentar, a ser enriquecida, incluem o consumo significativo e homogêneo do alimento pelas diversas camadas da população, sendo que o nutriente adicionado deve apresentar estabilidade e disponibilidade após o processamento e estocagem, sem, contudo, criar desbalanços nutricionais ou alterar a aparência e o aroma do produto acabado.

A farinha de trigo e os demais derivados de cereais são os alimentos tradicionalmente utilizados no processo de enriquecimento com vitaminas do complexo B. O trigo e o milho são as maiores fontes mundiais de calorias e proteínas, especialmente em países do terceiro mundo, fornecendo até 80% das calorias na Rússia, 55% no México e 67% na Índia [EL -DASH, 1994]. No Brasil, os cereais fornecem em torno de 40% das calorias consumidas, com exceção da região nordeste (28%), onde a farinha de mandioca também supre grande parte das necessidades calóricas [IBGE, 1974]. Os derivados de cereais são responsáveis por mais de 40% da ingestão de tiamina e aproximadamente 30% da ingestão de ácido nicotínico e riboflavina nos Estados Unidos. A maior parte destes nutrientes são provenientes do enriquecimento e fortificação: 31% da tiamina; 18% da riboflavina e 19% de ácido nicotínico [COOK e WELSH, 1987].

Embora uma grande diversidade de outros alimentos enriquecidos com vitaminas do complexo B estejam sendo lançados no Brasil, a adição indiscriminada de nutrientes deve ser desencorajada e as informações nos rótulos dos produtos não devem enfatizar ou distorcer a função de um simples alimento. Entretanto, o controle desses produtos tem sido dificultado pela falta de uma legislação específica, pela carência de laboratórios preparados para o desenvolvimento das análises e pela falta de metodologias analíticas adequadas.

A análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que se encontram, da presença de inúmeros interferentes, em função da complexidade da matriz, e pela exigência de cuidados especiais, decorrentes da baixa estabilidade desses nutrientes. Os maiores desafios, para determinação de vitaminas hidrossolúveis, incluem melhoramento nos procedimentos de extração e limpeza, desenvolvimento de métodos simultâneos para alimentos e validação dos métodos desenvolvidos [POLEZELLO e RIZZOLO, 1990, 1986; MACRAE, 1990].

A principal vantagem dos métodos da AOAC¹, geralmente, é a simplicidade dos equipamentos utilizados, entretanto, para a determinação de vitaminas, são demorados, minuciosos [HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991; FINGLAS e FAULKS, 1984] e utilizam reagentes nocivos, como o brometo de cianogênio, ou de difícil obtenção [RUSSEL e VANDERSLICE, 1992]. Além disso, a determinação da vitamina B₆ é feita apenas por método microbiológico. Recentemente, a literatura vem apresentando avanços nos métodos para determinação de vitaminas hidrossolúveis, através de técnicas promissoras, tais como CLAE² [Van SCHOONHOVEN *et alii*, 1994; MUNOZ *et alii*, 1994; CHASE *et alii*, 1993], ELISA³ [FINGLAS e MORGAN, 1994; ALCOOK *et alii*, 1990; LEE *et alii*, 1990] e eletroforese capilar [DINELLI e BONETTI, 1994; SOGA, 1994]. Entretanto, as duas últimas são técnicas muito recentes e sofisticadas para análise de rotina.

As vantagens no uso da CLAE, para determinação de vitaminas, incluem rapidez, alta sensibilidade e exatidão, mesmo para analitos presentes em quantidades baixas e em matrizes complexas, tais como alimentos [MACRAE, 1990], além de análises diretas sem derivação, determinação simultânea de vários compostos em uma análise única e resolução de isômeros [POLESELLO e RIZZOLO, 1986].

¹ *Association of Official Analytical Chemists*

² *Cromatografia líquida de alta eficiência*

³ *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Vários autores têm alcançado a determinação simultânea de várias vitaminas do complexo B em premix ou preparações farmacêuticas multivitamínicas [GENNARO, 1991; DONG *et alii*, 1988; KOTHARI e TAYLOR, 1982; LAM *et alii*, 1984; WILLS *et alii*, 1977]. Entretanto, a maior parte das determinações simultâneas em alimentos envolvem apenas 2 vitaminas do complexo B, como a B₁ e B₂ que são determinadas em alimentos variados [BARNA e DWORSCHÁK, 1994; LAVIGNE *et alii*, 1987; WIMALASIRI e WILLS, 1985; WILLS *et alii*, 1985; MAURO e WETZEL, 1984; AUGUSTIN, 1984; FELLMAN *et alii*, 1982; KAMMAN *et alii*, 1980] ou a B₂ e a piridoxina em formulações infantis [AYI *et alii*, 1986]. As vitaminas B₁, B₂ e ácido nicotínico foram determinadas simultaneamente em arroz [TOMA e TABEKHIA, 1979], macarrão vitaminado [MARINI *et alii*, 1988] e em alimentos variados [SKURRAY, 1981]. As vitaminas B₁, B₂ e piridoxina foram determinadas simultaneamente em derivados de cereais fortificados [WEHLING e WETZEL, 1984] e em alimentos medicinais [CHASE *et alii*, 1993; CHASE *et alii*, 1992].

Os objetivos deste trabalho foram, portanto, o desenvolvimento de uma metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, validação intralaboratorial da metodologia e sua aplicação na análise de alimentos enriquecidos com estas vitaminas.

Referências bibliográficas

- ABIA - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (1992). *Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos*. 5. rev. São Paulo: ABIA, v. 1A.
- ALCOOCK, S.C; FINGLAS, P. M. & MORGAN, M. R. A (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for pyridoxamine and its comparison with alternative analytical procedures. *Food and Agric. Immunol.*, 2 (4), 197-204.
- AUGUSTIN, J. (1984). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. *J. AOAC*, 67 (5), 1012-1015.
- AUGUSTIN, J.; TASSINARI, P. D.; FELLMAN, J. K. & COLE, C. L. (1982) B vitamin content of selected cereals and baked products. *Cereal Foods World*, 27 (4), 159-161.

- AYI, B. K.; YUHAS, D. A. & DEANGELIS, N. J. (1986). Simultaneous determination of vitamins B₂ (riboflavin) and B₆ (pyridoxine) in infant formula products by reversed phase liquid chromatography. *J. AOAC*, **69** (1), 56-59.
- BARNA, E. & DWORSCHÁK, E. (1994). Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by HPLC. *J Chrom. A*, **668**, 359-363.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O. & SOLIMAN, A. G. (1993). Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and pyridoxine in medical foods. *J. AOAC Int.* **75** (3), 561-565.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; EITENMILLER, R. R. & SOLIMAN, A. G. (1992). Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in infant formula. *J. AOAC Int.*, **75** (3), 561-565.
- COOK, D. A. & WELSH, S. O. (1987). The effect of enriched and fortified grain products on nutrient intake. *Cereal Foods World*, **32** (2), 191-196.
- DINELLI, G & BONETTI, A. (1994). Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-solubles vitamins and multi-vitamin integrators. *Electrophoresis*, **15** (8-9), 1147-1150.
- DONG, M. W.; LEPORE, J. & TAURUMOTO, T. (1988). Factors affecting the ion-pair chromatography of water soluble vitamins. *J. Chrom.*, **442**, 81-95.
- EL-DASH, A. (1994). Enriquecimento de cereais e derivados. In: *I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos*. ITAL-UNICAMP, Campinas, SP. p 47-48.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1974). *Metodologia Nacional do Estudo da despesa Familiar (ENDEF)*. Núcleo do Banco de Informações.
- FELLMAN, J. K.; ARTZ, W. E.; TASSINARI, P. D. & AUGUSTIN, J. (1982). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by HPLC. *J. Food Sci.*, **47**, 2048-2050.
- FINGLAS, P. M & MORGAN, M. R. A. (1994). Application of biospecific methods to the determination of B-group vitamins in food - a review. *Food Chem.*, **49**, 191-201.
- FINGLAS, P. M. & FAULKS, R. M. (1984). The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. *Food Chem.*, **15**, 37-44.
- GASSIN, A. L. (1991). Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. *Cah. Nutr. Diét.*, **XXVI** (1), 85-88.
- GENNARO, M.C. (1991). Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase ion-interaction reagent HPLC: application to multivitamin pharmaceuticals. *J. Chrom. Sci.*, **29**, 410-415.
- HIRAYAMA, S. & MARUYAMA, M. (1991). Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by HPLC. *J. Chrom.* **588**, 171-175.
- KAMMAN, J. F.; LABUZA, T. P. & WARTHESEN, J. J. (1980). Thiamin and riboflavin analysis by HPLC. *J. Food Sci.*, **45**, 1497-1504.
- KOTHARI, R. M., TAYLOR, M. W. (1982). Simultaneous separation of water-soluble vitamins and coenzymes by reversed-phase HPLC. *J. Chrom.*, **247**, 187-192.
- LAM, F.L.; HOLCOMB, I. J. & FUSARI, S.A. (1984). Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, ácido nicotínicomide, piridoxine, thiamin and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. *J. AOAC.*, **67** (5), 1007-1011.

- LAVIGNE, C.; ZEE, J. A.; SIMARD, R. E. & GOSSELIN, C. (1987). High performance liquid chromatographic-diode array determination of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in goats'milk. *J. Chrom.* **410**, 201-205.
- LEE, H. A.; MILLS, E. N. C.; FINGLAS, P. M. & MORGAN, M. R. A (1990). Rapid biospecific methods of vitamin analysis. *J. Micronut. Analysis*, **7**, 261-270.
- MACRAE, R. (1990). HPLC determination of vitamins. *J. Micronut. Anal.*, **7**, 247-260.
- MARINI, D.; SORRENTINO, M.; BALESTRIERI, F. & MAGRI, A. L. (1988). Determinazione di tiamina, riboflavina e ácido nicotínico in paste alimentari vitaminizzate. *Tec. Molitoria*, **39**, 1-7.
- MAURO, D. J. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using selective detection. *J. Chrom.*, **299**, 281-287.
- MAXWELL, D. P. E. (1990). Cost-control implications of nutrient fortification. *Prepared Food*, **Feb.**, 87-88.
- MUÑOZ, A.; ORTIZ, R. & MURCIA, M. A. (1994). Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and non dairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chem.*, **49**, 203-206.
- POLESELLO, A. & RIZZOLO, A. (1990). Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1985-1989). *J. Micronut. Anal.*, **8**, 105-158.
- POLESELLO, A. & RIZZOLO, A. (1986). Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 1 (a review 1981-1985). *J. Micronut. Anal.*, **2**, 153-187.
- RANUM, P. (1991). Cereal enrichment. In: *Handbook of Cereals Science and Technology*. Ed. Lowrenz, New York. 882p.
- RICHARDSON, D. P. (1990). Vitamin fortification and implications for health. *J. Micronut. Anal.*, **7**, 223-227.
- RUSSEL, L. F. & VANDERSLICE, J. T. (1992). Comments on the standard fluorometric determination of riboflavin in foods and biological tissues. *Food Chem.*, **43**, 79-82.
- Van SCHOONHOVEN, J.; SCHRIJVER, J.; BERG, H. & HAENEN, G. R. M. M. (1994). Reliable and sensitive HPLC method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B₆ in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1475-1480.
- SKURRAY, G. R. (1981). A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamin in foods. *Food Chem.* **7**, 77-80.
- SOGA, T. (1994). Simultaneous Analysis of water-solubles vitamins using capillary electrophoresis. *Hewlett-Packard Appl. Notes*, 12-5962-98126, Jun. 4p.
- TOMA, R. B. & TABEKHIA, M. M. (1979). HPLC analysis of B vitamins in rice and rice products. *J. Food Sci.*, **44** (1), 263-265.
- WALTER, P. (1994). Vitamin Requirements and enrichment of foods. *Food Chem.*, **49**, 113-117.
- WEHLING, R. L. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin and thiamin in fortified cereals products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1326-1331.
- WILLS, R. B. H.; SHAW, C. G. & DAY, W. R. (1977). Analysis of water-soluble vitamins by HPLC. *J. Chrom. Sci.*, **15**, 262-266.
- WILLS, R. B. H.; WIMALASIRI, P. & GREENFIELD, H. (1985). Comparative determination of thiamin and riboflavin in foods by HPLC and fluorometric methods. *J. Micronut. Anal.*, **1**, 23-29.

WIMALASIRI, P. & WILLS, R. B. H. (1985). Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. *J. Chrom.*, **318**, 412-416.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Vitaminas

Há cerca de uma centena de anos foi reconhecida a necessidade de pequenas quantidades de substâncias orgânicas específicas, cuja falta pode causar doenças tais como o escorbuto, o raquitismo, a xeroftalmia, a pelagra e o beriberi [BOBBIO e BOBBIO, 1989].

Estas substâncias essenciais, orgânicas e não energéticas, possuem composição química variada e são fornecidas em pequenas quantidades na dieta para, entre outras funções, a síntese de cofatores e coenzimas que participam de reações metabólicas diversas. São encontradas na natureza como tal ou sob a forma de precursores, pró-vitaminas, que são ingeridos com os alimentos [FRANCO, 1992; BELITZ e GROSCH, 1987; LEE, 1983].

A palavra vitamina, inicialmente designada como amina indispensável à vida, tem, hoje, apenas um significado funcional, dado a diversidade de constituição de cada uma.

A diferença na solubilidade das diferentes vitaminas levou a uma divisão genérica desses compostos em lipossolúveis e hidrossolúveis

1.1.1 Vitaminas lipossolúveis

São solúveis nos solventes orgânicos, facilmente oxidáveis e não possuem N na sua constituição. São elas: a vitamina A, anti-xeroftálmica; a vitamina D, anti-raquítica; a

vitamina E, anti-esterilidade e a vitamina K, anti-hemorrágica. As funções bioquímicas mais conhecidas destas vitaminas estão dispostas na **Tabela 1-1**.

Tabela 1-1 Principais formas ativas e funções das vitaminas lipossolúveis

Vitamina	Forma ativa	Função
A	11-cis retinal, ácido retinóico e retinol	mecanismo da visão e integridade epitelial
D	1,25-diidroxi-colecalciferol	metabolismo do Ca, Mg e P
E	α , β , γ , δ -tocoferol	proteção contra oxidação das membranas fosfolipídicas, fertilidade e gestação
K	2 metil- 1,4 naftoquinona	ativa em vários fatores sanguíneos

LEHNINGER *et alii* (1993); MACHLIN (1991).

As vitaminas lipossolúveis são encontradas principalmente no fígado, manteiga, ovos, peixes, derivados do leite e carnes em geral. As verduras e algumas frutas são fontes de carotenóides (pró-vitamina A) e de vitamina K. A vitamina E está amplamente distribuída entre os óleos vegetais [MACHLIN, 1991; LEE, 1983].

1.1.2 Vitaminas hidrossolúveis

Nesta categoria estão as vitaminas do complexo B e a vitamina C, cujas sinonímias mais comuns estão dispostas na **Tabela 1-2**. São solúveis em água e, portanto, não se armazenam com facilidade nos organismos animais [ROBINSON, 1991]. Possuem estrutura química diversificada, entretanto suas distribuições entre os alimentos são similares, o que explica porque a deficiência de vários fatores é mais frequentemente observada do que a deficiência de uma vitamina isolada. Geralmente atuam como coenzimas nos processos metabólicos [AURAND, 1987].

Tabela 1-2- Vitaminas hidrossolúveis reconhecidas e suas sinônimas mais comuns

Vitamina	Sinônimas
C	ácido ascórbico; anti-escorbútica
B ₁	tiamina; anti-neurítica
B ₂	riboflavina, lactoflavina; do crescimento
B ₆	piridoxina, piridoxal e piridoxamina; anti-acrodínica
PP	ácido nicotínico ou niacina e nicotinamida ou niacinamida; preventiva da pelagra
B ₅	ácido pantotênico; anti-pelagrosa (galinha)
H	biotina; anti-seborréico
M	ácido fólico, folacina; anti-anêmica
B ₁₂	cobalamina, cianocobalamina; anti-anemia perniciosa

Fonte: ROBINSON, 1991.

1.1.2.1 Fontes alimentares

As vitaminas do complexo B são amplamente encontradas no fígado e nas leveduras, sendo que os cereais integrais, as leguminosas, as castanhas, os ovos, o leite, as vísceras, a carne de porco e os peixes também constituem importantes fontes [OHTA *et alii*, 1993; BOCK, 1991; DAWSON *et alii*, 1988; LEE, 1983; RANUM *et alii*, 1982]. As verduras são ricas em ácido fólico e, em conjunto com as frutas, constituem as principais fontes de vitamina C [MACHLIN, 1991; EITENMILLER *et alii*, 1977]. Os teores das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, em vários alimentos, estão dispostos na **Tabela 1-3**.

Tabela 1-3 Teores de vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP (mg/100g) em alimentos crus

FONTE ALIMENTAR	B ₁ [*]	B ₂ [*]	B ₆ ^{**}	PP [*]
Levedura em pó	14,5	4,61	4,4 ^{***}	57,0
Fígado de vaca	0,24	2,04	0,9 ^{***}	16,7
Farinha de trigo integral	0,66	0,15	0,34	4,0
Farinha de trigo branca	0,06	0,04	0,06	0,8
Arroz integral	0,36	0,06	0,24	5,2
Arroz polido	0,09	0,04	0,08	0,8
Ervilha seca	0,91	0,18	0,16	5,6
Feijão branco seco	0,60	0,30	0,56	0,7
Soja	0,66	0,22	0,81	2,2
Amêndoa	0,15	0,50	1,10	1,8
Castanha do par	1,09	0,12	—	7,7
Carne de porco magra	0,95	0,23	0,33	5,1
Carne de vaca magra	0,23	0,26	0,33	0,4
Carne de frango	0,08	0,16	0,68	9,0
Atum	0,10	0,06	0,43	10,0
Ovos inteiros	0,10	0,30	0,11	0,1
Leite de vaca integral cru	0,04	0,65	0,04	0,2
Leite de vaca integral pasteurizado	0,01	0,19	—	0,2
Brócolis	0,12	0,11	0,20	0,4
Espinafre	0,10	0,16	0,28	2,3
Repolho	0,11	0,06	0,16	0,4
Laranja	0,09	0,03	0,06	0,2
Abacate	0,07	0,10	0,42	0,8
Banana	0,09	0,10	0,51	0,8

Fonte: ^{*}FRANCO (1992); ^{**}LEKLEM (1991); ^{***}BELITZ e GROSCH, 1987.

1.1.2.2 Aspectos bioquímicos

As vitaminas hidrossolúveis são de constituição química variada e apresentam funções biológicas igualmente diversificadas (**Tabela 1-4**). As vitaminas do complexo B possuem N em sua molécula e geralmente atuam como coenzimas reguladoras dos processos energéticos (B₁, B₂, B₅, PP e biotina), do metabolismo protéico (B₆) e da síntese de ácidos nucléicos (B₁₂ e ácido fólico). A vitamina C desempenha importante papel na manutenção da integridade intercelular [LEHNINGER *et alii*, 1993].

Tabela 1-4 Principais formas ativas e funções das vitaminas hidrossolúveis

Vitamina	Forma ativa	Função
C	ácido ascórbico e deidroascórbico	sistemas de oxiredução
Tiamina	TPP (tiamina pirofosfato)	transferência de aldeídos
Riboflavina	FMN e FAD	transferência de hidrogênio
Ácido nicotínico	NAD ⁺ e NADP ⁺	transferência de hidrogênio
Ácido pantotênico	coenzima A	transferência de grupos acil
Piridoxina	PLP (fosfato de piridoxal)	transferência de grupos amina
Biotina	biocitina	transferência de CO ₂
Ácido fólico	tetraidrofolato	transferência de formil no metabolismo do C ₁
Cobalamina	coenzimas B ₁₂	reação de isomerização, desidrogenação e metilação

FMN- flavina mononucleotídeo; FAD- flavina dinucleotídeo; NAD- adenina dinucleotídeo de nicotinamida; NADP- adenina dinucleotídeo fosfato de nicotinamida. Fonte: LEHNINGER *et alii*, 1993.

A toxicidade destas vitaminas não é comum em função da alta taxa de excreção renal e da baixa capacidade de estocagem. Entretanto, efeitos tóxicos podem surgir em decorrência de doses excessivas e disfunções renais. Crianças com doenças crônicas e

recém-nascidos são, particularmente, susceptíveis [JOHNSTON e YEN, 1994; GREENE *et alii*, 1988, SCHAUMBURG *et alii*, 1983].

A tiamina é constituída por uma molécula orgânica contendo dois anéis, um pirimídico e outro tiazólico (**Figura 1-1**). É parcialmente absorvida na forma livre, especialmente em alimentos de origem animal, e mais frequentemente sob a forma de pirofosfato. A tiamina pirofosfato (TPP) atua como transportador intermediário do grupo aldeído na descarboxilação do piruvato (**Figura 1-5**), nas reações de transcetolase na via das pentoses e parece desempenhar papel essencial na transmissão nervosa [GUBLER, 1991, ROBINSON, 1991]. A deficiência de tiamina provoca o beriberi, uma doença neurológica que foi endêmica em países do oriente que tinham, como alimentação básica, o arroz polido. Os sintomas estão associados com perda do apetite, envolvimento cardíacos e neurológicos. Seu excesso, entretanto, pode acarretar vasodilatação periférica, queda na frequência respiratória, convulsões e morte por paralisia do centro respiratório [FRANCO, 1992; BELITZ e GROSH, 1987].

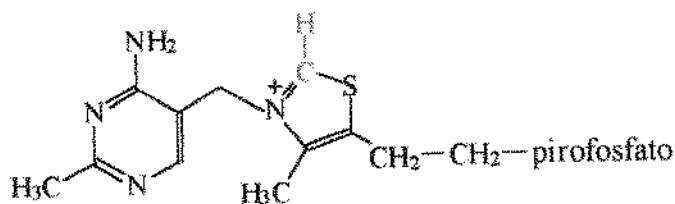


Figura 1-1 Tiamina pirofosfato. Grupo funcional em destaque.

A riboflavina é encontrada nos alimentos como flavina adenina dinucleotídeo (FAD - **Figura 1-2**), flavina mononucleotídeo (FMN) e riboflavina livre. Após fosforilação para FMN, é absorvida por transporte ativo no intestino delgado [ZEMPLINI *et alii*, 1996] e convertida em FAD no fígado. A FAD pode ser hidrolisada em FMN e riboflavina livre nos tecidos. As formas coenzimáticas, FAD e FMN, atuam como transportadoras intermediárias de elétrons nas reações biológicas de oxidação, como no ciclo de Krebs (**Figura 1-5**) e na oxidação e síntese de ácidos graxos. A deficiência

parcial de riboflavina é comum na maior parte do mundo, sendo mais frequente na gravidez, nas crianças em crescimento, ou no “stress” fisiológico. Geralmente ocorre associada à outras doenças deficitárias, como a pelagra. A riboflavina apresenta baixa toxicidade [COOPERMAN e LOPEZ, 1991].

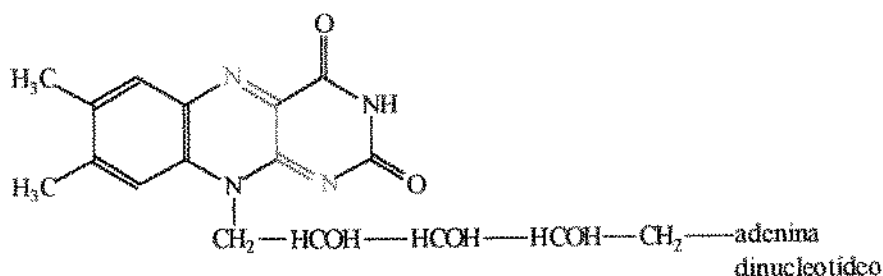


Figura 1-2 Riboflavina adenina dinucleotídeo. Grupo funcional em destaque.

As duas formas da vitamina PP, nicotinamida ou niacinamida e ácido nicotínico ou niacina (**Figura 1-3a**), são completamente absorvidas em todos os segmentos do trato gastrointestinal. A nicotinamida é componente de duas coenzimas relacionadas, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺ - **Figura 1-3b**) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺). Estas coenzimas atuam como transportadoras temporárias de hidrogênio em várias reações metabólicas, como síntese de ácidos graxos, cadeia transportadora de elétrons e glicólise (**Figura 1-5**). Vários autores têm demonstrado os efeitos terapêuticos do ácido nicotínico como droga de escolha na redução da taxa de colesterol, diminuição do risco de doenças cardiovasculares e da taxa de mortalidade. Entretanto, alguns destes efeitos podem resultar em respostas tóxicas com sintomas cutâneos, hepáticos e gastrointestinais [KIRCHHOEFER e SHARON, 1993; BLUM e LEVY, 1989 e CANNER *et alii*, 1986]. A deficiência conduz a pelagra, doença dos 4 D: dermatite, diarreia, demência e *death* (morte). Ambos, ácido nicotínico e nicotinamida, podem ser tóxicos se ingeridos em doses excessivas [EYS, 1991].

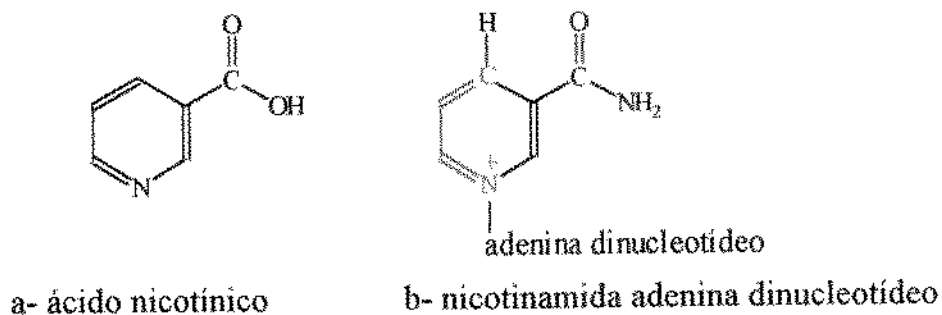


Figura 1-3 -Diferentes formas da vitamina PP. Grupo funcional em destaque.

O grupo B₆ é formado pela piridoxina (PN), piridoxal (PL), piridoxamina (PM) e pelas suas respectivas formas fosforiladas piridoxina fosfato (PNP), piridoxal fosfato (PLP) e piridoxamina fosfato (PMP), representadas na **Figura 1-4**. Estes compostos são absorvidos na forma não fosforilada, principalmente no duodeno. No fígado são facilmente fosforilados com auxílio da enzima quinase e defosforilados na presença de fosfatases alcalinas [LEKLEM, 1991]. A forma coenzímica da vitamina B₆, PLP, liga-se às enzimas através de uma base de Schiff com o grupo ε-amino da lisina. Estas enzimas são muito importantes em várias reações metabólicas de interconversão de aminoácidos. Atuam, também, na síntese do ácido nicotínico, das prostaglandinas, de neurotransmissores e de grupos heme, na fosforilação do glicogênio, no desenvolvimento do sistema imune e desempenham algumas funções no sistema nervoso [REEVE *et alii*, 1995 e GREENE *et alii*, 1988]. A deficiência de piridoxina é rara uma vez que está presente, em quantidades consideráveis, em vários alimentos. Os sintomas caracterizam-se por atrofia dos órgãos, redução da taxa de crescimento e deficiência metabólica. SCHAUMBURG *et alii* (1983) constataram sérios problemas neurotóxicos (neuropatia sensorial) relacionados com megadosagens de piridoxina.

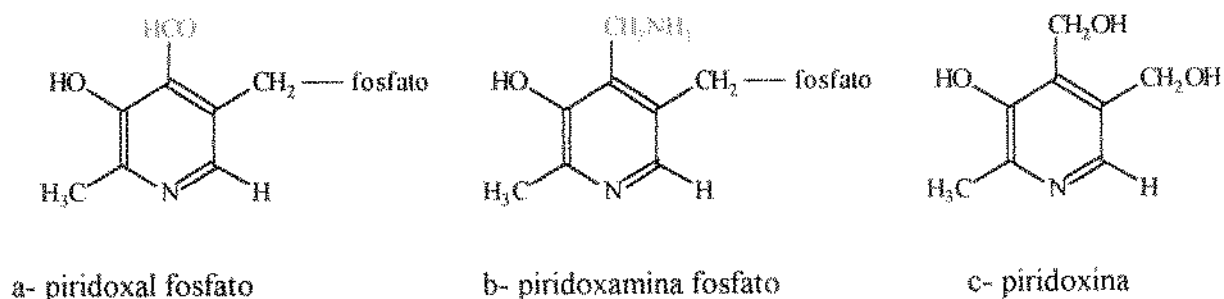


Figura 1-4 - Diferentes formas da vitamina B₆. Grupos funcionais em destaque.

1.1.2.3 Necessidades nutricionais

As doses dietárias de vitaminas hidrossolúveis, recomendadas por dia para homens, mulheres e crianças, segundo a RDA¹ americana [NAS-NRC², 1989] e os valores de referência nutricionais, formulados com a finalidade de harmonização dos padrões internacionais [FAO³, 1993], estão dispostos na **Tabela 1-5**. Não foram estabelecidas as RDAs para a biotina e o ácido pantotênico, entretanto as suas estimativas de segurança diária estão entre 30-100 µg e 4-7 mg, respectivamente. Os níveis vitamínicos recomendados no Reino Unido são menores do que em outros países da Europa, antiga União Soviética e Estados Unidos, sendo que, além das vitaminas acima citadas, a B₆, a B₁₂ e o ácido fólico também não possuem recomendação diária, por falta de conhecimentos suficientes sobre as suas necessidades [WATERHOUSE, 1990].

Em função da participação das vitaminas B₁, B₂ e PP nas reações oxidativas pelas quais a energia química presente nas moléculas de carboidratos, gorduras e proteínas é liberada, as necessidades vitamínicas variam com as fontes energéticas ingeridas e com a atividade física [TORUM, 1988 e GREENE *et alii*, 1988]. A necessidade de vitamina B₂ geralmente está associada, também, com o consumo protéico. A deficiência protéica

¹ *Recommended Dietary Allowances*

² *National Academy Science-National Research Council*

³ *Food and Agriculture Organization.*

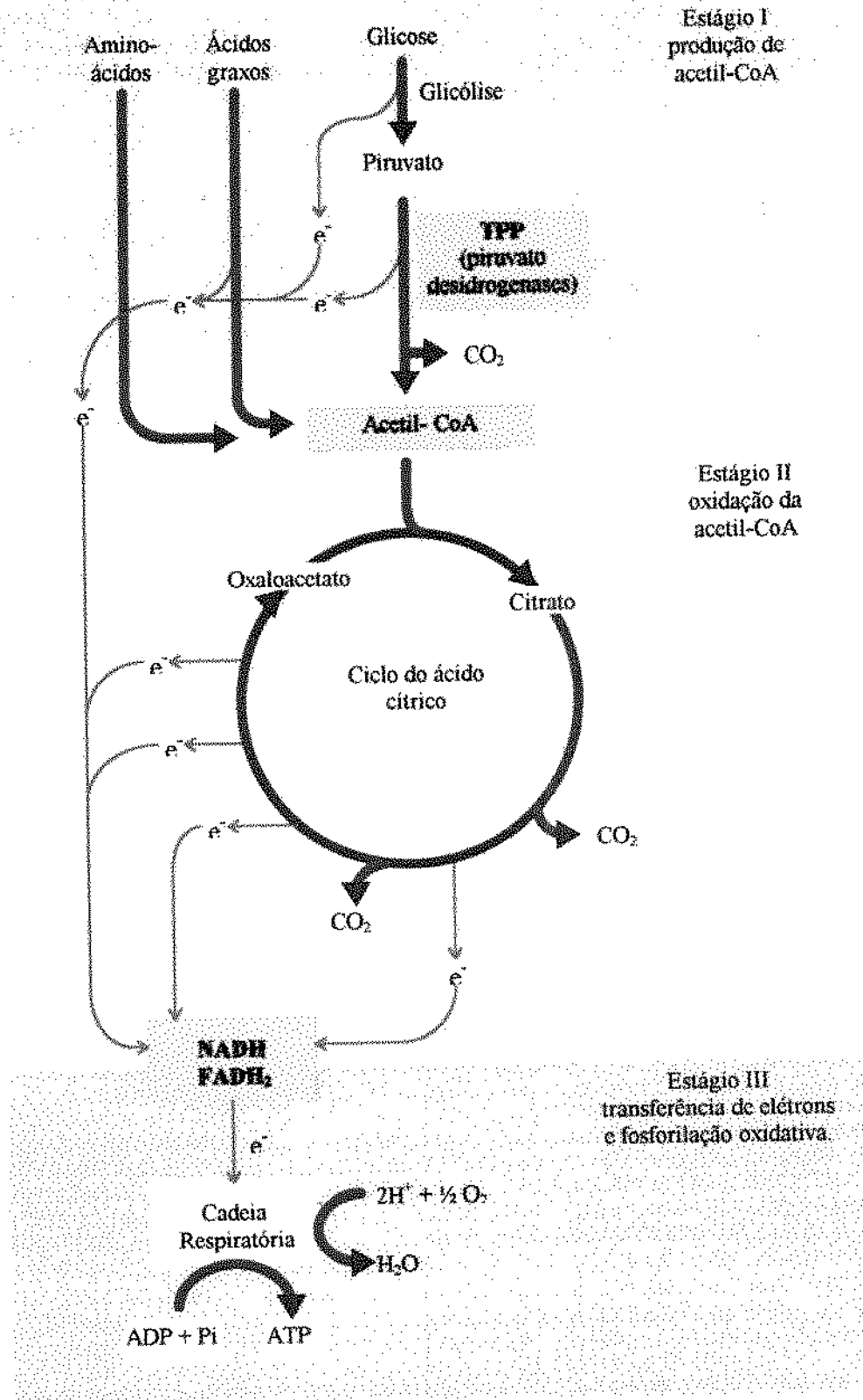


Figura 1-5 Atividade das vitaminas hidrossolúveis (tiamina pirofosfato - TPP; ácido pantotênico - acetil CoA; niacinamida adenina dinucleotídeo - NADH; flavina adenina dinucleotídeo - FADH₂), no metabolismo energético.

promove o acúmulo de riboflavina livre, que é eliminada na urina [COUCH e DAVIES, 1973].

Tabela 1-5 Doses diárias de vitaminas hidrossolúveis recomendadas e valores de referência nutricional

Vitamina	Crianças		Homens		Mulheres		VR*
	1-3 a	7-10 a	11-14 a	15-18 a	11-14 a	15-18 a	
B ₁ (mg)	0,7	1,0	1,3	1,5	1,1	1,1	1,4
B ₂ (mg)	0,8	1,2	1,5	1,8	1,3	1,3	1,6
B ₆ (mg)	1,0	1,4	1,7	2,0	1,4	1,5	2,0
PP (mg)	9	13	17	20	15	15	18
Ácido fólico (µg)	50	100	150	200	150	180	200
B ₁₂ (µg)	0,7	1,4	2,0	2,0	2,0	2,0	1
C (mg)	40	45	50	60	50	60	60

Fonte: NAS-NRC (1989); * VR: Valores de referência, FAO (1993).

Embora a literatura venha demonstrando a relação entre a necessidade da vitamina B₆ e a ingestão protéica [MILLER *et alii* 1985], sua relação com a qualidade das proteínas ainda não está bem estabelecida [KRETSCH *et alii*, 1995; FISHER *et alii*, 1984].

O ácido nicotínico pode ser sintetizada no organismo, a partir do aminoácido triptofano. A taxa de conversão estimada para o homem adulto é de 60:1. Assim, a necessidade de ácido nicotínico livre depende da quantidade de triptofano existente na dieta e da eficiência da conversão [BLUM e LEVY, 1989 e CANNER *et alii*, 1986].

1.1.2.4 Causas de deficiências

As recomendações vitamínicas propostas por organizações oficiais incluem uma margem de segurança para cobrir necessidades desconhecidas. Entretanto, estudos recentes, em muitos países, sugerem que o estado nutricional vitamínico de um grande número de pessoas não é adequado, como acreditava-se há alguns anos, tendo sido demonstrado que o nível vitamínico é insuficiente em certos grupos de pessoas de países industrializados. No entanto, a extensão dessas deficiências vitamínicas é mínima, comparada com a extensão dos problemas nutricionais existentes em países desfavorecidos. A prevalência de deficiência de riboflavina é inferior a 20% nos países europeus e a ingestão média no Japão é de 1,4 mg/dia. A mesma deficiência varia entre 50 e 76% na Guatemala, sendo que países como a China e Gâmbia apresentam uma ingestão média de 0,6 e 0,7 mg/dia, respectivamente [BOISVERT *et alii*, 1993; BATES *et alii*, 1989; SGARBIERI, 1986]. Algumas causas dessas deficiências, segundo FRANCO (1992), são:

a) fatores que provocam a ingestão inadequada de alimentos

- condição geográfica e situação sócio econômica desfavoráveis;
- ignorância nutricional;
- perda nutritiva durante o processamento industrial e o preparo caseiro dos alimentos;
- preconceitos e tabus alimentares;
- anorexia, apatia, doenças crônicas, e problemas dentários;

b) problemas de digestão e absorção;

- distúrbios digestivos e parasitoses;
- problemas relacionados com o avanço da idade;

c) fatores que provocam o aumento das necessidades vitamínicas;

- excesso de atividade física e/ou crescimento rápido;
- gravidez e lactação;

- infecções, estados febris e terapia com drogas;
- ingestão de fatores anti-vitâmicos e alto consumo energético;
- excreção excessiva.

Os sinais clássicos de deficiência vitamínica, associados ao problema da desnutrição generalizada em países desfavorecidos, geralmente são antecipados por sintomas grotescos de deficiências dietárias múltiplas (calórica, protéica, mineral e vitamínica).

A deficiência mais abrangente, entre as vitaminas do complexo B, refere-se a riboflavina, sendo comum, ainda, para a tiamina, o ácido nicotínico, ácido fólico e, ocasionalmente, para o ácido pantotênico. Não têm sido publicados dados epidemiológicos sobre a deficiência de vitamina B₆, sendo que, provavelmente, a deficiência protéica reduz a necessidade desta vitamina [MACHLIN, 1991].

1.1.2.5 Biodisponibilidade e estabilidade

As vitaminas provenientes de fontes animais geralmente são melhor absorvidas do que aquelas provenientes de fontes vegetais [COOPERMAN e LOPEZ, 1991]. O farelo de trigo e a celulose aumentam a absorção da riboflavina, do ácido nicotínico e da vitamina C, apresentam impacto variável sobre o ácido fólico e a vitamina B₁₂ [INK, 1988], entretanto reduzem a biodisponibilidade da vitamina B₆. Embora o efeito das fibras sobre a absorção dietária da vitamina B₆ seja pequeno, as plantas contêm alta concentração de 5-piridoxina glucosídeo, o que altera a sua disponibilidade entre 0-85% [REYNOLDS, 1988]. Os cereais matinais fortificados apresentam apenas 18-44 % de biodisponibilidade da vitamina [GREGORY e KIRK, 1981]. A interação do piridoxal com a cisteína, ou outros tióis, determina a sua perda em leites processados. A interação entre o piridoxal e o piridoxal fosfato com grupos ε-amino da lisina promove uma perda entre 25-30% de disponibilidade durante o processamento da carne. O processamento de alimentos vegetais

com alto teor de ácido ascórbico, resulta na conversão da piridoxina em um metabólito hidroxilado inativo [GREGORY e KIRK, 1981].

As tiaminases naturalmente presentes no peixe cru, café, chá, nozes e em uma grande variedade de outras plantas podem provocar a destruição da vitamina B₁ nos alimentos, durante o processamento, ou no intestino, após a ingestão dos alimentos. Além das tiaminases termolábeis alguns fatores termoestáveis como o ácido tânico, o ácido caféico e outros flavonóides, presentes em alimentos vegetais, também provocam a inativação da vitamina B₁ [GUBLER, 1991].

A **Tabela 1-6** mostra a estabilidade relativa das vitaminas hidrossolúveis frente ao pH, luz, oxigênio e aquecimento. Estas vitaminas são adversamente afetadas pelo processamento térmico convencional [AYRANCI e KAYA, 1993; DAWSON *et alii*, 1988; BERGLUND *et alii*, 1987; RANHOTRA *et alii*, 1985], esterilização por UHT¹ [OAMEN *et alii*, 1989], microondas [VARGAS, 1995], enlatamento e congelamento [BUSHWAY *et alii*, 1985], extrusão [KILLEIT, 1994], ultrafiltração [PREMARATNE e COUSIN, 1991], refino e moagem [MATTERN, 1991; AUGUSTIN *et alii*, 1982], tipo de embalagem, tempo e condições de estocagem [MUÑOZ *et alii*, 1994; AUGUSTIN *et alii*, 1978]. Entretanto, os processos de industrialização dos alimentos, desenvolvidos nos últimos 50 anos, muitas vezes colaboram para manutenção do potencial nutricional do alimento, desde que respeitados os devidos cuidados de processamento e observadas as boas práticas de fabricação.

A tiamina é a mais lábil entre as vitaminas do complexo B. Tratamentos com agentes oxidantes e alcalinizantes aceleram a formação de tiocromo, sulfitos e disulfitos de tiamina e outros derivados, resultando em perda da atividade vitamínica [BEDNARCYK, 1987]. RANHOTRA e GELROTH (1986) não encontraram nenhuma perda mensurável de tiamina durante a produção e assamento de pães e, durante a

¹ *Ultra High Temperature*

estocagem do produto, as perdas foram mínimas. Entretanto, a sua destruição durante o assamento de biscoitos foi extensiva em função da elevada área superficial e do pH suficientemente elevado, consequência da substituição do fermento pela soda. A prática da parbolização do arroz aumenta a estabilidade térmica da vitamina e reduz suas perdas por lavagem e lixiviação [GUBLER, 1991].

Tabela 1-6- Estabilidade relativa das vitaminas hidrossolúveis.

Vitamina	O ₂	pH			Luz	Calor	Perdas máximas pelo cozimento (%)
		neutro	ácido	alcalino			
B ₁	I	I	E	I	E	I	80
B ₂	E	E	E	I	I	I	75
B ₆	E	E	E	E	I	I	40
PP	E	E	E	E	E	E	75
Biotina	E	E	E	E	E	I	60
Ácido fólico	I	I	I	E	I	I	100
Ácido pantotênico	E	E	I	I	E	I	50
B ₁₂	I	E	E	E	I	E	10
C	I	I	E	I	I	I	100

E: estável; I: instável. Fonte: GREGORY (1985).

A riboflavina é muito sensível a luz, o que pode ser um problema no caso de embalagens transparentes, sendo que a instabilidade aumenta com a temperatura e o pH. O processo de secagem de alimentos ao sol resulta em perdas da maior parte da riboflavina presente [COOPERMAN e LOPEZ, 1991].

O ácido nicotínico é encontrado, nos cereais, na forma livre e ligada, sendo que esta última constitui 40%, ou mais, do ácido nicotínico total. A forma ligada é pouco utilizada pelo homem. O ácido nicotínico é uma das vitaminas mais estáveis e em função

do tratamento alcalino, tal como o utilizado no processamento de tortilhas e biscoitos, ocorre um aumento do ácido nicotínico assimilável, provavelmente em função da hidrólise do ácido nicotínico ligada durante o assamento [BOCK, 1991; RANUM, 1991; RANHOTRA e HELROTH, 1986].

1.2 Adição de vitaminas nos alimentos

1.2.1 Aditivos

As propriedades químicas de certas vitaminas permitem o desempenho funcional destas como aditivos no processamento de alimentos. As vitaminas C e E exercem atividade protetora na qualidade do alimento pelas suas propriedades antioxidantes mantenedoras do valor nutritivo, cor e aroma. O β -caroteno, precursor da vitamina A, melhora a aparência e aceitabilidade do produto devido a sua capacidade corante [GIESE, 1995; SAPERS, 1993; NEWSOME, 1987]. Dentre as vitaminas do complexo B, apenas a riboflavina apresenta função de aditivo, podendo ser adicionada em iogurtes como corante natural [SIMÃO, 1986].

1.2.2 Enriquecimento

A adição de vitaminas, para melhorar o conteúdo nutricional dos alimentos, é um procedimento importante em um grande número de países como EUA [ELDRIDGE e SHEEHAN, 1994; RANHOTRA, 1991; MAXWELL, 1990; JOHNSON *et alii*, 1988; RANHOTRA, 1985; HOFFMANN La Roche, 1979], Rússia [AUGUSTIN *et alii*, 1982], Canadá [RANUM, 1991], França [GASSIN, 1991], Suíça [WALTER, 1994], Inglaterra [RICHARDSON, 1990], e outros. A partir da descoberta e síntese das vitaminas nos anos 30, esta prática tem sido adotada visando suprir perdas provocadas pelo processamento

dos alimentos e corrigir deficiências nutricionais entre os grupos mais pobres da população [WATSON, 1981].

1.2.2.1 Natureza do enriquecimento

Os nutrientes podem ser incorporados nos alimentos por fortificação e restauração, com a finalidade de corrigir deficiências nutricionais em segmentos específicos da população. A restauração consiste na reposição dos nutrientes perdidos durante o processamento dos alimentos e a fortificação consiste na adição de nutrientes em alimentos originalmente destituídos ou que contenham quantidades nutricionalmente insignificantes destes compostos. O enriquecimento consiste na adição de nutrientes específicos em alimentos determinados, de acordo com padrões de identidade especificados [FENNEMA 1993; RANUM, 1991; NEWSOME, 1987]. A suplementação é um termo geral, que engloba todos acima [LEVEILLE, 1984].

1.2.2.2 Legislação internacional

Os programas de enriquecimento de alimentos normalmente são implantados e controlados por uma autoridade governamental. Embora a capacidade do programa em melhorar a qualidade do suplemento alimentar seja reconhecida, enriquecimentos inadequados podem causar problemas, tais como alimentos super fortificados e desbalanços nutricionais. Com a finalidade de evitar esses problemas e para que o enriquecimento seja apropriado o *Food and Drug Administration* (FDA) sugere as seguintes condições [RANUM, 1991]:

- a ingestão dietária do nutriente deve ser abaixo dos níveis desejados, em uma ampla faixa da população;
- o alimento utilizado para suprir o nutriente deve ser consumido em quantidade suficiente para proporcionar uma contribuição significativa na dieta da população carente;
- o nutriente adicionado não deve criar um desbalanço entre os nutrientes essenciais;
- o nutriente adicionado deve ser estável nas condições de uso e estocagem;
- o nutriente adicionado deve permanecer fisiologicamente disponível no alimento;
- o enriquecimento deve proporcionar segurança contra ingestões excessivas.

O *Food Nutrition Board* (FNB), pertencente ao NAS-NRC, estabeleceu alguns critérios para conduzir a seleção da fonte alimentar como veículo do suplemento nutricional [WATSON, 1981]:

- A maioria da população deve ter acesso à fonte alimentar, principalmente aqueles grupos que apresentam maiores riscos nutricionais;
- a fonte deve ser tal que baixos níveis de fortificação sejam capazes de providenciar níveis significantes do nutriente adicionado, nas condições normais de consumo;
- a taxa de consumo da fonte alimentar deve ser razoavelmente bem definida entre os vários segmentos da população, permitindo um consumo nutricional significativo, sem favorecer riscos de ingestões excessivas;
- a fonte alimentar deve permitir uma distribuição uniforme dos nutrientes;
- a fonte não deve contribuir para a instabilidade dos nutrientes adicionados ou interferir nas suas absorções;
- a enriquecimento não deve causar alterações na aparência, no aroma e no custo do produto acabado.

Os cereais e derivados constituem a fonte de escolha para o programa de enriquecimento de alimentos com vitaminas do complexo B nos Estados Unidos da América e no Canadá (Tabela 1-7).

Os países europeus promovem a adição de vitaminas segundo a legislação dos produtos dietéticos ou de acordo com regulamentos específicos relativos a fortificação [GASSIN, 1991].

Tabela 1-7 Padrões de enriquecimento de cereais nos Estados Unidos e Canadá

Produto	Tiamina	Riboflavina	Ácido nicotínico
EUA (mg/100g)			
Farinha de trigo	0,63	0,39	5,2
Flocos de milho	0,43-0,65	0,26-0,39	3,5-5,2
Arroz	0,43-0,87	0,26-0,52	3,5-7,0
Macarrão	0,87-1,09	0,37-0,48	5,9-7,4
Pão	0,39	0,24	3,3
Canadá (mg/100g)			
Farinha de trigo	0,44-0,77	0,27-0,48	3,5-6,4
Pão	0,24	0,18	2,2

Valores isolados indicam mínimos. No Canadá existem padrões para enriquecimento opcional da farinha com as vitaminas B₆ (0,25-0,31 mg/100g), ácido fólico (0,04-0,05 mg/100g) e ácido pantotênico (1,0-1,3 mg/100g). Fonte: RANUM, 1991.

1.2.2.3 Legislação brasileira

A legislação brasileira relativa ao registro de alimentos enriquecidos foi elaborada para regular sanitariamente os alimentos no estado de São Paulo, com episódios de carências nutricionais bastante esparsos e diferentes do restante do país [GONÇALEZ, 1994]. Os

alimentos enriquecidos são definidos segundo a **Resolução nº 12/78 da CNNPA¹**, que declara:

“Definição: considera-se alimento enriquecido todo aquele ao qual for adicionado substância nutriente, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo, seja repondo quantitativamente os nutrientes destruídos durante o processamento do alimento, seja suplementando-os com nutrientes em nível superior ao seu conteúdo normal.”

A suplementação do alimento com vitaminas deve ser feita de acordo com a resolução da CNNPA (**Tabela 1-8**). Os alimentos enriquecidos, para que assim possam ser denominados, devem fornecer na porção média diária ingerida, 60%, no mínimo, da quota diária recomendada para adultos. É permitida a adição de até 100% a mais de vitaminas, exceto a vitamina D, para compensar as perdas eventuais decorrentes do tempo de armazenamento do alimento.

É proibida a adição de vitaminas em bebidas alcoólicas. A margarina deve conter vitamina A ou pró-vitamina A equivalente a, no mínimo, 15.000 e, no máximo, 50.000 UI de vitamina A por quilo e poderá conter de 500 a 2000 UI de vitamina D por quilo.

1.2.2.4 Formas vitamínicas comerciais

As principais formas comerciais das vitaminas hidrossolúveis estão dispostas na **Tabela 1-9**. O enriquecimento, com mononitrato de tiamina, apresenta a vantagem de ser mais estável frente as condições de processamento e estocagem [GUBLER, 1991]. A riboflavina 5' fosfato é mais solúvel do que a riboflavina, entretanto mais cara [COOPERMAN e LOPEZ, 1991]. Embora o ácido nicotínico e a nicotinamida apresentem toxicidade, quando administrados em quantidades excessivas, o ácido nicotínico ainda

¹ Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

apresenta frequentes problemas de intolerância [EYS, 1991]. A cianocobalamina parece ser a forma mais estável entre os vários análogos estudados [ELLENBOGEN e COOPER, 1991]. A maltodextrina e o açúcar são bastante utilizados como veículos destas misturas vitamínicas comerciais [CARVALHO, 1994; JOHNSON *et alii*, 1988].

Tabela 1-8- Doses vitamínicas diárias para adultos*

Vitaminas	Doses
Vitamina A	5.000 UI
Vitamina D	400 UI
Vitamina B₁	1,0 - 1,6 mg
Vitamina B₂	1,5 - 1,8 mg
Vitamina B₆	2,0 mg
Vitamina B₁₂	2,0 - 3,0 µg
Vitamina C	70, 0 - 75,0 mg
Nicotinamida ou ácido nicotínico	17,0 - 21,0 mg
Ácido fólico	1,0 - 2,0 mg
Vitamina E	5,0 mg
Ácido pantotênico	3,0 - 5,0 mg

* Resolução da CNNPA de 12/78 [ABIA, 1992].

Tabela 1-9 Principais formas comerciais das vitaminas hidrossolúveis

Vitaminas	Principais formas comerciais
Vitamina C	Ácido ascórbico, ascorbato de sódio, ascorbato de cálcio
Vitamina B₁	Cloridrato de tiamina, mononitrato de tiamina
Vitamina B₂	Riboflavina USP, riboflavina 5' fosfato
Vitamina B₆	Cloridrato de piridoxina
Vitamina B₁₂	Cianocobalamina, hidroxicobalamina
Vitamina PP	Ácido nicotínico, nicotinamida
Ácido pantotênico	D-pantotenato de cálcio, D-pantotenato de sódio
Bitotina	D-biotina
Ácido fólico	Ácido fólico

Fonte: RUSIG (1994); CARVALHO (1994).

1.2.2.5 Tendências

A suplementação nutricional tem gerado grande controvérsia, com visões distintas de profissionais representantes das indústrias produtoras desses suplementos [CORDARO e DICKINSON, 1986] e profissionais da área de nutrição [ELDRIDGE SHEEHAN, 1994; RICHARDSON, 1990; MIRA *et alii*, 1989; GUTHIRIE, 1986]. O processo de enriquecimento no Brasil conta com algumas recomendações de consenso [CARVALHO e RUSIG, 1994]:

- levantamentos nutricionais, principalmente nos bolsões de pobreza do país;
- programação de enriquecimento de alimentos institucionais;
- campanhas regionais de educação alimentar;
- criação de uma tabela de composição de alimentos produzidos no Brasil;
- revisão dos projetos de lei e atualização da legislação brasileira;

- credenciamento de laboratórios particulares para análise de micronutrientes;
- padronização de métodos de análise e amostragem.

Nos últimos anos, tem sido prevista uma tendência de uniformização das normas e padrões de enriquecimento de alimentos dentro dos blocos econômicos, que vem se consolidando com o processo de globalização [GONÇALEZ, 1994; GASSIN, 1991]. A atual proposta de alteração da legislação brasileira para alimentos enriquecidos, conforme apresentado no II Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos (1996), vai de encontro com os padrões estabelecidos pelo MERCOSUL, classificando os alimentos adicionados de nutrientes em:

- alimentos enriquecidos fortificados para programas institucionais;
- alimentos enriquecidos fortificados para fins comerciais;
- alimentos restaurados.

Os alimentos enriquecidos fortificados para fins comerciais deverão conter, na porção média diária ingerida, no mínimo 10 e no máximo 25% das doses diárias recomendadas (DDRs), conforme valores de referência fornecidos pelo *Codex Alimentarius* [FAO, 1993]. Os alimentos, para que possam ser restaurados, deverão fornecer, na forma natural, mais de 10% da DDR do nutriente. A farinha de trigo, para venda direta ao consumidor, somente poderá ser restaurada. Além das bebidas alcólicas, não deverão ser enriquecidos os refrigerantes, balas, bombons e similares, produtos de confeitaria, gomas de mascar, produtos cárneos e mel, salvo em atendimento aos Programas Institucionais.

1.3 Métodos para determinação de vitaminas do complexo B

1.3.1 Métodos clássicos

Os métodos biológicos avaliam o efeito da suplementação de dietas pobres em determinada vitamina sobre os processos fisiológicos de animais de laboratório, tais como reprodução, crescimento e estocagem no fígado. Essas determinações têm sido indispensáveis no isolamento e identificação das diferentes vitaminas a partir de fontes naturais, entretanto são inevitavelmente demoradas, caras e pouco precisas para quantificação. Determinações biológicas em humanos são limitadas em função de questões éticas [CARPENTER, 1985].

Os métodos microbiológicos são baseados nos requerimentos nutricionais de um microorganismo para uma vitamina determinada. Em comparação com os métodos biológicos, as técnicas microbiológicas requerem menos espaço, tempo, trabalho, material e são mais reprodutíveis. Entretanto, muitos microorganismos podem sintetizar vitaminas a partir de certos precursores, o que dificilmente ocorre no metabolismo humano e animal [VOIGT e EITENMILLER, 1985]. O uso de um branco e fatores de correção podem melhorar a exatidão nestes casos [DEFIBAUGH *et alii*, 1977]. Os métodos microbiológicos ainda são os mais frequentemente utilizados nas determinações de ácido nicotínico (*Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*) e vitamina B₆ (*Saccharomyces uvarum*) em alimentos. O *Leuconostoc mesenteroides* é específico para o ácido nicotínico, mas não é utilizado para análise de nicotinamida e o *Lactobacillus plantarum* não é específico para as formas da vitamina PP, detectando também derivados do ácido nicotínico sem atividade vitamínica [VIDAL VAL-VERDE e RECHE, 1991; ANDERSON *et alii*, 1993]. O *Lactobacillus casei* é o microorganismo mais utilizado na determinação da riboflavina. Tanto os métodos microbiológicos quanto os biológicos não permitem a determinação simultânea das vitaminas.

Os métodos físico-químicos geralmente são mais precisos, rápidos e econômicos, sendo, portanto, mais aplicáveis às determinações de rotina. As determinações espectrofotométricas são frequentemente utilizadas em análises de preparações farmacêuticas. Entretanto, em função da sua baixa sensibilidade e da presença de substâncias interferentes, não são satisfatoriamente utilizadas em análise de alimentos. Os métodos fluorimétricos, em decorrência da alta sensibilidade, são os mais comumente usados para determinação de tiamina e riboflavina em alimentos.

1.3.2 Métodos oficiais

A principal vantagem dos métodos oficiais da AOAC¹ é a simplicidade dos equipamentos utilizados, entretanto são demorados, minuciosos [HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991; FINGLAS e FAULKS, 1984] e utilizam reagentes altamente nocivos, como brometo de cianogênio, e específicos e/ou de difícil obtenção como as resinas iônicas e fosfatases [Mac BRIDE e WYATT, 1983; RUSSEL e VANDERSLICE, 1992]. Os princípios para determinação das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, conforme os métodos da AOAC [CUNNIFF, 1995], estão descritos a seguir:

- **Vitamina B₁:** A amostra, previamente digerida com HCl 0,1 N e fosfatase, é purificada em coluna catiônica. A tiamina é oxidada, na presença de K₃Fe(CN)₆ e NaOH, formando o tiocromo, composto fluorescente com λ_{exc}^2 de 365 nm e λ_{em}^3 de 435 nm (método 957.17.).

- **Vitamina B₂:** A amostra, previamente digerida com HCl 0,1 N e fosfatase, é purificada por precipitação no ponto isoelétrico. A riboflavina é oxidada, na presença de KMnO₄ e H₂O₂, formando a lumiflavina, composto fluorescente com λ_{exc} de 440 nm e

¹ Association of Official Analytical Chemists

² Comprimento de onda de excitação

³ Comprimento de onda de emissão

λ em. de 565 nm (método 970.65.). Entretanto, este método não é indicado para alimentos que possuem enzimas com capacidade para degradar a vitamina B₂, como o fígado, ou que apresentam altas concentrações de gordura, promovendo a oclusão física da vitamina [RUSSEL e VANDERSLICE, 1992].

- **Vitamina B₆:** Após a digestão da amostra com HCl 0,44 N e aquecimento, as várias formas da vitamina B₆ são purificadas e separadas em coluna catiônica. Meios de cultura, contendo essas diferentes formas vitamínicas, são inoculados com *Sacharomyces uvarum* e incubados por 22 hs a 30° C. As concentrações vitamínicas são determinadas por turbidimetria em 550 nm (método 961.15.). A AOAC não oferece método químico para determinação da vitamina B₆.

- **Vitamina PP:** A amostra, previamente digerida com HCl 1N em autoclave, é purificada por precipitação com (NH₄)₂SO₄ no ponto isoelétrico. Esta hidrólise drástica durante o procedimento de extração geralmente resulta em muitos interferentes [HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991]. O anel piridínico das formas vitamínicas, clivado pelo CNBr, reage com o ácido sulfanílico, formando um complexo amarelo com absorção a 470 nm (método 961.14.). Entretanto esta reação não é específica para o ácido nicotínico, sendo comum para todos os compostos piridínicos substituídos, incluindo o ácido nicotínico ligado [VIDAL VAL-VERDE e RECHE, 1991].

Os métodos microbiológicos para determinação da vitamina PP são melhores e, geralmente, mais aceitos oficialmente. A quantificação é feita por titulação após um período de 72 hs de incubação ou por medida turbidimétrica após 16-22 hs de incubação [HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991].

1.3.3 Métodos por CLAE¹

As técnicas cromatográficas, que utilizam papel e camada delgada para determinação das vitaminas do complexo B, foram mais utilizadas no passado. KATSUI (1972) determinou a niacina por cromatografia em papel, utilizando brometo de cianogênio como revelador. A cromatografia de papel [KAWASAKI e SANEMORI, 1985] e a cromatografia em camada delgada [LEVORATO e CIMA, 1968] também foram utilizadas para determinação da tiamina, entretanto estas técnicas não apresentam resultados quantitativos satisfatórios. As flavinas podem ser separadas por cromatografia em papel, ou por cromatografia em camada delgada, com visualização da fluorescência sob luz ultravioleta [MARLETTA e LIGHT, 1985]. As vitaminas B₁, B₂ e B₆ foram determinadas simultaneamente por cromatografia em camada delgada, utilizando detecção por fluorescência [RIZZOLO e POLLESELLO, 1992].

Alguns poucos trabalhos encontrados na literatura determinam as vitaminas do complexo B por cromatografia a gás, entretanto nenhum destes oferece a possibilidade de determinações simultâneas das diferentes vitaminas. As diferentes formas fosforiladas da vitamina B₆ foram determinadas por cromatografia a gás, após derivação com acetil [VANDERSLICE *et alii*, 1985]. VELISEK *et alii* (1986) determinaram a vitamina B₁ por cromatografia a gás, após clivagem com sulfito, utilizando detector fotométrico de chama. A nicotinamida foi determinada por cromatografia a gás, após metilação com metanol [HENGGEN e URIES, 1985] ou desidratação com anidrido heptafluorobutírico [TANAKA *et alii*, 1989], utilizando, também, detector de ionização de chama.

As vantagens no uso da CLAE, para determinação de vitaminas, incluem rapidez, alta sensibilidade e exatidão, análises diretas sem derivação e determinação simultânea de várias vitaminas, ou formas vitamínicas [POLESELLO e RIZZOLO, 1986].

¹ Cromatografia líquida de alta eficiência

Muitos autores têm desenvolvido metodologias para a determinação, isolada ou simultânea, de vitaminas do complexo B em premix ou preparações farmacêuticas multivitamínicas [GENNARO, 1991; DONG *et alii*, 1988; KOTHARI e TAYLOR, 1982; LAM *et alii*, 1984; WILLS *et alii*, 1977]. Geralmente as amostras são dissolvidas diretamente na fase móvel, sem necessidade de procedimentos de extração e limpeza, devido, principalmente, à simplicidade da matriz e à alta concentração desses nutrientes. Entretanto, metodologias que fazem a utilização da CLAE, para a determinação de vitaminas em alimentos, ainda estão sendo estudadas.

1.3.3.1 Extração

A determinação de vitaminas em alimentos envolve a extração de compostos complexos e frequentemente lábeis, em concentrações da ordem de ppm¹, a partir de matrizes orgânicas complexas. Assim, o procedimento de extração das vitaminas geralmente envolve extensiva hidrólise ácida do alimento para romper os complexos protéicos, produzindo um extrato que contém quantidades apreciáveis de compostos interferentes [HOLLMAN *et alii*, 1993b; MARINI *et alii*, 1988; DAWSON *et alii*, 1988; TOMA e TABEKHIA, 1979; CHASE *et alii*, 1992]. Os procedimentos de extração e hidrólise provavelmente constituem as mais importantes fontes de variação na determinação de vitaminas do complexo B em alimentos, e a otimização destes procedimentos representará um importante passo no melhoramento desses métodos [HOLLMAN *et alii*, 1993b; GREGORY e SARTAIN, 1991].

A extração tradicional das vitaminas hidrossolúveis é feita com HCl diluído, em banho-maria por 30 min ou em autoclave a 121° C, por 15 min. Alguns trabalhos utilizam o H₂SO₄ diluído, em substituição ao HCl, como solvente extrator [WEHLING e WETZEL, 1984; SKURRAY, 1981; TOMA e TABEKHIA, 1979]. Misturas de metanol e ácidos diluídos foram utilizadas na extração das vitaminas B₁ em arroz [OHTA *et alii*,

¹ Parte por milhão

1993] e B₂ em leite [STANCHER e ZONTA, 1986]. OHTA *et alii* (1993) utilizaram refluxo a 60° C e vibração ultra-sônica na extração da B₁. A niacina biologicamente disponível é extraída por hidrólise ácida, entretanto, se a quantidade total é solicitada, a extração alcalina torna-se necessária [FINGLAS e FAULKS, 1987]. KILCAST (1994) verificou que o incremento na concentração de B₂ e niacina em pães preparados a partir de farinhas irradiadas, pode ser decorrente da conversão de precursores para a forma ativa da vitamina, ou resultante de um aumento no rendimento da extração durante a análise. GREGORY e SARTAIN (1991) demonstraram a eficiência do ácido sulfosalicílico na extração das diversas formas da vitamina B₆ em alimentos.

A conversão das vitaminas fosforiladas em sua forma livre é importante para medir o conteúdo vitamínico total do alimento. O tratamento com fosfatases, tais como Clarase e Takadiastase, é feito com a finalidade de liberar estas vitaminas [HOLLMAN *et alii*, 1993b; FINGLAS e FAULKS, 1984; SKURRAY, 1981; WEHLING e WETZEL, 1984]. A omissão da etapa de defosforilação conduz a resultados muito baixos na determinação de tiamina e riboflavina em alimentos variados [HOLLMAN *et alii*, 1993b] e de niacina em legumes [VIDAL VAL-VERDE e RECHE, 1991]. Em amostras contendo altos teores de amido, tais como arroz e batata, a Takadiastase tem a função adicional de hidrolisar o amido e facilitar a filtração. A papaina [TOMA e TABEKHIA, 1979], a Mylase 100 ou P [Mac BRIDE e WYATT, 1983; MAURO e WETZEL, 1984] e a amiloglucosidase [BERGLUND *et alii*, 1987] também têm sido utilizadas, ainda que com menor frequência. Embora a Takadiastase seja a enzima mais utilizada na determinação dessas vitaminas, observou-se que o seu desempenho varia entre os diferentes fornecedores [HOLLMAN *et alii*, 1993b]. HAGG (1994) avaliou o efeito de várias enzimas comercialmente disponíveis na extração das vitaminas B₁ e B₂, tendo obtido resultados significativamente superiores para a Clara-diaastase, marca FLUKA.

1.3.3.2 Limpeza do extrato

O extrato resultante, após limpeza e purificação adequada, deve apresentar-se livre de compostos interferentes e análogos biologicamente inativos. FINGLAS e FAULKS (1984) observaram que o procedimento de análise por CLAE pode fornecer teores vitamínicos mais baixos do que os fornecidos pelo método AOAC, provavelmente em função de interferentes fluorescentes neste último, que causam uma superestimação das vitaminas.

Além da precipitação no ponto isoelétrico [CUNNIFF, 1995], o acetato de chumbo [MUNOZ *et alii*, 1994], o ácido tricloroacético combinado com tratamento térmico adequado [Van SCHOONHOVEN *et alii*, 1994; FELLMAN, 1982; DAWSON *et alii*, 1988; ANG e MOSELEY, 1980], o ácido perclórico combinado com refrigeração [CHASE *et alii*, 1992; CHASE *et alii*, 1993a] e o ácido metafosfórico [SAMPSON *et alii*, 1995] são agentes precipitantes frequentemente utilizados na desproteínização de extratos provenientes de alimentos, para determinações vitamínicas variadas.

As colunas de troca iônica são utilizadas na purificação da tiamina [CUNNIFF, 1995] e do ácido nicotínico [HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991; VIDAL VAL-VERDE e RECHE, 1991]. Os cartuchos Sep-Pak C18, também, são utilizados na purificação e concentração de extratos vitamínicos variados. Os cartuchos são condicionados com solução tampão ou reagente íon pareante e as vitaminas são eluídas com concentrações crescentes de metanol [BARNA e DWORSCHÁK, 1994; WIMALASIRI e WILLS, 1985; WILLS *et alii*, 1985; FELLMAN *et alii*, 1982].

O uso de dispositivos de troca de colunas (*column switching device*) tem sido apresentado como alternativa rápida e simples no preparo da amostra e que, ao mesmo tempo, previne a oxidação de algumas vitaminas [IWASE, 1992; WEHLING e WETZEL, 1984]. Este procedimento automático está se tornando cada vez mais importante no trabalho de rotina dos laboratórios de controle de alimentos, onde velocidade de análise e

simplicidade no preparo das amostras, com determinações cromatográficas seguras e reprodutíveis, são uma necessidade [RIZZOLO e POLESELLO, 1992].

1.3.3.3 Etapa cromatográfica

a) Fase estacionária

Embora WILLS *et alii* (1977) tenham utilizado coluna de troca iônica para determinações multivitamínicas e MARINI *et alii* (1988) coluna amínica na determinação das vitaminas B₁, B₂ e niacina em macarrão, as colunas de fase reversa são usadas com maior frequência pelos pesquisadores. Segundo DONG *et alii* (1988) as colunas C₁₈ de fase ligada possuem alta seletividade, entretanto as colunas C₈ fornecem a mesma resolução com menor tempo de determinação. AKIYAMA *et alii* (1990), trabalhando com padrões, verificaram que colunas empacotadas com sílica gel morfolinopropilsilil apresentam um potencial satisfatório na separação de vitaminas hidrossolúveis.

b) Fase móvel

Embora poucos trabalhos façam referência ao uso de gradiente [BLANCO *et alii*, 1994; GREGORY e SARTAIN, 1991; KOTHARI e TAYLOR, 1982], a eluição das vitaminas hidrossolúveis geralmente é isocrática. As fases móveis das determinações mais simples contêm água e um modificador orgânico da polaridade, geralmente metanol ou acetonitrila [FINGLAS e FAULKS, 1984], podendo ser acidificadas com ácido acético ou fosfórico [CHASE *et alii*, 1993b; MUÑOZ *et alii*, 1994; IWASE, 1992; MARINI *et alii*, 1988, ASHOOR *et alii*, 1985]. Entretanto, uma boa resolução para as vitaminas do complexo B em determinação simultânea, geralmente, envolve o uso de tampões e/ou pares iônicos, resultando fases móveis de composição bastante complexa:

• Modificadores orgânicos

O metanol tem se apresentado como o melhor modificador orgânico [DONG *et alii*, 1988], variando entre 0-40% na composição da fase móvel [van SCHOONHOVEN *et alii*, 1994; LAVIGNE *et alii*, 1987; WILLS *et alii*, 1985], embora vários trabalhos apresentem utilização de acetonitrila entre 0-16% [BARNA e DWORSCHÁK, 1994; MAEDA *et alii*, 1988; CHASE *et alii*, 1993a]. O clorofórmio foi utilizado na separação de tiamina e riboflavina [ANG, 1980] e o 2-propanol na separação das formas livres e glicosiladas da vitamina B₆ [GREGORY e SARTAIN, 1991]. A presença da vitamina B₂ demanda as maiores concentrações destes modificadores [DONG *et alii*, 1988].

• Tampões

Vários trabalhos fazem referência à utilização de fases móveis tamponadas para separação de vitaminas hidrossolúveis em alimentos. Grande parte destes eluentes são constituídos por solução tampão fosfato pH 7,0 [HAGG, 1994; FELLMAN *et alii*, 1982; AUGUSTIN, 1984; DAWSON *et alii*, 1988; KAMMAN *et alii*, 1980], sendo que alguns utilizam solução com hipofosfito de potássio pH 3,0 [BERGAENTZLE *et alii*, 1993; BARNA e DWORSCHÁK, 1994] e solução tampão acetato [HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991; SKURRAY, 1981] nessas separações vitamínicas.

• Pares iônicos

A cromatografia por pareamento iônico (IPC) é baseada na adição de ions anfífilicos na fase móvel, com objetivo de influenciar a retenção de compostos iônicos presentes na amostra. A retenção dos analitos com carga oposta à do reagente ion pareante (IPR) é aumentada, enquanto que aquela dos analitos com a mesma carga é diminuída, sendo negligenciável a influência na retenção dos compostos destituídos de carga. Os alquilsulfonatos melhoram a separação dos solutos básicos, enquanto que as aminas quaternárias são usadas na separação dos solutos ácidos [CHUANG *et alii*, 1994; DONG *et alii*, 1988; HUNG e TAYLOR, 1981].

O modelo de retenção não estequiométrico, baseado em interações eletrostáticas, constitui o mais bem fundamentado dentro dos princípios físico-químicos. De acordo com esta hipótese o IPR é adsorvido na superfície da fase estacionária formando uma primeira camada iônica. Os íons inorgânicos formam a segunda camada entre a superfície carregada e o volume eluente. Os íons do analito são atraídos ou repelidos pela camada iônica primária, dependendo das cargas desta camada e daquelas do analito. A retenção do soluto é, então, parcialmente determinada pelas suas interações com o campo elétrico estabelecido pelos pares iônicos adsorvidos. Este modelo, que não presuppõe a formação de complexos (pares iônicos), está tornando popular o termo “interação iônica” [BARTHA e STAHLBERG, 1994].

Numerosas variáveis da fase móvel, tais como o tipo e a concentração do IPR e do modificador orgânico, a força iônica e o pH do eluente podem ser utilizadas para controlar a retenção do soluto e a seletividade da separação pela técnica IPC. Alguns componentes da fase reversa, tais como o tamanho do poro, a capacidade de adsorção (comprimento da cadeia alquílica e densidade da fase ligada) e a capacidade de dissociação dos grupos silanóis, também afetam a retenção [GENNARO *et alii*, 1994; BARTHA e STAHLBERG, 1994; BARTHA *et alii*, 1990; BARTHA e VIGH, 1989; BARTHA *et alii*, 1989; DONG *et alii*, 1988; BARTHA *et alii*, 1984; BARTHA e VIGH, 1983].

Concentrações em torno de 5mM de alquilsulfonatos com cadeias entre 5 e 8 átomos de carbono são frequentemente utilizadas para melhorar a separação das vitaminas hidrossolúveis, envolvendo aquelas de estrutura básica como a B₁ e a B₆. O pentasulfonato foi utilizado por TOMA e TABEKHIA (1979) durante a separação de riboflavina e tiamina em arroz, e vários autores têm feito uso do octanosulfonato na separação das diversas formas da vitamina B₆ em alimentos [van SCHOONHOVEN *et alii*, 1994; SAMPSON *et alii*, 1995; GREGORY e SARTAIN, 1991; AYI *et alii*, 1986]. Os heptanosulfonatos, geralmente combinados com tampões, vêm sendo utilizados em separações variadas [BERGAENTZLE *et alii*, 1993; BARNA e DWORSCHÁK, 1994; KAMAN *et alii*, 1980; SKURRAY, 1981; LAM *et alii*, 1984], entretanto, o

hexanosulfonato apresenta-se como o IPR mais eficiente [DONG *et alii*, 1988] e o mais amplamente utilizado na separação dessas vitaminas [CHASE *et alii*, 1993a; CHASE *et alii*, 1992; CHASE e SOLIMAN, 1990; LAVIGNE *et alii*, 1987; WILLS *et alii*, 1985; MAURO e WETZEL 1984; WEHLING e WETZEL, 1984].

Sais de aminas quaternárias, também, são utilizados satisfatoriamente como IPR na separação das vitaminas hidrossolúveis. O ortofosfato e o salicilato de octilamônio [GENNARO, 1991], o fosfato de tetrabutilamônio [AUSGUSTIN, 1984], o brometo de tetrabutilamônio [VIDAL VAL-VERDE e RECHE, 1991], o fosfato de trietilamônio [AYI *et alii*, 1986] e o hidróxido de amônio [CHASE e SOLIMAN, 1990; CHASE *et alii* 1992; 1993a] são os mais utilizados.

A trietilamina (TEA) é frequentemente adicionada como base competitiva, reduzindo ou eliminando as interações silanofílicas na superfície da fase estacionária, com efeito positivo na simetria e separação dos solutos básicos [DUCHATEAU *et alii*, 1989; ROOS e LAU-CAM, 1986]. A resolução da vitamina B₁ [MAEDA *et alii*, 1989; DONG *et alii*, 1988] e B₆ [AYI *et alii*, 1986; LAM *et alii*, 1984] foi melhorada pela utilização da TEA 0,1% na fase móvel. Entretanto, a influência nas retenções dos solutos ácidos e básicos está evidenciando a TEA como reagente íon pareante, justificando o aumento na retenção do ácido nicotínico em função da adição deste reagente [CHUANG *et alii*, 1994].

• Modificadores de pH

O pH da fase móvel não só influencia o perfil dos picos das vitaminas como facilita o pareamento iônico. GENNARO *et alii* (1994) constataram uma grande influência do pH na retenção da nicotinamida e do ácido nicotínico, utilizando octilamônio como IPR. O ácido acético, geralmente contribuindo com 1-2 % da fase móvel [MUÑOZ *et alii*, 1994; CHASE *et alii*, 1993b; MARINI *et alii*, 1988; WEHLING e WETZEL, 1984] e o ácido fosfórico, adicionado em quantidade suficiente para o ajuste de pH entre 2,1-3,6 [van SCHOONHOVEN *et alii*, 1994; BERGAENTZLE, 1993; CHASE *et alii*, 1993a; CHASE

et alii, 1992] são os ácidos mais frequentemente utilizados. OHTA *et alii* (1993) promoveram ajuste de pH 2,5 com ácido perclórico durante a determinação de tiamina em arroz.

Mesmos considerando a complexidade das fases móveis utilizadas na determinação das vitaminas do complexo B, o ácido nicotínico e a nicotinamida, que constituem as duas formas da vitamina PP, não foram separados em nenhum dos trabalhos, com alimentos, encontrados na literatura.

1.3.3.4 Sistema de detecção

A técnica de detecção, normalmente utilizada na determinação de vitaminas hidrossolúveis em premix e preparações farmacêuticas multivitamínicas, utiliza a radiação ultravioleta - UV [DONG *et alii*, 1988; GENNARO, 1991; AKIYAMA *et alii*, 1990]. Entretanto, alguns alimentos exigem um detector mais sensível e específico, como o de fluorescência, em função da baixa concentração das vitaminas e da presença de grande quantidade de interferentes [CHASE *et alii*, 1993a; AUGUSTIN, 1984].

A tiamina, que não é fluorescente, pode ser convertida em tiocromo por reação de derivação pré- ou pós-coluna [FELLMAN *et alii*, 1982; BERGLUND *et alii*, 1987; MAURO e WETZEL, 1984; WEHLING e WETZEL, 1984]. Dados de recuperação mostram que a riboflavina, naturalmente fluorescente, é estável durante a oxidação da tiamina, podendo, portanto, ser determinada simultaneamente com derivação pré-coluna [FINGLAS e FAULKS, 1984]. Segundo HOLLMAN *et alii* (1993b), não tem sido observada nenhuma variação significativa nos resultados, em função dessas diferentes técnicas utilizadas

O tiocromo, com $\lambda_{exc.}$ entre 360-365 e $\lambda_{em.}$ entre 400-435 nm, e a riboflavina, com $\lambda_{exc.}$ entre 360-464 e $\lambda_{em.}$ entre 500-565, são detectados por fluorescência em

alimentos variados [HAGG, 1994; CHASE *et alii*, 1993a; DAWSON *et alii*, 1988; WILLS *et alii*, 1985; AUGUSTIN, 1984; FINGLAS e FAULKS, 1984; FELLMAN *et alii*, 1982]. No entanto, a reação de derivação da riboflavina em lumiflavina, com λ_{exc} . entre 440-470 e λ_{em} . entre 520-565 nm [CARVALHO, 1988; CUNNIFF, 1995, ANG e MOSELEY, 1980], aumenta ainda mais a especificidade do método. As vitaminas B₁ e B₂ também têm sido determinadas através de detector UV a 254 nm [BARNA e DWORSCHÁK, 1994; KAMMAN *et alii*, 1980; TOMA e TABEKHIA, 1979], 270 nm [MUÑOZ *et alii*, 1994; MARINI *et alii*, 1988; ASHOOR *et alii*, 1985] e 214 nm [LAVIGNE *et alii*, 1987] em alimentos como arroz, macarrão, leite e carnes. A vitamina B₂ foi detectada pelo ombro secundário do seu espectro de absorção, na região do visível a 446 nm, em extratos de queijo [STANCHER e ZONTA, 1986].

A piridoxina, naturalmente fluorescente, com λ_{exc} . entre 290-333 nm e λ_{em} . entre 360-405 nm, tem sido detectada por fluorescência em alimentos variados [CHASE *et alii*, 1992; CHASE *et alii*, 1993a; SAMPSON *et alii*, 1995; van SHOONHOVEN *et alii*, 1994; BERGAENTZLE *et alii*, 1993; GREGORY e SARTAIN, 1991].

A niacina não é fluorescente, sendo detectada em alimentos através de detector UV a 254 nm [CHASE *et alii*, 1993b; VIDAL VAL-VERDE e RECHE, 1991; DAWSON *et alii*, 1988; TOMA e TABEKHIA, 1979], a 270 nm [MARINI *et alii*, 1988] e a 261 nm [HIRAYAMA e MURAYAMA 1991].

A maior parte das determinações simultâneas em alimentos envolvem apenas 2 vitaminas do complexo B, como a B₁ e B₂ que são determinadas em vários alimentos, através de detecção por UV [BARNA e DWORSCHÁK, 1994; LAVIGNE *et alii*, 1987; KAMMAN *et alii*, 1980] e por fluorescência [WIMALASIRI e WILLS, 1985; WILLS *et alii*, 1985; MAURO e WETZEL, 1984; AUGUSTIN, 1984; FELLMAN *et alii*, 1982], ou a B₂ e a piridoxina que são determinadas em formulações infantis, através de detecção por fluorescência [AYI *et alii*, 1986]. As vitaminas B₁, B₂ e niacina foram determinadas simultaneamente em arroz [TOMA e TABEKHIA, 1979] e em macarrão vitaminado

[MARINI *et alii*, 1988] utilizando detector UV. SKURRAY (1981) determinou as mesmas vitaminas em alimentos utilizando detectores UV e de fluorescência em série. As vitaminas B₁, B₂ e piridoxina foram determinadas simultaneamente em cereais fortificados [WEHLING e WETZEL, 1984] e em alimentos medicinais [CHASE *et alii*, 1993a], utilizando detector de fluorescência. As mesmas vitaminas foram determinadas em formulações infantis contendo leite e soja através de detectores UV e de fluorescência em série [CHASE *et alii*, 1992].

1.3.3.5 Identificação

Como citado por FERNANDO e MURPHY (1990), a identificação das vitaminas hidrossolúveis geralmente é feita por comparação dos tempos de retenção dos picos fornecidos pela amostra com aqueles fornecidos pelos padrões e por co-cromatografia. Um dos problemas nesse tipo de identificação é que o tempo de retenção varia de uma matriz alimentícia para outra, podendo diferir dos compostos vitamínicos puros [FINGLAS e FAULKS, 1987]. Foram observadas mudanças no tempo de retenção das vitaminas B₁ e B₂ determinadas em batatas, devidas ao efeito da matriz [FINGLAS e FAULKS, 1984]. O perfil espectral do pico e as comparações entre as razões das absorvâncias fornecidas pelo composto, em diferentes λ , com aquelas obtidas pelos padrões correspondentes, nos mesmos λ , foram utilizados por CHASE *et alii* (1993a e 1992) e por LAVIGNE *et alii* (1987), além do tempo de retenção, como parâmetros de identificação. A pureza da vitamina B₂ foi testada por FERNANDO e MURPHY (1990) através da destruição da riboflavina com ditionito de sódio. O espectro de massa e a espectroscopia no infravermelho constituem técnicas de identificação vantajosas, especialmente para o desenvolvimento de métodos de referência para validar as determinações vitamínicas por CLAE [RIZZOLO E POLESELLO, 1992; POLESELLO e RIZZOLO, 1990].

1.3.3.6 Quantificação

A quantificação das vitaminas hidrossolúveis geralmente é feita através de curvas de padronização externa, entretanto a acetanilida [MAEDA *et alii*, 1988] e o ácido m-hidroxibenzóico [CHASE e SOLIMAN, 1990] têm sido utilizados como padrões internos na determinação simultânea destas vitaminas em premix e em formulações multivitamínicas.

1.3.4 Outros métodos

Outras técnicas, como ELISA¹ [FINGLAS e MORGAN, 1994; ALCOOK *et alii*, 1990; LEE *et alii*, 1990] e eletroforese capilar [DINELLI e BONETTI, 1994], estão sendo empregadas na determinação das vitaminas hidrossolúveis em alimentos, entretanto, ainda são técnicas muito recentes, reservadas para fins de pesquisa, não estando disponíveis para os métodos analíticos de rotina [RIZZOLO E POLESELLO, 1992].

1.3.5 Validação da metodologia

Os resultados gerados por um método analítico devem garantir, através de evidências, confiabilidade e qualidade [ARAÚJO, 1995]. Segundo WILLIAMS (1993) a garantia da qualidade analítica é expressa por 5 fatores essenciais:

- controle de qualidade interno, como calibração de aparelhos e de padrões, treinamento dos analistas, uso de registros e de controles gráficos, expressão adequada dos resultados, etc.;

¹ *Enzyme-linked immunosorbent assay*

- certificação do laboratório em uma entidade certificadora oficial;
- participação em comparações interlaboratoriais;
- uso de materiais de referência;
- uso de métodos devidamente validados.

Vários procedimentos estatísticos são utilizados com a finalidade de desenvolver, avaliar e validar um método analítico [WERNIMONT, 1985; YAUDEN, 1982; STEINER, 1982], entre os quais destacamos:

a) Exatidão

Indica o grau de concordância entre o resultado obtido e o valor de referência, ou valor real. O valor real é determinado através de análises por métodos exatos e de calibrações com padrões e/ou material de referência [BARROS NETO *et alii*, 1995; WILRICH, 1993a].

A recuperação do método, determinada através da adição de padrões, tem a finalidade de avaliar a eficiência das etapas de derivação e limpeza do extrato, além de verificar a ocorrência de perdas durante os procedimentos estabelecidos pelo método, sem, contudo, avaliar a eficácia da extração. Recuperações baixas indicam perdas do composto de interesse durante os procedimentos analíticos, assim como recuperações muito acima de 100% apontam para a ineficácia da etapa de limpeza. As faixas de recuperação encontradas na literatura para as vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, determinadas em alimentos, por CLAE, utilizando procedimentos de limpeza variados, estão dispostas na **Tabela 1-10**.

O valor de referência, a princípio, é fornecido por um método de referência, que deve ser destituído de tendenciosidades significativas e corretamente aplicado pelo laboratório. Ambos os requisitos são dificilmente demonstrados na prática [WAGSTAFFE, 1993]. A comparação dos métodos de análise de vitaminas hidrossolúveis

desenvolvidos por CLAE com métodos oficiais, como os químicos e microbiológicos, é uma prática comum na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, sendo que os métodos da AOAC são os mais frequentemente utilizados. Entretanto, a comparação com métodos microbiológicos não é suficiente para validar um método, já que estes não apresentam desempenho adequado em estudos colaborativos [FINGLAS e FAULKS, 1987].

Vários trabalhos encontrados na literatura para determinação de vitaminas hidrossolúveis, por CLAE, fornecem resultados semelhantes aos obtidos pelos métodos oficiais, porém, foram encontrados valores significativamente menores para a vitamina B₂ [FERNANDO e MURPHY, 1990; FINGLAS e FAULKS, 1984] e para a niacina [HIRAYAMA e MARUYAMA, 1991] e valores significativamente maiores para a vitamina B₁ [WILLS *et alii*, 1985; KAMMAN *et alii*, 1980; FINGLAS e FAULKS, 1984] e B₂ [KAMMAN *et alii*, 1980; AYI *et alii*, 1986] com relação aos métodos da AOAC.

O material de referência certificado (CRM) fornece valores de referência com simplicidade e conveniência. A estimativa da incerteza é facilmente demonstrada pela comparação do valor certificado com o valor obtido através de análise do CRM, com matriz similar à do produto analisado [WAGSTAFFE, 1993]. O material de referência (RM) preparado por adição de padrões é considerado com ressalvas quando este é usado para checar a exatidão do método. Entretanto, se o método não produz resultados corretos a partir de um material de referência adicionado de padrões, semelhantemente ele não produzirá resultados satisfatórios, quando comparados com o valor fornecido pelo material certificado [WILLIAMS, 1993].

Com objetivo de melhorar a avaliação dos métodos de determinação de vitaminas em alimentos, a *Community Boreau of Reference* (BCR) vem, recentemente, preparando CRMs para uso em alimentos [FINGLAS *et alii*, 1993; HOLLMAN *et alii*, 1993a].

Tabela 1-10 Faixas de recuperação das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina em alimentos, determinados por CLAE, utilizando procedimentos variados de limpeza

Matriz	Recuperação	Limpeza	Referência
Alimentos variados	B ₁ 85-100% B ₂ 80-100%	ácido tricloroacético	HAGG (1994)
Carnes	B ₁ 83-85% B ₂ 71-89%	Sep-Pak C ₁₈	BARNA e DWORCHÁK (1994)
Soja e tofu	B ₁ 42-106% B ₂ 47-102%	precipitação no PI	FERNANDO e MURPHY (1990)
Alimentos medicinais	B ₁ 103-119% B ₂ 89- 104% B ₆ 103-123%	precipitação com perclorato e refrigeração	CHASE <i>et alii</i> (1993a)
Trigo	B ₆ 34-101%	ácido metafosfórico	SAMPSON <i>et alii</i> (1995)
Cereais e levedura	B ₆ 90-95%	—	BERGAENTZLE <i>et alii</i> (1993)
Alimentos fortificados	NA 92-108%	precipitação no PI e limpeza com Fluorasil	CHASE <i>et alii</i> (1993b)
Alimentos variados	NA 91-95%	trocador iônico	HIRAYAMA e MARUYAMA (1991)

NA:niacina; PI: ponto isoelétrico.

b) Precisão

O desenvolvimento de um método analítico está sujeito a variações aleatórias, que podem ser estimadas pela precisão. Estas estimativas são expressas através da repetibilidade e da reprodutibilidade do método [CAULCUT e BODDY, 1983].

A repetibilidade indica o grau de concordância entre resultados sucessivos, obtidos a partir de um único método, com o mesmo material, sob as mesmas condições analíticas, em curtos intervalos de tempo. Quantitativamente, é expressa pelo valor abaixo do qual a diferença absoluta entre os resultados pode ser esperada como incerteza, com

probabilidade especificada. Na ausência desta indicação a probabilidade é de 95% [CAULCUT e BODDY, 1983].

As determinações vitamínicas encontradas na literatura expressam essas variações aleatórias como coeficientes de variação (CV) ou simplesmente como σ . As médias de CV das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina determinadas em alimentos, por CLAE, geralmente, estão abaixo de 13% [FERNANDO e MURPHY, 1990; BARNA e DWORCHÁK, 1994; CHASE *et alii*, 1993b].

A reprodutibilidade indica o grau de concordância entre resultados individuais obtidos a partir de um mesmo método, com o mesmo material, em diferentes laboratórios, com diferentes operadores, equipamentos e/ou intervalos de tempo. Quantitativamente, é expresso pelo valor abaixo do qual as diferenças absolutas entre dois resultados isolados podem ser esperadas como incertezas, com 95% de confiança [CAULCUTT e BODDY, 1983].

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade entre os diferentes laboratórios dos países europeus, o BCR vem desenvolvendo programas de comparação entre os métodos analíticos utilizados para determinação de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [BERGAENTZLÉ *et alii*, 1995; FINGLAS *et alii*, 1993; HOLLMAN *et alii*, 1993a]. Entre 18 laboratórios avaliados por HOLLMAN *et alii* (1993a) os resultados encontrados apontam para variações entre 11-18% para a vitamina B₁, determinada por CLAE, por métodos fluorimétricos e microbiológicos, variações entre 28-74% para a vitamina B₂, determinada por CLAE e por métodos microbiológicos, entre 18-51% para a vitamina B₆, determinada por CLAE e por métodos microbiológicos, e entre 9-15% para a niacina, determinada apenas por métodos microbiológicos.

c) Sensibilidade

Um grande número de parâmetros, que incluem a capacidade do instrumento em discriminar sinal e ruído (relação S/R), as propriedades físico-químicas do analito e a composição da matriz, afetam a sensibilidade de um método analítico específico. As inclinações das curvas de calibração são utilizadas para determinar o valor da sensibilidade [WILLARD *et alii*, 1988]. Os limites de detecção e de quantificação também são indicativos desta sensibilidade, entretanto os valores determinados com base na calibração são válidos apenas para a série de medidas correspondentes. Estes limites devem ser determinados por experimentos intra- e interlaboratoriais. [WILRICH, 1993b].

O limite de detecção é definido como a concentração do analito que produz um sinal duas vezes maior que o desvio padrão do sinal fornecido pelo branco [WILLARD *et alii*, 1988], indicando a menor concentração de um composto que pode ser detectado pelo método, dentro de um nível de confiança especificado [CAULCUTT e BODYYY, 1983]. A **Tabela 1-11** mostra as variações entre os limites de detecção das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina analisadas por CLAE, através de detector UV e de fluorescência, em alimentos variados. Já o limite de quantificação indica a menor concentração do analito capaz de produzir uma resposta linear com o aumento da concentração do mesmo. As faixas de concentrações vitamínicas com boa linearidade, obtidas por CLAE, através de detector UV e de fluorescência, em alimentos variados, estão apresentadas na **Tabela 1-12**.

Tabela 1-11 Limites de detecção das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina analisadas, por CLAE, em alimentos variados

Matriz	Limite de detecção	Volume de injeção	Detector	Referência
Fórmula infantil (leite e soja)	B ₁ 0,15µg/ml B ₂ 0,09µg/ml	—	UV	CHASE <i>et alii</i> (1992)
Ídem	B ₆ 0,01µg/ml	—	fluorescência	CHASE <i>et alii</i> (1992)
Alimentos medicinais	B ₁ 0,05µg/ml B ₂ 0,01µg/ml	—	fluorescência	CHASE <i>et alii</i> (1993a)
Queijo	B ₂ 2,5ng	25µl	UV	STANCHER e ZONTA (1986)
Alimentos variados	B ₁ e B ₂ 0,005µg	50-100µl	UV	WIMALASIRI e WILLS (1985)
	B ₁ 0,003µg B ₂ 0,002µg	50-100µl	fluorescência	WIMALASIRI e WILLS (1985)
	B ₆ 0,02µg/g	20µl	fluorescência	BERGAENTZLE <i>et alii</i> (1993)
	NA 0,1µg/g	5-20µl	UV	HIRAYAMA e MARUYAMA (1991)
	NA 0,11µg/ml	100µl	UV	CHASE <i>et alii</i> (1993b)

NA: niacina.

Tabela 1-12 Faixas de linearidades para determinação de vitaminas do complexo B obtidas através de detectores UV e de fluorescência

Vitamina	Faixa de linearidade	Detector	Referência
B ₁	0-35ng	fluorescência	OHITA <i>et alii</i> (1993)
B ₁ e B ₂	0,2-1,4 µg/ml	UV	CHASE <i>et alii</i> (1992)
B ₁ e B ₂	0,2-1,0 µg/ml	fluorescência	CHASE <i>et alii</i> (1993a)
B ₆	0,2-1,2 µg/ml	fluorescência	CHASE <i>et alii</i> (1992)
NA	10-100 ng	UV	HIRAYAMA e MARUYAMA (1991)

NA: niacina.

d) Robustez

Embora um novo método possa funcionar perfeitamente no laboratório de origem os resultados podem se desviar do valor esperado, em extensões consideráveis, quando testado colaborativamente. Tais discrepâncias ocorrem mesmo quando os laboratórios participantes contam com analistas experientes e apresentam repetibilidade aceitável entre os experimentos. Várias condições podem influenciar, em maior ou menor escala, os resultados finais do teste analítico: concentração, qualidade e idade de reagentes, taxas de aquecimento, equipamentos, umidade local, etc [WERNIMONT, 1985; YODEN, 1982]. Alguns testes preliminares podem ser desenvolvidos, variando aqueles fatores que podem ser mais facilmente alterados de um laboratório para o outro. Com objetivo de evitar o erro sistemático, as variáveis críticas identificadas devem ser cuidadosamente controladas durante o desenvolvimento do método [ULBERTH, 1993]. No entanto, a literatura disponível não tem oferecido informações sobre os estudos da rusticidade dos métodos desenvolvidos.

1.4 Referências bibliográficas

- ABIA - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (1992). *Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos*. 5. rev. São Paulo: ABIA, v. 1A.
- AKIYAMA, S.; NAKASHIMA, K.; SHIRAKAMA, N. & YAMADA, K (1990). New column packing materials for separation of water-soluble vitamins by HPLC. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 2809-2813.
- ALCOOCK, S.C; FINGLAS, P. M. & MORGAN, M. R. A (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for pyridoxamine and its comparison with alternative analytical procedures. *Food and Agric. Immunol.*, **2** (4), 197-204.
- ANDERSON, E. M.; ANGYAL, G. N.; WEAVER, C. M.; FELKNER, I. C.; WOLF, W. R. & WORTHY, B. E. (1993). Potential application of laser/microbe bioassay technology for determining water-soluble vitamins in foods. *J. AOAC Int.*, **76** (3), 682-690.
- ANG, C. Y. W. & MOSELEY, F. A. (1980). Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **28** (3), 486-489.
- ARAÚJO, Y. (1995). Apoio estatístico para a qualidade analítica. In: *Conceito Amplo da Qualidade em Alimentos*. ILSI-ITAL, Campinas, 67p.
- ASHOOR, S. H.; KNOX, M. J.; OLSEN, J. R. & DEGER, D. A. (1985) Improved liquid chromatographic determination of riboflavin in milk and dairy products. *J. AOAC*, **68** (4), 693-696.

- AUGUSTIN, J. (1984). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. *J. AOAC*, **67** (5), 1012-1015.
- AUGUSTIN, J.; TASSINARI, P. D.; FELLMAN, J. K. & COLE, C. L. (1982) B vitamin content of selected cereals and baked products. *Cereal Foods World*, **27** (4), 159-161.
- AUGUSTIN, J.; JOHNSON, S. R.; TEIZEL, C.; TOMA, R. B.; SHAW, R. L.; TRUE, R. H.; HOGAN, J. M. & DEUTSCH, R. M. (1978) Vitamin composition of freshly harvested and storage potatoes. *J. Food Sci.*, **43** (5), 1566 - 1570 e 1574.
- AURAND, L. W.; WOODS, A. E. & WELLS, M. R. (1987). The vitamins. In: *Food composition and analysis*. New York: Van Nostrand Reinhold, 690p.
- AYI, B. K.; YUHAS, D. A. & DEANGELIS, N. J. (1986). Simultaneous determination of vitamins B₂ (riboflavin) and B₆ (pyridoxine) in infant formula products by reversed phase liquid chromatography. *J. AOAC*, **69** (1), 56-59.
- AYRANCI, G. & KAYA, S. (1993). Kinetic analysis of the loss of some B-vitamins during the cooking of macaroni. *Die Nahr.*, **37**, 153-155.
- BARNA, E. & DWORSCHÁK, E. (1994). Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by HPLC. *J Chrom. A*, **668**, 359-363.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. (1995). *Planejamento e otimização de experimentos*. Editora da Unicamp, Campinas, 299p.
- BARTHA, A. & STAHLBERG, J. (1994). Electrostatic retention model of reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chrom. A*, **668**, 255-284.
- BARTHA, A.; VIGH, G. & PUCHONY, Z. V. (1990). Basis of the rational selection of the hydrophobicity and concentration of the ion-pairing reagent in reversed-phase ion-pair HPLC. *J. Chrom.*, **499**, 426-434.
- BARTHA, A. & VIGH, G. (1989). Rule based approach for the determination of solute types in unknown sample mixtures as a first step of optimization parameter selection in reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chrom.*, **485**, 383-401.
- BARTHA, A. & VIGH, G. (1983). Retention of positive and negative ions and neutral solutes in tetrabutylammonium bromide containing methanol water eluents on lichrosorb RP-18. *J. Chrom.*, **265**, 171-182.
- BARTHA, A.; VIGH, G. & STAHLBERG, J. (1989). Rationalization of the selection of the type of the organic modifier(s) for selectivity optimization in reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chrom.*, **485**, 403-419.
- BARTHA, A.; VIGH, G.; BILLIET, H. A. H. & GALAN, L. (1984) Studies in reversed-phase ion-pair chromatography IV. The role of the chain length of the pairing ion. *J. Chrom.*, **303**, 29-38.
- BATES, J. C.; POWERS, H. J.; DOWNES, R.; BRUBACHER, D.; SUTCLIFFE, V.; THURNHILL, A. (1989). Riboflavin status of adolescent vs elderly Gambian subjects before and during supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, **50**, 825 - 829.
- BEDNARCYK, N. E. (1987). Nutrient contributions of cookies and crackers. *Cereal Foods World*, **32** (5): 367-369.
- BELITZ, H. D. & GROSCH, W. (1987). *Food chemistry*. 2th ed. Springer verlag, Berlin. 774p.
- BERGAENTZLE, M.; ARELLA, F.; BOURGUIGNON, J. B. & HASSELMANN, C. (1995). Determination of vitamin B₆ in foods by HPLC - a collaborative study. *Food Chem.* **52**, 81-86.

- BERGAENTZLE, M; MARCHIONI, E. & HASSELMANN, C. (1993) HPLC determination of vitamin B₆ in foods after pre-column derivatization of free and phosphorylated vitamers into pyridoxol. *Food Chem.*, **48**, 321-324.
- BERGLUND, P. T.; DICK, J. W. & DREHER, M. L. (1987). Effect of form of enrichment and iron on thiamin, riboflavin and niacinamide, and cooking parameters of enriched spaghetti. *J. Food Sci.*, **52**(5), 1367-1371.
- BLANCO, D.; SANCHEZ, L. A. & GUTIERREZ, M. D. (1994) Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with ordinary and narrow-bore columns. *J. Liquid Chrom.*, **17** (7), 1525-1539.
- BLUM, C. & LEVY, R. (1989). Current therapy for hypercholesterolemia. *J. Am. Med. Assoc.* **261** (24), 3582-3587.
- BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. (1989). Vitaminas. In: *Introdução à Química de Alimentos*. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 223p.
- BOCK, M. A. (1991). Minor constituents of cereals. In: *Handbook of Cereal Science and Technology*. New York: Ed. Lowrenz. 883p.
- BOISVERT, W. A.; CASTAÑEDA, C.; MENDOZA, I.; LANGELOH, G.; SOLOMONS, N. W.; GERSHOFF, S. N. & RUSSELL, R. M. (1993) Prevalence of riboflavin deficiency among Guatemalan elderly people and its relationship to milk intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, **58**, 85-90.
- Mac BRIDE, D. E. & WYATT, J. C. (1983). Evaluation of a modified AOAC determination of thiamin and riboflavin in foods. *J. Food Sci.*, **48**, 748-750.
- BUSHWAY, A. A.; SERREZE, D. V.; McGANN, D. F.; TRUE, R. H.; WORK, T. M. & BUSHWAY, R. B. (1985) Effect of processing method and storage time on the nutrient composition of fiddlehead greens. *J. Food Sci.*, **50**, 1491- 1492 e 1516.
- CANNER, P. L.; BERGE, K. G.; WENGER, N. K.; STAMLER, J.; FRIEDMAN, L.; PRINEAS, R. J. & FRIEDEWALD, W. (1986). Fifteen year in coronary drug project patients: long-term benefit with niacin. *J. Am. Col. Cardiol.*, **8** (6), 1245-1255.
- CARPENTER, K. J. (1985). Biological assays. In: *Methods of Vitamin assay*. 4ª ed., John Wiley & Sons, New York. 590p.
- CARVALHO, P. R. N. (1994). Enriquecimento de alimentos. In: *I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos*. ITAL-UNICAMP, Campinas, S.P. p 1-7.
- CARVALHO, P. R. N. (1988). *Análises de Vitaminas em Alimentos - Manual Técnico*. ITAL, Campinas. 108p.
- CARVALHO, P. R. N. & RUSIG, O. (1994). *Recomendações do I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos*. ITAL-UNICAMP, Campinas, S.P.
- CAULCUTT, R. & BODDY, R. (1983). *Statistics for analytical chemists*. 1th. ed., Chapman and Hall, Londres, 253p.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; EITENMILLER, R. R. & SOLIMAN, A. G. (1992). Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in infant formula. *J. AOAC Int.*, **75** (3), 561-565.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O. & SOLIMAN, A. G. (1993a). Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and pyridoxine in medical foods. *J. AOAC Int.* **75** (3), 561-565.

- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; SOLIMAN, A. G. & EITENMILLER, R. R. (1993b). Liquid chromatography analysis of niacin in fortified food products. *J. AOAC Int.*, **76** (2), 390-393.
- CHASE, G. W. & SOLIMAN, A. G. (1990). Analysis of thiamin, riboflavin, pyridoxin and niacin in multivitamin premixes and supplements by HPLC. *J. Micromut. Anal.*, **7**, 15-25.
- CHUANG, C.; RAGAN, F. A. & PRASAD, C. (1994). Use of triethylamine as an ion-pairing reagent. *J. Liquid Chrom.*, **17** (11), 2383-2394.
- COOPERMAN, J. M. & LOPEZ, R. (1991). Riboflavin. In: *Handbook of vitamins*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 595p.
- CORDARO, J. B. & DICKINSON, A. (1986). The nutritional supplement industry - realities and opportunities. *J. Nutr. Educ.*, **18** (3), 128 - 132.
- COUCH, J. R. & DAVIES, R.E. (1973). Vitamins B₁, B₂, B₆, niacin and ascorbic acid. In: *Nutritional Biochemistry*. 3rd ed. Academic Press, New York. v 1, 583 p.
- CUNNIFF, P. (ed). (1995) *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- DAWSON, K. R.; UNKLESBAY, N. F. & HEDRICK, H. B. (1988). HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1176-1179.
- DEFIBAUGH, P.; SMITH, J. S. & WEEKS, C.E. (1977). Assay of thiamin in foods, using manual and semiautomated fluorometric and microbiological methods. *J. AOAC*, **60**, 522.
- DINELLI, G & BONETTI, A. (1994). Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-solubles vitamins and multi-vitamin integrators. *Electrophoresis*, **15** (8-9), 1147-1150.
- DONG, M. W.; LEPORE, J. & TAURUMOTO, T. (1988). Factors affecting the ion-pair chromatography of water soluble vitamins. *J. Chrom.*, **442**, 81-95.
- DUCHATEAU, A.; CROMBACH, M.; AUSSEMS, M. & BONGERS, J. (1989). Determination of the enantiomers of α -amino acids and α -amino acids amides by HPLC with a chiral mobile phase. *J. Chrom.*, **461**, 419-428.
- EITENMILLER, R. R.; RUTH, F. K. & SMIT, J. B. (1977). Mineral and water-soluble vitamin content of rabbiteye blueberries. *J. Food Sci.*, **42** (5), 1311-1315
- ELDRIDGE, A. L. & SHEEHAN, E. T. (1994). Food supplement use and related beliefs: survey of community college students. *J. Nutr. Educ.* **26** (6), 259 - 265.
- ELLENBOGEN, L. & COOPER, B. A. (1991). Vitamin B₁₂. In: *Handbook of vitamins*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 595p.
- EYS, J. V. (1991). Nicotinic acid. In: *Handbook of vitamins*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 595p.
- FAO - Food and Agriculture Organization (1993). *Codex Alimentarius*. FAO, Roma. v 1, Sup. 1, 103p.
- FELLMAN, J. K.; ARTZ, W. E.; TASSINARI, P. D. & AUGUSTIN, J. (1982). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by HPLC. *J. Food Sci.*, **47**, 2048-2050.
- FENNEMA, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza. 1095 p.
- FERNANDO, S. M. & MURPHY, P. A. (1990). HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu. *J. Agric. Chem.*, **38**, 163-167.

- FINGLAS, P. M & MORGAN, M. R. A. (1994). Application of biospecific methods to the determination of B-group vitamins in food - a review. *Food Chem.*, **49**, 191-201.
- FINGLAS, P. M.; FAURE, U. & WAGSTAFFE, P. J. (1993). Improvements in the determination of vitamins in food through intercomparisons and preparation of RMs for vitamin analysis within the BCR programme. *Frenesius J. Anal. Chem.*, **345**, 180-184.
- FINGLAS, P. M. & FAULKES, R. M. (1984). The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. *Food Chem.*, **15**, 37-44.
- FINGLAS, P. M. & FAULKES, R. M. (1987). Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. *J. Micromut. Anal.*, **3**, 251-282.
- FISHER, J. H.; WILLS, R. A. & HASKELL, B. E. (1984). Effect of protein quality on vitamin B₆ status in the rat. *J. Nutr.*, **114**, 786-791.
- FRANCO, G. (1992). *Tabela de Composição Química de Alimentos*. 8^a ed. Livraria Atheneu Ed., Rio de Janeiro - São Paulo, 230p.
- GASSIN, A. L. (1991). Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. *Cah. Nutr. Diét.*, **XXVI** (1), 85-88.
- GENNARO, M.C.; GIACOSA, D. & ABRIGO, C. (1994). The role of pH of the mobile-phase in ion-interaction RP-HPLC. *J. Liquid Chrom.*, **17** (20), 4365-4380.
- GENNARO, M.C. (1991). Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase ion-interaction reagent HPLC: application to multivitamin pharmaceuticals. *J. Chrom. Sci.*, **29**, 410-415.
- GIESE, J. (1995) Vitamin and mineral fortification of foods. *Food Technol.*, **49** (5), 110-122.
- GONÇALEZ, E. J. (1994). Registro de alimentos enriquecidos. In: *I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos*. ITAL-UNICAMP, Campinas, S.P. p 22-24.
- GREENE, H. L.; HAMBIDGE, M.; SHANLER, R. & TSANG, R. (1988). Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **48**, 1324-1342.
- GREGORY, J. F. (1986). Chemical changes of vitamins during food processing. In: *Chemical changes in food during processing*. IFT Basic Symposium Series. Chicago. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 514p.
- GREGORY, J. F. & SARTAIN, D. B. (1991). Improved chromatographic determination of free and glycosylated forms of vitamin B₆ in foods. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 899-905.
- GREGORY, J. F. & KIRK, J. R. (1981). The bioavailability of vitamin B₆ in foods. *Nutr. Rev.*, **39** (1), 1-8.
- GUBLER, C. J. (1991). Thiamin. In: *Handbook of vitamins*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, New York, 595p.
- GUTHRIE, H. A (1986). Supplementation: a nutritionist's view. *J. Nutr. Educ.*, **18** (3), 130-132.
- HAGG, M. (1994). Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. *J. AOAC Int.*, **77** (3), 681-686.

- HENGGEN, N. & URIES, J. X. (1985). Nicotinic acid and nicotinamide. In: *Modern Chromatography Analysis of the vitamins*. Leenheer, A. e Lambert, W. E. (Ed.), Marcel Dekker, inc., New York, p 341-384.
- HIRAYAMA, S. & MARUYAMA, M. (1991). Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by HPLC. *J. Chrom.* **588**, 171-175.
- HOFFMANN, La Roche (1979). Vitamin nutrition and the american consumer. *Cereal Foods World*, **24** (6), 226-228.
- HOLLMAN, P. C.; BOENKE, A. & WAGSTAFFE, J. P. (1993a). The certification of major components and major elements in five food reference materials. *Frenesius J. Anal. Chem.*, **345**, 174-179.
- HOLLMAN, P. C.; SLANGEN, J. H.; WAGSTAFFE, J. P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T. & FINGLAS, P. M. (1993b). Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. *Analyst*, **118**, 481-488.
- HUNG, C. T. & TAYLOR, R. B. (1981). Mechanism of retention of acidic solutes by octadecyl silica using quaternary ammonium pairing ions as ion exchangers. *J. Chrom.*, **209**, 175-190.
- INK, S. L. (1988). Fiber-mineral and fiber-vitamin interactions. In *11th Basic Symposium by Institute of Food Technologists - Nutrient Interections*, Las Vegas, 1987. 1th ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 253-261.
- IWASE, H. (1992). Determination of nicotinamide and pyridoxine in an elemental diet by column switching HPLC with UV detection. *J. Chrom.*, **625**, 377-381.
- JOHNSON, L.; GORDON, H. T. & BORESTEIN, B (1988). Vitamin and mineral fortification of breakfast cereals. *Cereals Foods World*, **33** (3), 278-283.
- JOHNSTON, C. S. & YEN, M. F. (1994). Megadose of vitamin C delays insulin response to a glucose challenge in normoglycemic adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**, 735 - 738.
- KAMMAN, J. F.; LABUZA, T. P. & WARTHESEN, J. J. (1980). Thiamin and riboflavin analysis by HPLC. *J. Food Sci.*, **45**, 1497-1504.
- KATSUI, G (1972). *Pharmaceutical aplications of thin layer and paper chromatography*. K. Macek ed., Elsevier, Amsterdam, 470p.
- KAWASAKI, T. & SANEMORI H. (1985). Vitamin B₁; thiaminases. In: *Modern Chromatography Analysis of the vitamins*. Leenheer, A. e Lambert, W. E. (Ed.), Marcel Dekker, inc., New York, p 385-411.
- KILCAST, D. (1994). Effect of irradiation on vitamins. *Food Chem.*, **49**, 157-164.
- KILLEIT, U. (1994). Vitamin retention in extrusion cooking. *Food Chem.* **49**, 149-155.
- KIRCHHOEFER, R. D. & SHARON, H. (1993). Niacin I: dissolution profiles of sustained-release niacin products by automated and manual procedures. *J. AOAC Int.*, **76** (2), 394-398.
- KOTHARI, R. M. & TAYLOR, M. W. (1982). Simultaneous separation of water-soluble vitamins and coenzymes by reversed-phase HPLC. *J. Chrom.*, **247**, 187-192.
- KRETSCH, M. J.; SAUBERLICH, H. E.; SKALA, J. H. & JOHNSON, H. (1995). Vitamin B₆ requirement and status assessment: youn women fed a depletion diet followed by a plant- or animal-protein diet with graded amounts of vitamin B₆. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, 1091-1101.

- LAM, F. L.; HOLCOMB, I. J. & FUSARI, S. A. (1984). Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, piridoxine, thiamin and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. *J. AOAC*, **67** (5), 1007-1011.
- LAVIGNE, C.; ZEE, J. A.; SIMARD, R. E. & GOSSELIN, C. (1987). High performance liquid chromatographic-diode array determination of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in goats' milk. *J. Chrom.* **410**, 201-205.
- LEE, F. A. (1983). *Basic Food Chemistry*. 2th ed. Avi publishing company, Connecticut. 564p.
- LEE, H. A.; MILLS, E. N. C.; FINGLAS, P. M. & MORGAN, M. R. A (1990). Rapid biospecific methods of vitamin analysis. *J. Micromut. Analysis*, **7**, 261-270.
- LEKLEM, J. E. (1991). Vitamin B₆. In: *Handbook of vitamins*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, New York, 595p.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. & COX, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*. 2nd. Ed. Worth publishers, New York, 1013p.
- LEVEILLE, G. A. (1984). Food fortification. *Food Tech.* **38** (1), 58 - 63.
- LEVORATO, C. & LIMA, C. (1968). Thin-layer chromatography and determination of thiamine salts, phosphoric esters, disulphides and their respective thiochromes. *J. Chrom.*, **32**, 771.
- MACHLIN, L. J. (1991). *Handbook of vitamins*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 595p.
- MAEDA, Y.; YAMAMOTO, M.; OWADA, K. & SATO, S. (1989). Simultaneous Liquid Chromatographic determination of water-soluble vitamins, caffeine and preservative in oral liquid tonics. *J. AOAC*, **72** (2), 244-247.
- MARINI, D.; SORRENTINO, M.; BALESTRIERI, F. & MAGRI, A. L. (1988). Determinazione di tiamina, riboflavina e niacina in paste alimentari vitaminizzate. *Tec. Molitoria*, **39**, 1-7.
- MARLETTA, M. A. & LIGHT, D. R. (1985). Flavins. In: *Modern Chromatography Analysis of the vitamins*. Marcel Dekker, inc., New York, p 413-433.
- MATTERN, P. J. (1991). Wheat. In: *Handbook of Cereals Science and Technology*. Ed. Lowrenz, New York, 882p.
- MAURO, D. J. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using seletive detection. *J. Chrom.*, **299**, 281-287.
- MAXWELL, D. P. E. (1990). Cost-control implications of nutrient fortification. *Prepared Food*, **Feb.**, 87-88.
- MILLER, L. T.; LEKLEM, J. E. & SHULTZ, T. D. (1985). The effect of dietary protein on the metabolism of vitamin B₆ in humans. *J. Nutr.* **115**, 1663-1672.
- MIRA, M; STEWART, P. M. & ABRAHAM S. (1989). Vitamin and trace element status of women with disordered eating. *Am. J. Nutr.* **50**, 940-944.
- MUÑOZ, A; ORTIZ, R. & MURCIA, M. A. (1994). Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and non dairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chem.*, **49**, 203-206.
- NAS - NCR. National Research Council, National Academy of Science (1989). *Recommended Dietary Allowances*. 10th. Ed. National Academy Press, Washington, 283p.
- NEWSOME, R. (1987). Use of vitamins as additives in processed foods. *Food Tech.*, **14** (9), 163-168.

- OAMEN, E. E.; HANSEN, A. P. & SWARTZEL, K. E. (1989). Effect of ultra high temperature steam injection processing and aseptic storage on labile water-soluble vitamins in milk. *J. Dairy Sci.* **72**, 614-619.
- OHTA, H; MAEDA, Y. N.; YOZA, K.; TAKEDA & Y. OSAJIMA, Y. (1993). A simple determination of thiamine in rice (*Oriza sativa* L.) by HPLC with post-colum derivatization. *J. Liq. Chromat.*, **16** (12), 2617-2629.
- POLESELLO, A. & RIZZOLO, A. (1990). Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1985-1989). *J. Micronut. Anal.*, **8**, 105-158.
- POLESELLO, A. & RIZZOLO, A. (1986). Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1981-1985). *J. Micronut. Anal.*, **2**, 153-187.
- PREMARATNE, R. J. & COUSIN, M. A. (1991). Changes in the chemical composition during ultrafiltration of skim milk. *J. Dairy Sci.* **74**, 788-795.
- RANHOTRA, G. S. (1991). Nutritional quality of cereals and cereal-based foods. In: *Handbook of Cereals Science and Technology*. Ed. Lowrenz, New York, 883p.
- RANHOTRA, G. S. & GELROTH, J. A. (1986). Stability of enrichment vitamins in bread and cookies. *Cereal Chem.*, **63** (5), 401-403.
- RANHOTRA, G. S. & GELROTH, J. A.; NOVAK, F. A. & MATTHEUS, R. H. (1985). Retention of selected B vitamins in cooked pasta products. *Cereal Chem.*, **62** (6), 476-477.
- RANUM, P. (1991). Cereal enrichment. In: *Handbook of Cereals Science and Technology*. Ed. Lowrenz, New York. 882p.
- RANUM, P.; BARRET, F.F.; LOEWE, R. J. & KULP, K. (1982). Tenori nutritivi delle farine macinate in base ai metodi internazionali. *Tec. Molitoria*, **33** (2), 107-117.
- REEVE, V. E.; BOSNIC, M.; WILCOX, C. B. & COPE, R. B. (1995). Pyridoxine supplementation protects mice from suppression of contact hypersensitivity induced by 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole (THI), ultraviolet B radiation (280 - 320 nm), or cis-urocanic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 571 - 576.
- REYNOLDS, R. D. (1988). Bioavailability of vitamin B₆ from plants foods. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**, 863 - 867.
- RICHARDSON, D. P. (1990). Vitamin fortification and implications for health. *J. Micronut. Anal.*, **7**, 223-227.
- RIZZOLO, A. & POLESELLO, S. (1992). Review: Chromatographic determination of vitamins in foods. *J. Chrom.*, **624**, 103-152.
- ROBINSON, D. S. (1991). Elementos químicos y vitaminas como nutrientes. In: *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, 516p.
- ROOS, R. W. & LAU-CAM, C. A. (1986). General reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the separation of drugs using triethylamine as a competing base. *J. Chrom.*, **370**, 403-418.
- RUSIG, O. (1994). Formas comerciais de vitaminas e minerais. In: *I Seminário Brasileiro sobre Alimentos Enriquecidos*. ITAL-UNICAMP, Campinas, p 27-31.
- RUSSEL, L. F. & VANDERSLICE, J. T. (1992). Comments on the standard fluorometric determination of riboflavin in foods and biological tissues. *Food Chem.*, **43**, 79-82.

- SAMPSON, D. A.; EOFF, L. A.; YAN, X. L. & LORENZ, K. (1995). Analysis of free and glycosylated vitamin B₆ in wheat by HPLC. *Cereal Chem.*, **72** (2), 217-221.
- SAPERS, G. M. (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technol.*, **47** (10), 75 - 83.
- SCHAUMBURG, H.; KAPLAN, J.; WINDEBANK, A.; VICK, N.; RASMUS, S.; PLEASURE, D. & BROWN, M. J. (1983). Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. *New Eng. J. Med.*, **309** (8), 445 - 453.
- Van SCHOONHOVEN, J.; SCHRIJVER, J.; BERG, H. & HAENEN, G. R. M. M. (1994). Reliable and sensitive HPLC method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B₆ in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1475-1480.
- SGARBIERI, V. C. (1986). Nutrição e tecnologia de alimentos. *Bol. SBCTA*, **20** (3/4), 115 - 139.
- SILVA, L. B. & MONNERAT, M. P. (1986). *Alimentação para Coletividades*. 2ª ed. Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 246p.
- SIMÃO, A. M. (1986). *Aditivos para Alimentos, sob o Aspecto Toxicológico*. 2ª ed. Ed. Nobel, 274p.
- SKURRAY, G. R. (1981). A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamin in foods. *Food Chem.* **7**, 77-80.
- STANCHER, B. & ZONTA, F. (1986). High performance liquid chromatography analysis of riboflavin (vitamin B₂) with visible absorbance detection in Italian cheeses. *J. Food Sci.*, **51** (3), 857-858.
- STEINER, E. H. (1982). Planning and analysis of results of collaborative tests. In: *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. 3th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 88p.
- TANAKA, A.; IJIMA, M.; KIKUCHI, Y.; HOSHINO, Y. & NOSE, N. (1989) Gas Chromatographic determination of nicotinamide in meats and meat products as 3-cyano pyridine. *J. Chrom.*, **446**, 307.
- TOMA, R. B. & TABEKHIA, M. M. (1979). HPLC analysis of B vitamins in rice and rice products. *J. Food Sci.*, **44** (1), 263-265.
- TORÚN, B. (1988). Energy-nutrient interactions. In: *Nutrient Interactions*. 1ª ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 385p.
- ULBERTH, F. (1993). Optimizing methods by ruggedness testing. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. *International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. Int. Dairy Federation, Belgica, **9302**, 202-203.
- VANDERSLICE, J. T.; BROWNLEE, S. G.; CORTISSOZ, M. E. & MAIRE, C. E. (1985). Vitamin B₆ analysis: sample preparation, extraction procedures, and chromatographic separations. In: *Modern Chromatography Analysis of the vitamins*. Leenheer, A. e Lambert, W. E. (Ed.), Marcel Dekker, inc., New York, p 435-475.
- VARGAS, E. F.; VILLANUEVA, M. T. O. & MARQUINA, A. D. (1995). Incidencia de la condimentación tradicional y microondas en el contenido en vitaminas hidrossolubles en coles: repollo y coliflor. I. Tiamina y riboflavina. *Alimentaria*, **abril**, 111-117.
- VELISEK, J.; DAVIDEK, J.; MNUKOVA, J. & PISTEK, J. (1986) Gas chromatographic determination of thiamin in foods. *J. Micronut. Anal.*, **2**, 73.
- VIDAL-VALVERDE, C. V. & RECHE, A. (1991). Determination of available niacin in legumes and meat by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 116-121.

- VOIGT, M. & EITENMILLER, R. R. (1985). Microbiological Assays. In: *Methods of Vitamin Assay*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 590p.
- WAGSTAFFE, P. J. (1993). Metrological requeriments for analytical quality assurance and the need for reference materials. In: *Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. *Int. Dairy Federation, Belgica*, 9302, 41-51.
- WALTER, P. (1994). Vitamin Requeriments and enrichment of foods. *Food Chem.*, 49, 113-117.
- WATERHOUSE, D. R. (1990). Nutrition and the consumer. *J. Micronut. Analysis*, 7, 173-176.
- WATSON, J. J. (1981). Development of food fortification. *Cereal Foods World*, 26 (12), 662-665.
- WEHLING, R. L. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin and thiamin in fortified cereals products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1326-1331.
- WERNIMONT, G. T. (1985). *Use of statistics to develop and avaluate analytical methods*. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, 183p.
- WILLARD, H. H.; MERRIT, Jr., L. L.; DEAN, J. A.; SETTLE, Jr., F. A. (1988). *Instrumental Methods of analysis*. 7th ed. Wadsworth publishing company, USA, 895p.
- WILLIAMS, A. (1993). The evident (and urgent) need for analytical quality assurance. In: *Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. *Int. Dairy Federation, Belgica*, 9302, 13-19.
- WILLS, R. B. H.; SHAW, C. G. & DAY, W. R. (1977). Analysis of water-soluble vitamins by HPLC. *J. Chrom. Sci.*, 15, 262-266.
- WILLS, R. B. H.; WIMALASIRI, P. & GREENFIELD, H. (1985). Comparative determination of thiamin and riboflavin in foods by HPLC and fluorometric methods. *J. Micronut. Anal.*, 1, 23-29.
- WILRICH, P. (1993a). Role of statistics in analytical quality assurance. In: *Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. *Int. Dairy Federation, Belgica*, 9302, 61-79.
- WILRICH, P. (1993b). Importance of the limit of detection and the limit of determination in chemical analysis and their statistical assessment. In: *Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. *Int. Dairy Federation, Belgica*, 9302, 190-201.
- WIMALASIRI, P. & WILLS, R. B. H. (1985). Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. *J. Chrom.*, 318, 412-416.
- YOU DEN, W. J. (1982). Statistical techniques for collaborative tests. In: *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. 3th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 88p.
- ZEMPLINI, J.; GALLOWAY, J. R. & McCORMICK, D. B. (1996). Pharmacological of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 54-56.

Capítulo 2

Avaliação das etapas na determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em biscoitos enriquecidos

AVALIAÇÃO DAS ETAPAS ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE¹, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM BISCOITOS ENRIQUECIDOS

Resumo

Vários trabalhos, encontrados na literatura, promovem a determinação simultânea de vitaminas hidrossolúveis, por CLAE, em formulações farmacêuticas e premix. Entretanto, a determinação destes compostos, em alimentos, envolve alguns desafios, em função da baixa concentração em que se encontram e da presença de interferentes provenientes da matriz. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar as etapas analíticas para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, por CLAE, com possibilidade de aplicação em alimentos enriquecidos. O procedimento de extração, com ácido sulfúrico diluído, feito através de vibração ultrasônica, e limpeza do extrato, promovida pela adição de metanol e refrigeração, forneceram os melhores resultados. A melhor separação das vitaminas foi obtida em colunas C18, com eluição por gradiente, em vazão de 0,7 mL/min, utilizando 1% de acetonitrila e 99% de fase aquosa (SHA² 5mM; 0,15% de TEA³; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 5% de acetonitrila, 50% de fase aquosa e 45% de metanol, em 23 min de corrida. A detecção das vitaminas, feita na região do ultra-violeta, foi satisfatória, em função da elevada concentração em que estas se encontram nos alimentos enriquecidos. A quantificação, por curva de padronização externa, mostrou-se mais conveniente do que aquela feita por padronização interna.

¹ Cromatografia líquida de alta eficiência

² Ácido hexano-sulfônico

³ Trietilamina

Abstract

Various papers found in the literature promote the simultaneous determination of water soluble vitamins by HPLC¹ in pharmaceutical formulations and premixes. However the determination of these compounds in foods presents some challenges due to their low concentration and the presence of interfering substances in the matrix. Thus the objective of this study was to evaluate the analytical stages of the simultaneous determination by HPLC of vitamins B₁, B₂, B₆, nicotinic acid and nicotinamide, with the possibility of applying the procedure to enriched foods. The best results were obtained using an extraction procedure with dilute sulphuric acid and ultrasonic vibrations and a clean-up of the extract by the addition of methanol and refrigeration. The best separation of the vitamins was obtained using a C 18 column, flux of 0.7 mL/min, and a gradient starting at 1% acetonitrile plus 99% aqueous phase (5 mM SHA; 0.15% TEA, pH adjusted to 2.8 with dilute H₂SO₄), changing to 3% acetonitrile plus 97% aqueous phase after 3 minutes and 5% acetonitrile, 50% aqueous phase and 45% methanol after 23 minutes. Satisfactory detection of the vitamins was obtained in the ultraviolet region due to the higher concentrations found in the enriched foods. Quantification using external standard curves was found to be more convenient than the use of internal standards.

2.1 Introdução

A perda de nutrientes, durante o processamento de alimentos, é um problema crescente e tem incentivado, cada vez mais, o enriquecimento destes para a manutenção dos padrões nutricionais. O enriquecimento de alimentos com vitaminas tem sido uma prática comum em vários países como EUA [MAXWELL, 1990], Rússia [AUGUSTIN *et alii*, 1982], Canadá [RANUM, 1991], França [GASSIN, 1991], Suíça [WALTER, 1994] e Inglaterra

¹High performance liquid chromatography

[RICHARDSON, 1990]. A farinha de trigo, os pães, os biscoitos e os cereais matinais são os alimentos tradicionalmente enriquecidos com as vitaminas do complexo B. No Brasil, além dos biscoitos e dos cereais matinais, o processo de enriquecimento de alimentos, com estas vitaminas, vem incluindo uma ampla variedade de produtos.

A disponibilidade de métodos analíticos mais apropriados ao trabalho é importante para agilizar a fiscalização e o controle de qualidade dos alimentos. A determinação das vitaminas hidrossolúveis em alimentos apresenta muitos desafios, mesmo com a utilização da CLAE, os quais incluem o melhoramento nos procedimentos de extração e limpeza e o desenvolvimento de métodos simultâneos [POLESELLO e RIZZOLO, 1990; MACRAE, 1990; POLESELLO e RIZZOLO, 1986].

Vários trabalhos têm apresentado a separação e identificação das vitaminas do complexo B através da CLAE, em premix e/ou preparações farmacêuticas [GENNARO, 1991; DONG *et alii*, 1988; KOTHARI e TAYLOR, 1982; LAM *et alii*, 1984]. Geralmente as amostras são dissolvidas diretamente na fase móvel, sem necessidade de procedimentos de extração e limpeza. Entretanto, o procedimento de extração das vitaminas em alimentos, geralmente, envolve extensiva hidrólise ácida, para romper os complexos protéicos, e enzimática, para converter as vitaminas fosforiladas em sua forma livre, produzindo, desta forma, um extrato que contém quantidades ainda maiores de interferentes [HOLLMAN *et alii*, 1993; CHASE *et alii*, 1992; MARINI *et alii*, 1988; DAWSON *et alii*, 1988; BERGLUND *et alii*, 1987; TOMA e TABEKHIA, 1979]. A etapa de extração constitui a mais importante fonte de variação na determinação de vitaminas do complexo B em alimentos [HOLLMAN *et alii*, 1993; GREGORY e SARTAIN, 1991].

Os cartuchos Sep Pak, a precipitação no ponto isoelétrico e a precipitação com ácido tricloroacético e acetato de chumbo têm sido utilizados na purificação dos extratos para determinação das vitaminas do complexo B em alimentos [MUNOZ *et alii*, 1994;

DAWSON *et alii*, 1988; WIMALASIRI e WILLS, 1985; WILLS *et alii*, 1985; FELLMAN *et alii*, 1982].

Embora as condições cromatográficas sejam as mais diversas, as colunas de fase reversa são utilizadas com maior frequência. Poucos trabalhos fazem uso de gradiente [BLANCO *et alii*, 1994; GREGORY e SARTAIN, 1991; KOTHARI e TAYLOR, 1982], sendo que a eluição das vitaminas hidrossolúveis geralmente é isocrática. As fases móveis utilizadas são bastante complexas, devido as características das próprias vitaminas. O metanol tem se apresentado como o melhor modificador orgânico da fase móvel [DONG *et alii*, 1988], entretanto alguns pesquisadores também têm utilizado acetonitrila em seus estudos [CHASE e SOLIMAN, 1990; MAEDA *et alii*, 1988]. Soluções tampão, também, são frequentemente utilizadas nestas determinações [AKIYAMA *et alii*, 1990; KOTHARI e TAYLOR, 1982]. Em função da presença de vitaminas iônicas, a adição de par iônico tem se mostrado fundamental para a obtenção de uma boa resolução entre essas vitaminas. O ácido hexano sulfônico (SHA), em concentrações que variam de 4 a 7 mM na fase móvel, tem sido o par iônico mais utilizado, principalmente por interferir na retenção das vitaminas catiônicas [DONG *et alii*, 1988]. O ácido acético e a trietilamina (TEA) também têm sido usados satisfatoriamente como aditivos da fase móvel.

A técnica de detecção, normalmente utilizada na determinação de vitaminas hidrossolúveis em premix e preparações farmacêuticas, é feita por absorção na região do ultravioleta. No entanto, quando alguns alimentos exigem um detector mais sensível e específico, devido ao efeito da matriz e das baixas concentrações das vitaminas presentes, a fluorescência tem sido a técnica preferida [CHASE *et alii*, 1993; AUGUSTIN, 1984].

A identificação dos picos, na grande maioria dos trabalhos publicados, é feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões e por co-eluição. A quantificação geralmente é feita através de curvas de padronização externa, entretanto o ácido m-hidroxibenzóico e a acetanilida têm sido apresentados como padrões internos [CHASE e SOLIMAN, 1990; MAEDA *et alii*, 1988].

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar as etapas analíticas para a determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e nicotinamida em biscoitos enriquecidos, visando conhecer melhor o efeito de alguns parâmetros nessa determinação.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material

As amostras de biscoitos maria e de maisena (marca comercial grafada com Z, registrada), enriquecidos com as vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP (1,20; 1,80; 2,40; e 22,0 mg/200g, respectivamente), foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas, SP, e homogeneizadas em multiprocessador de alimentos.

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆), ácido nicotínico (vitamina PP) e nicotinamida (vitamina PP) foram cedidos pela F. HOFFMANN-LA ROCHE Ltda, São Paulo, Brasil. A enzima claradiastase foi fornecida pela FLUKA, Alemanha. O sal sódico do 1-ácido hexanosulfônico, aproximadamente 98%, foi fornecido pela SIGMA Chemicals Co, USA. O metanol (*ominsolv*) e a trietilamina (para síntese) foram fornecidos pela MERCK, Alemanha. A acetonitrila com pureza cromatográfica foi fornecida pela MERCK, Brasil. Todos os outros reagentes químicos utilizados apresentaram grau de pureza analítico e foram obtidos no comércio local. A água utilizada no preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros MILLIPORE, com poros de 0,45 µm de diâmetro, e degaseificadas em banho ultra-sônico. Foram utilizadas as colunas Micropak ODS¹-1 10 µm 300 x 4,0 mm VARIAN; Bondesil

¹ Octadesil silano

ODS-1 5 μ m 150 x 4,6mm VARIAN; Spherisorb ODS-2, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, SIGMA-ALDRICH, USA e Spherisorb ODS-2, 5 μ m, 150 x 4,6 mm, SIGMA-ALDRICH, USA.

O equipamento utilizado, durante as determinações por eluição isocrática, foi um cromatógrafo a líquido HP (HEWELETT-PACKARD) modelo 9010, sistema de injeção manual tipo “Rheodyne”, equipado com *loop* de 20 μ L e detector de arranjo de diodos HP, modelo 1050. Acoplado a esse sistema um integrador HP, modelo 3393 A. O equipamento utilizado, durante as determinações com eluição por gradiente, foi um cromatógrafo a líquido VARIAN com bomba ternária, modelo 9010, sistema de injeção manual tipo “Rheodyne”, equipado com *loop* de 20 μ L e detector policromático de arranjo de diodos, modelo 9065. Acoplado a esse sistema um integrador VARIAN, modelo 4400.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Avaliação dos parâmetros cromatográficos

a) Composição da fase móvel e sistema de eluição

A composição da fase móvel foi avaliada verificando-se a influência da presença de cada reagente, ou de variações nas concentrações dos mesmos, sobre a resolução dos padrões das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e nicotinamida, utilizando-se uma coluna Micropak C18 10 μ m 300 x 4,0 mm e sistema de eluição isocrática. A composição de cada fase móvel é descrita, para cada situação, em anexo aos resultados apresentados. Os modificadores orgânicos, metanol e acetonitrila, foram testados em concentrações variadas, mantendo-se constante os outros componentes da fase móvel. A presença de tetraidrofurano foi avaliada na concentração de 1%, durante testes de eluição por gradiente. A TEA, o ácido acético (HAc) e o SHA foram os aditivos testados. O efeito dos ácidos fosfórico e sulfúrico foi testado durante avaliações do sistema de eluição por gradiente.

A influência do sistema de eluição, na resolução das vitaminas, foi avaliado com utilização de coluna Bondesil ODS-1, 5 μ m, 150 x 4,6mm. A fase móvel utilizada, com a eluição isocrática, foi composta de metanol:HAc:água (30:1:69), contendo 0,12% de TEA e SHA 5mM. A eluição por gradiente foi desenvolvida com HAc 1%, contendo 0,12% de TEA e SHA 5mM no início da corrida, tempo a partir do qual foi utilizado um gradiente linear programado para atingir 25% de acetonitrila, em 20 min. A vazão foi de 0,7 mL/min.

b) Colunas de fase reversa

A eficiência de algumas colunas C18 (caracterizadas no item 2.2.1) foi avaliada, utilizando-se as fases móveis mais adequadas para cada tipo. As colunas foram protegidas por colunas de guarda, empacotadas no laboratório com o mesmo material da coluna analítica utilizada.

2.2.2.2 Avaliação dos procedimentos de clarificação do extrato

O extrato foi preparado com 20g de biscoito maria enriquecido, previamente homogeneizado em multiprocessador. De acordo com os métodos tradicionais, as vitaminas foram extraídas com 200mL de ácido clorídrico 0,1N em banho maria, por 30 min. O pH foi ajustado para 4,5 com acetato de sódio. Após a adição de 2g de clardiastase, a hidrólise enzimática seguiu por uma noite, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O extrato foi filtrado e subdividido em frações, que foram submetidas aos procedimentos de clarificação, apresentados a seguir. Os mesmos procedimentos foram repetidos paralelamente com padrões (misturas vitamínicas).

- a) 25 mL de extrato + água qsp 50 mL;
- b) 25 mL de extrato + 6 mL de ferrocianeto de potássio 0,25M + 6 mL de acetato de zinco 1M + água qsp 50 mL;
- c) 25 mL de extrato + 5 mL de acetato de chumbo 20% + água qsp 50 mL;
- d) 25 mL de extrato + 10 mL de ácido tricloroacético 50% + sulfato de amônio (sat.) + água qsp 50 mL →, banho maria por 15 min.;
- e) 25 mL de extrato + 25 mL de clorofórmio → partição → água qsp 50 mL;
- f) 25 mL de extrato → precipitação no ponto isoelétrico com ácido sulfúrico 10% → filtração → água qsp 50mL;
- g) 20 mL de extrato + metanol qsp 50 mL → refrigeração à -18°C, por 60 min;
- h) purificação em Sep-Pak C18:
 - condicionamento do Sep-Pak C18 com HCl 0,1N, contendo SHA 5mM;
 - injeção de 1 mL de extrato;
 - limpeza do Sep-Pak com 1 mL de HCl 0,1N, contendo SHA 5mM;
 - eluição das vitaminas com 1 mL de metanol 60%.

Após os tratamentos, os extratos foram filtrados em membrana fluoropore (FHLP 01300 MILLIPORE), com poros de 0.5 μ m, e injetados no cromatógrafo, utilizando coluna Bondesil ODS-1 5 μ m 150 x 4,6mm. As vitaminas foram eluídas por gradiente, com vazão de 0,7 mL/min, com uma fase móvel aquosa contendo SHA 5mM, 1% de HAc e 0,15% de TEA, no início da corrida, em gradiente linear até 75% de fase aquosa e 25% de acetonitrila, em 20 min.

2.2.2.3 Avaliação dos procedimentos de extração

A extração das vitaminas foi realizada em triplicata, com 5 g de biscoito de maisena enriquecido, previamente homogeneizado em multiprocessador. Todos os procedimentos

foram conduzidos à temperatura ambiente, salvo aqueles em que a temperatura foi especificada:

- a) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → aquecimento em banho maria, por 30 min → ajuste de pH 4,5, com acetato de sódio → adição de 0,5 g de claradiastase → hidrólise por 1 noite, com proteção da luz;
- b) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1N → homogeneização em agitador mecânico por 60 min, sem proteção da luz;
- c) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → vibração ultra-sônica por 60 min, com proteção da luz;
- d) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → aquecimento em banho maria por 30 min, com proteção da luz;
- e) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → aquecimento em autoclave a 120°C, por 15 min, com proteção da luz;
- f) biscoito + 45 mL de ácido clorídrico 0,1 N → vibração ultra-sônica por 60 min, com proteção da luz;
- g) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → vibração ultra-sônica por 45 min, com proteção da luz;
- h) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → vibração ultra-sônica por 90 min, com proteção da luz;
- i) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → vibração ultra-sônica por 120 min, com proteção da luz;
- j) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 1 N → vibração ultra-sônica por 60 min, com proteção da luz;
- l) biscoito + 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N → vibração ultra-sônica por 60 min, sem proteção da luz.

Os extratos tiveram os volumes completados para 100 mL com metanol, etapa seguida de refrigeração à -18°C, por 60 min. Os mesmos foram filtrados em membrana fluoropore (MILLIPORE - FHLP 01300), com poros de 0.5 µm, e injetados no cromatógrafo, utilizando-se coluna Spherisorb ODS-2, 5 µm, 150 x 4,6 mm. As vitaminas foram eluídas por gradiente, em vazão de 0,7 mL/min, com 1% de acetonitrila e 99% de fase aquosa (SHA 5mM; 0,15% de TEA; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa, em 3 min, e 5% de acetonitrila, 50% de fase aquosa e 45% de metanol, em 23 min de corrida.

2.2.2.4 Detecção e identificação

Os picos foram detectados através de detector de arranjo de diodos a 254 nm até 9 min., 287 nm entre 9 e 15 min. e 254 nm entre 15 e 23 min. A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros de absorção obtidos pelo detector de arranjo de diodos.

2.2.2.5 Avaliação dos procedimentos de quantificação

As curvas de padronização externa foram realizadas com 1, 4, 8, 12, 16 e 20 mL de solução padrão contendo 4,75; 4,02; 6,11; 52,70 e 10,18 µg/100 mL das vitaminas B₁, B₂, B₆, nicotinamida e niacina, respectivamente. As alíquotas foram diluídas para 45 mL com água e para 100 mL com metanol, imediatamente filtradas e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as mesmas condições do item 2.2.4.3.

A acetanilida e o ácido m-hidroxibenzóico foram testados como padrões internos na determinação das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e nicotinamida.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1 Avaliação dos parâmetros cromatográficos

2.3.1.1 Fase móvel

a) Modificador orgânico

O ácido nicotínico e a nicotinamida foram eluídos da coluna C18 com baixas concentrações de metanol e/ou acetonitrila. Porém, para uma eluição mais rápida, a vitamina B₂ necessitou maiores concentrações desses solventes orgânicos (Figuras 2-1 e 2-2), sendo que a acetonitrila provocou maior influência na retenção das vitaminas, por unidade de concentração na fase móvel, do que o metanol. A vitamina B₆ apresentou dois picos cromatográficos, correspondentes às formas iônicas presentes nessas condições. Os picos correspondentes às vitaminas B₁ e B₆ apresentaram caudas e alargamentos de banda.

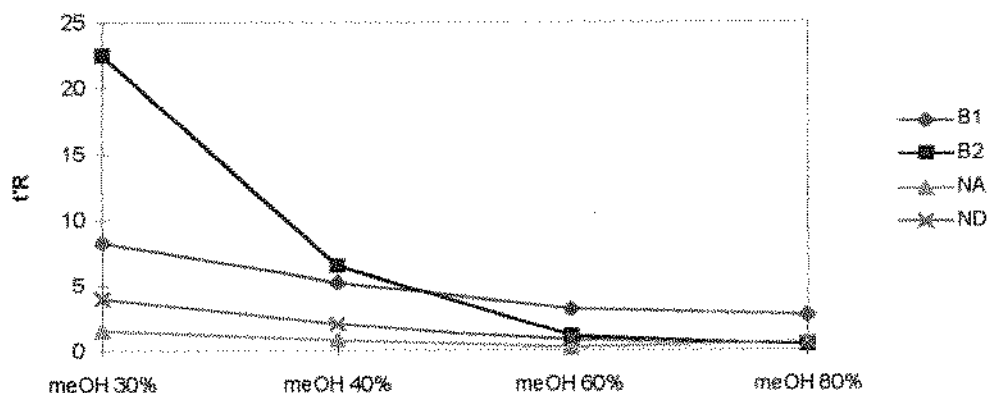


Figura 2-1- Efeito da concentração de metanol na retenção das vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND). Coluna: Micropak ODS-1, 10 µm, 300 x 4,0 mm. Fase móvel: metanol, água, TEA (0,2%), HAc (pH 7,0). Vazão: 0,7 mL/min.

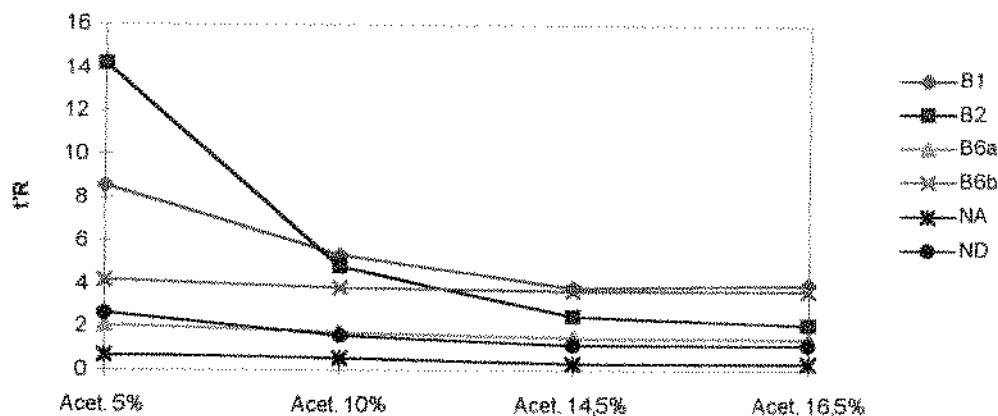


Figura 2-2 Efeito da concentração de acetonitrila na retenção das vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND). Coluna: Micropak ODS-1 10 μm 300 x 4,0 mm. Fase móvel: acetonitrila, metanol (25%), água, TEA (0,2%), HAc (pH 7,0). Vazão: 0,7 mL/min.

b) Aditivos

As diferentes concentrações de TEA, praticamente, não apresentaram influência na retenção das vitaminas B₂, ácido nicotínico e nicotinamida. Entretanto, a concentração crescente deste aditivo reduziu significativamente a retenção da vitamina B₁ e aumentou a retenção de uma das formas da vitamina B₆ (Figura 2-3).

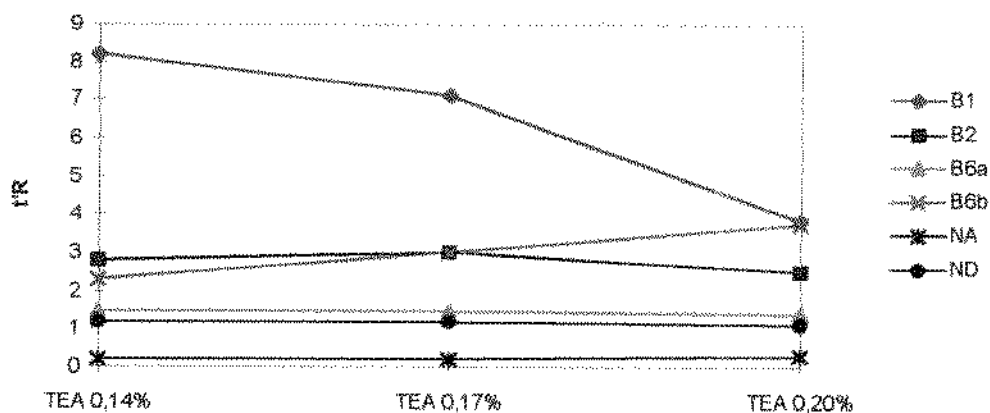


Figura 2-3 Efeito da concentração de TEA na retenção das vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND). Coluna: Micropak ODS-1, 10 μm 300 x 4,0 mm. Fase móvel: TEA, metanol (25%), acetonitrila (14,5%), água (60,5%), HAc (pH 7,0). Vazão: 0,7 mL/min.

O ácido acético apresentou pequena influência na retenção das vitaminas B₂, ácido nicotínico e nicotinamida, entretanto reduziu drasticamente a retenção das vitaminas B₁ e B₆ (**Figura 2-4**), além de eliminar as caudas e os alargamentos de banda. Com a adição de ácido acético na fase móvel, a vitamina B₆ apresentou apenas uma forma iônica. A presença de SHA, na concentração de 5mM, promoveu um aumento significativo na retenção das vitaminas B₁ e B₆. Observando a **Figura 2-5**, os valores de retenção das vitaminas decrescem com o aumento da concentração de metanol, quando o teor de SHA é mantido constante (5mM). Entretanto, as vitaminas B₁ e B₆ apresentam t'_R (tempo de retenção corrigido) igual a zero, quando eluídas com 25% de metanol, na ausência de SHA. Os valores de retenção são muito menores do que os valores esperados, se a concentração de SHA fosse 5mM, nessa concentração de metanol.

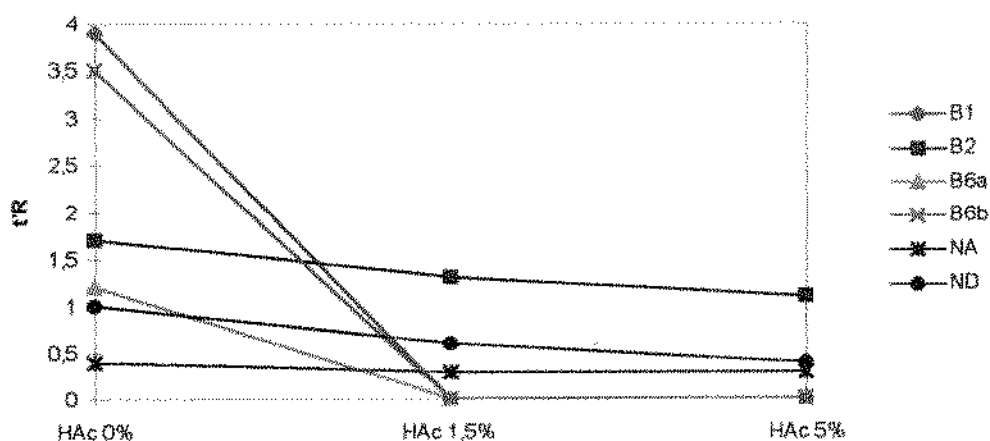


Figura 2-4 Efeito do ácido acético na retenção das vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND). Coluna Micropak ODS-1, 10 μm 300 x 4,0 mm Fase móvel: HAc, acetonitrila (16,5%), metanol (25%), água (58,3%), TEA (0,2%). Vazão: 0,7 mL/min.

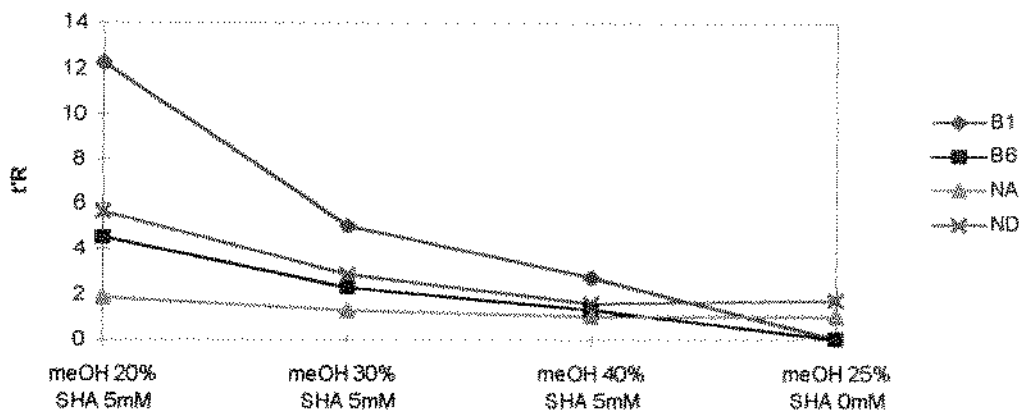


Figura 2-5 Efeito da presença de SHA na retenção das vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND). Coluna Micropak ODS-1, 10 μm 300 x 4,0 mm. Fase móvel: SHA, metanol, água, TEA (0,2%), HAc 1%. Vazão: 0,7 mL/min.

c) Sistema de eluição

O sistema isocrático não se mostrou satisfatório para determinação das vitaminas do complexo B em biscoitos, pois a concentração de modificador orgânico necessário para eluir a riboflavina e a tiamina, com boa resolução, não permitiu a retenção satisfatória das vitaminas B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, que foram eluídas com tempos de retenção muito próximos ao volume morto (**Figura 2-6 a**). Nestas condições, grande parte dos interferentes, presentes nos extratos vitamínicos de biscoitos, foram eluídos no início da corrida, mascarando as vitaminas de interesse.

O sistema de eluição por gradiente, com baixa concentração de modificador orgânico no início da corrida, programado para um aumento linear na concentração de solventes, favoreceu a boa resolução das vitaminas do complexo B (**Figura 2-6 b**), além de aumentar as opções de separação dos compostos interferentes da matriz alimentícia. A presença de 1% de tetraidrofurano na fase móvel apresentou um efeito de redução na retenção das vitaminas B₁ e B₆. A acetonitrila comportou-se satisfatoriamente no início da

corrida cromatográfica e a combinação desta com o metanol mostrou-se vantajosa na obtenção de picos bem resolvidos e na separação de interferentes presentes no extrato.

A substituição do ácido acético por ácido sulfúrico ou fosfórico, na composição da fase móvel utilizada durante a eluição por gradiente, reduziu drasticamente a retenção da nicotinamida, permitindo a separação entre esta vitamina e compostos interferentes presentes no extrato.

Desta forma, a composição da fase móvel, que forneceu melhor resolução para as vitaminas, foi obtida com eluição por gradiente, em vazão de 0,7 mL/min, com 1% de acetonitrila e 99% de fase aquosa (SHA 5mM; 0,15% de TEA; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 5% de acetonitrila, 50% de fase aquosa e 45% de metanol, em 23 min de corrida.

2.3.1.2 Coluna

As colunas com partículas de 5µm apresentaram melhor resolução, para todas as vitaminas, do que aquela com partículas de 10µm. No entanto, entre as colunas de 5µm, a piridoxina apresentou maior alargamento de banda com a utilização das colunas ODS-2 do que com a utilização da coluna ODS-1, sendo que, para as demais vitaminas, a eficiência da coluna ODS-2 foi maior. O alargamento de banda, apresentado pela piridoxina, foi maior com a coluna ODS-2 de 250 mm de comprimento do que com a de 150 mm. Além disso, a grande elevação da pressão, causada pela utilização de coluna com partículas de 5 µm, com 250mm de comprimento, impossibilitou a utilização desta coluna.

2.3.2 Avaliação dos procedimentos de clarificação do extrato

Nenhum dos procedimentos de clarificação testados apresentou limpeza satisfatória, com eliminação dos interferentes do extrato vitamínico de biscoitos. Entre os agentes precipitantes, apenas o ferricianeto de potássio, utilizado em conjunto com o acetato de zinco, reduziu os compostos interferentes do extrato, entretanto adsorveu, também, as vitaminas de interesse. A precipitação do extrato com TCA e sulfato de amônia acrescentou interferência na área de eluição do ácido nicotínico - NA (**Figuras 2-6 c, d**). A partição do extrato com clorofórmio e a precipitação no ponto isoelétrico também não foram suficientemente satisfatórios para a eliminação dos interferentes dos extratos de biscoitos. Os cartuchos Sep-Pak não apresentaram nenhum efeito positivo frente aos interferentes.

A adição de metanol no extrato vitamínico, seguida de refrigeração à -18°C por 60 min, apresentou-se como uma medida prática de clarificação do extrato, principalmente como forma de prevenir a precipitação de compostos indesejáveis na coluna cromatográfica.

2.3.3 Avaliação dos procedimentos de extração

A hidrólise enzimática da matriz alimentícia com claradiastase libera mais interferentes (**Figura 2-7 a**), que dificultam tanto a identificação quanto a quantificação das vitaminas. Misturas enzimáticas, contendo fosfatases, são frequentemente utilizadas na determinação das vitaminas B₁, B₂, e B₆ naturalmente presentes nos alimentos. Entretanto, as vitaminas adicionadas aos alimentos enriquecidos encontram-se na forma livre, dispensando a utilização de tal enzima.

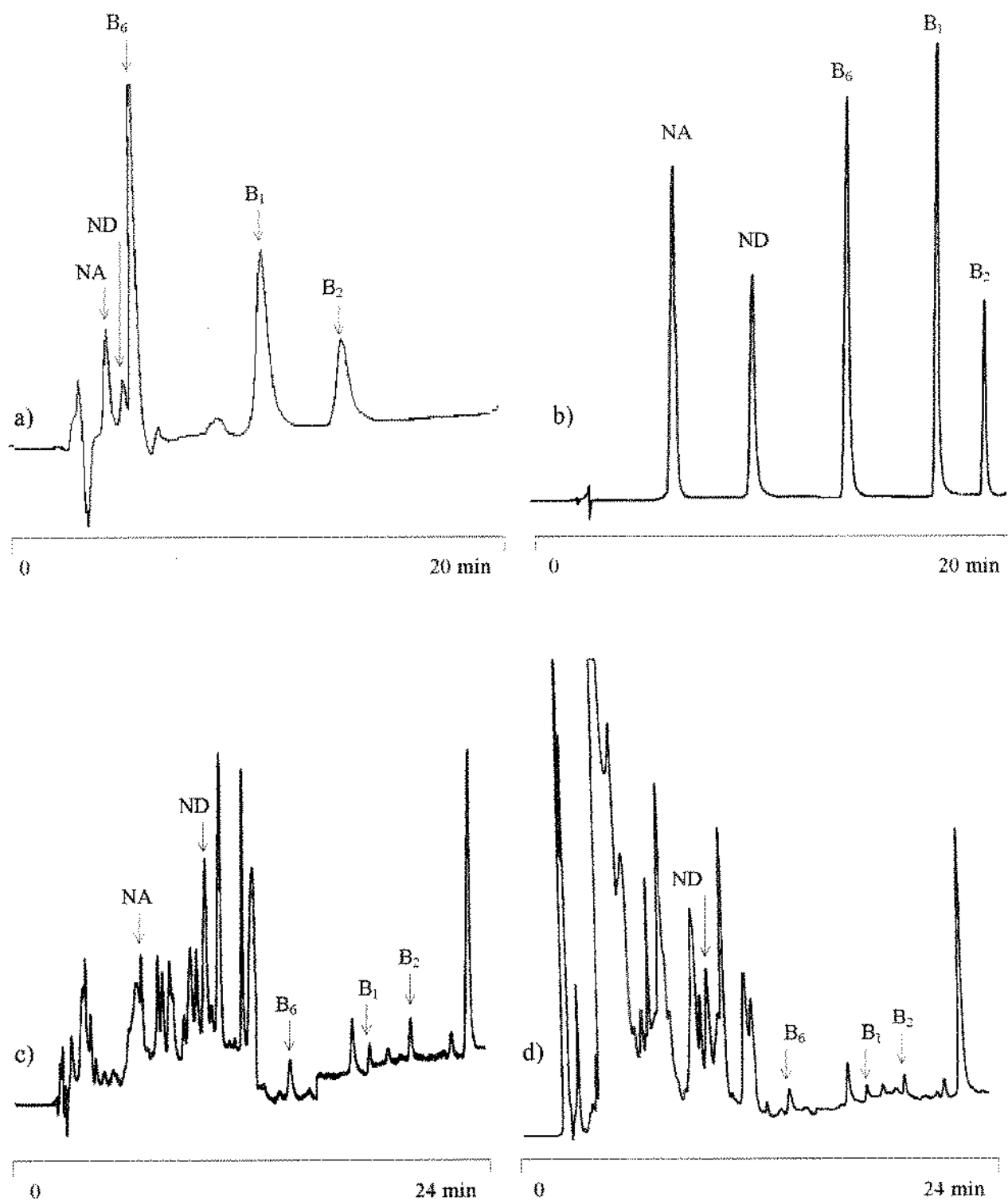


Figura 2-6 Perfis cromatográficos: (a) de solução padrão eluída isocraticamente com meOH-HAc-água (30:1:69), contendo 0,12% de TEA e SHA 5 mM; (b) de solução padrão eluída com HAc-água (1:99), contendo 0,12% de TEA e SHA 5 mM em gradiente linear até 25% de acetonitrila, em 20 min; (c) de extrato de biscoitos maria não clarificado; e (d) de extrato de biscoito maria clarificado com TCA e sulfato de amônio, eluídos por gradiente. Coluna Bondesil ODS-1 5 μ m, 150 x 4,6 mm. Vazão 0,7 mL/min.

Dentre as técnicas de extração utilizadas, a vibração ultrasônica e o banho-maria apresentaram os melhores resultados. A homogeneização em agitador mecânico produz um extrato com muitos grumos, difícil de manusear. As etapas desta avaliação não foram protegidas da luz, o que justifica os baixos teores encontrados para a vitamina B₂ (**Tabela 2-1**). O aquecimento drástico, em autoclave, produz grande quantidade de interferentes, impedindo a quantificação das vitaminas (**Figura 2-7 b**). Embora o aquecimento em banho maria produza mais interferentes do que a vibração ultrasônica (**Figura 2-7 c**), estes não interferem na quantificação das vitaminas, porém, foi a vibração ultra-sônica que forneceu resultados significativamente melhores para as vitaminas B₂ e nicotinamida (**Tabela2-1**)

Tabela 2-1 Comparação entre os diferentes tipos de extratores durante a extração das vitamina B₁, B₂, B₆ e niacinamida (mg/100g), a partir de biscoitos de maisena enriquecidos

Vitamina	Ensaio	Agitador mecânico	ultra-som	banho-maria
B₁	1	0,87	1,01	0,98
	2	0,84	0,95	0,95
	3	0,89	0,95	0,95
	Média	0,87a	0,97b	0,96b
B₂	1	0,53	0,88	0,79
	2	0,59	0,88	0,80
	3	0,53	0,87	0,80
	Média	0,55a	0,87b	0,80c
B₆	1	1,60	1,67	1,67
	2	1,66	1,81	1,72
	3	1,62	1,85	1,66
	Média	1,63a	1,71a	1,68a
Nicotinamida	1	15,07	15,18	13,56
	2	14,35	14,42	13,83
	3	14,47	15,25	13,56
	Média	14,62a	14,95a	13,65b

Médias com letras diferentes, na mesma linha, apresentam diferença significativa, ao nível de 5%.

O prolongamento do tempo de extração, por vibração ultra-sônica, apresentou redução nos teores da vitamina B₁ e mostrou um incremento na concentração da vitaminas B₂, até 90 min de extração, entretanto, com 120 min, também, reduziu estes valores (Tabela 2-2). Os resultados indicam concordância satisfatória para a extração multivitamínica por vibração ultra-sônica, por 60 min.

Tabela 2-2 Comparação entre os diferentes tempos de vibração ultra-sônica, durante a extração das vitaminas B₁, B₂, B₆ e nicotinamida, a partir de biscoitos de maisena enriquecidos

Vitamina	Ensaio	45'	60'	90'	120'
B ₁	1	0,98	0,89	0,89	0,84
	2	0,98	0,89	0,89	0,89
	3	0,97	0,95	0,95	0,87
	Média	0,98a	0,92ab	0,92ab	0,87b
B ₂	1	0,92	0,95	1,04	0,96
	2	0,91	0,92	1,08	0,90
	3	0,91	0,93	1,03	0,87
	Média	0,91a	0,94b	1,05a	0,91a
B ₆	1	1,67	1,78	1,76	1,67
	2	1,78	1,75	1,75	1,88
	3	1,71	1,89	1,72	1,75
	Média	1,72a	1,78a	1,74a	1,76a
Nicotinamida	1	15,85	14,29	14,91	16,19
	2	15,14	16,86	15,32	15,91
	3	15,09	16,20	15,05	16,20
	Média	15,36a	15,79a	15,09a	16,03a

Médias com letras diferentes, na mesma linha, apresentam diferença significativa, ao nível de 5%.

O ácido sulfúrico 0,1N apresentou melhores resultados do que o HCl 0,1N, quanto aos teores de vitamina B₂ (**Tabela 2-3**), entretanto, a utilização do ácido sulfúrico 1N provocou a produção de interferentes, que impediram a quantificação das vitaminas (**Figura 2-7 d**).

A proteção da luz, em todas as etapas desenvolvidas pelo método, apresentou importância fundamental na manutenção da estabilidade da vitamina B₂ (**Tabelas 2-1 e 2-4**).

A **Figuras 2-8 c e d** mostram os cromatogramas dos biscoitos maria comuns e vitaminados, respectivamente, obtidos pela utilização das melhores condições observadas neste estudo.

Tabela 2-3 Comparação entre os diferentes tipos de ácidos durante a extração das vitamina B₁, B₂, B₆ e nicotinamida (mg/100g), a partir de biscoitos de maisena enriquecidos

Ensaio	Vitamina B ₁		Vitamina B ₂		Vitamina B ₆		Nicotinamida	
	HCl	H ₂ SO ₄	HCl	H ₂ SO ₄	HCl	H ₂ SO ₄	HCl	H ₂ SO ₄
1	0,89	0,89	0,80	0,95	1,71	1,78	14,04	14,20
2	0,95	0,89	0,79	0,92	1,74	1,75	13,73	16,88
3	0,95	0,95	0,80	0,93	1,72	1,89	14,39	16,20
Média	0,93a	0,92a	0,79b	0,94c	1,72d	1,78d	14,05e	15,70e

Médias com letras diferentes, para cada vitamina, possuem diferença significativa, ao nível de 5%.

Tabela 2-4 Efeito da presença da luz durante a extração das vitamina B₁, B₂, B₆ e nicotinamida (mg/100g), a partir de biscoitos de maisena enriquecidos

Ensaio	Vitamina B ₁		Vitamina B ₂		Vitamina B ₆		Nicotinamida	
	NPL	PL	NPL	PL	NPL	PL	NPL	PL
1	0,88	0,87	0,62	0,95	1,77	1,70	12,99	12,94
2	0,89	0,92	0,63	0,92	1,59	1,65	13,08	12,45
3	0,92	0,82	0,57	0,93	1,67	1,59	11,20	10,92
Média	0,90a	0,88a	0,61b	0,94c	1,68d	1,64d	12,42e	12,10e

NPL: não protegido da luz; PL: protegido da luz. Médias com letras diferentes, para cada vitamina, apresentam diferença significativa, ao nível de 5%.

2.3.4 Avaliação dos procedimentos de quantificação

A acetanilida, utilizada como padrão interno, eluiu junto com a vitamina B₂, nas condições testadas. O ácido m-hidroxibenzóico elui entre as vitaminas B₁ e B₂ (**Figura 2-8a**), entretanto a utilização deste significa uma exigência a mais, quanto à limpeza dos extratos vitamínicos. Embora os padrões internos sejam uma boa opção para a quantificação de vitaminas em formulações farmacêuticas, livres de compostos interferentes, os mesmos ainda são um desafio para os extratos provenientes de matrizes alimentícias. As curvas de padronização externa apresentaram, além de boa linearidade para todas as vitaminas, na faixa de concentração analisada, uma resposta estável durante um período de 50 dias.

A adição de metanol nos extratos vitamínicos, para precipitação de compostos interferentes, provoca a isomerização da vitamina B₁, com formação de um pequeno pico lateral (**Figura 2-8b**). Entretanto, apenas o pico principal, com resposta linear nas diversas concentrações avaliadas, foi utilizado na quantificação desta vitamina, justificando, desta forma, a adição de metanol também nas soluções padrões de trabalho.

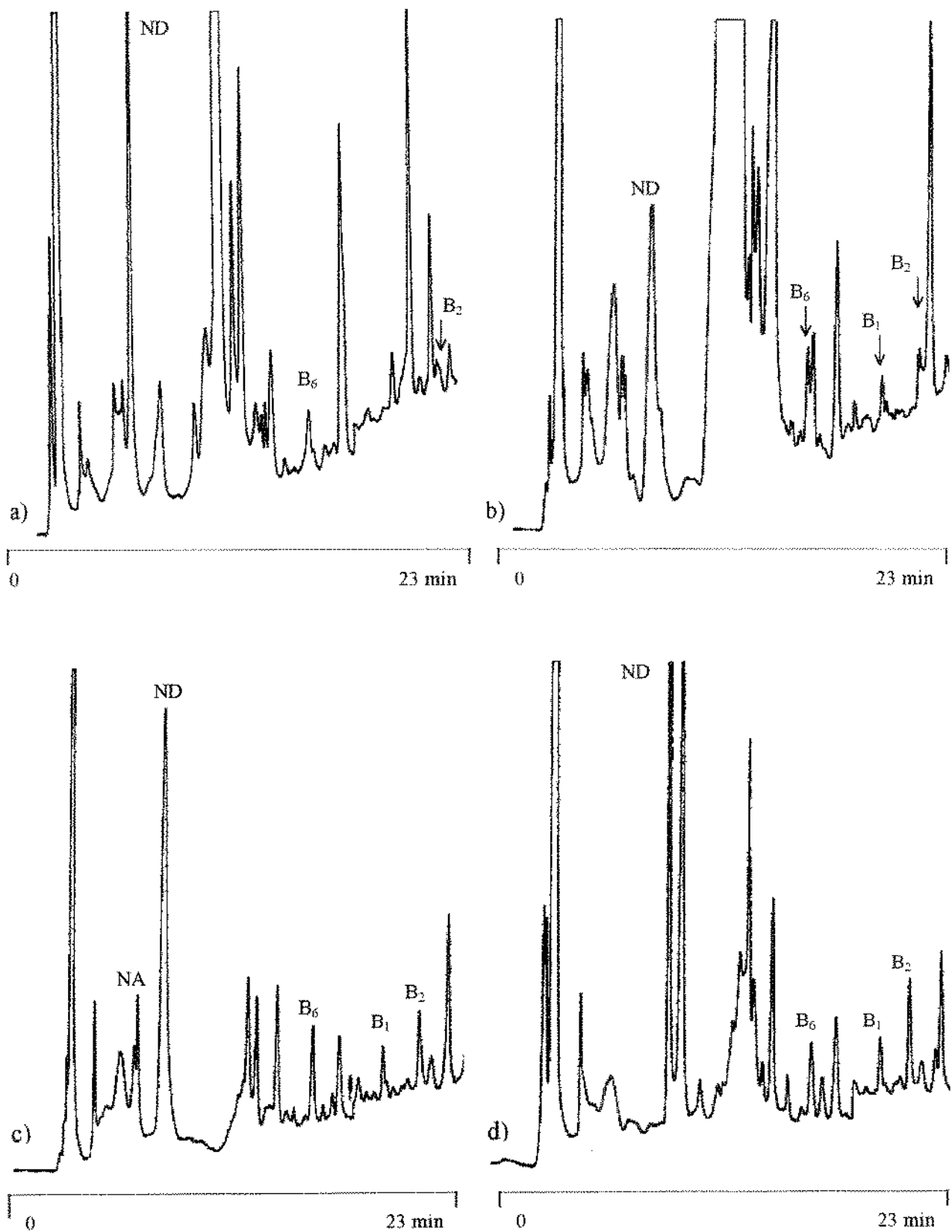


Figura 2-7 Perfis cromatográficos dos extratos de biscoitos maria, extraídos: (a) com claradiastase; (b) em autoclave; (c) em ultra-som e (d) com ácido sulfúrico 1 N. Eluição por gradiente com 1% de acetonitrila em solução aquosa, contendo 0,12% de TEA, SHA 5mM e pH ajustado para 2,8, com H₂SO₄, no início da corrida, 3% de acetonitrila, em 3 min e 5% de acetonitrila e 45% de metanol, em 23 min de corrida. Coluna Spherisorb ODS-2 5µm, 150 x 4,6 mm. Vazão 0,7 mL/min.

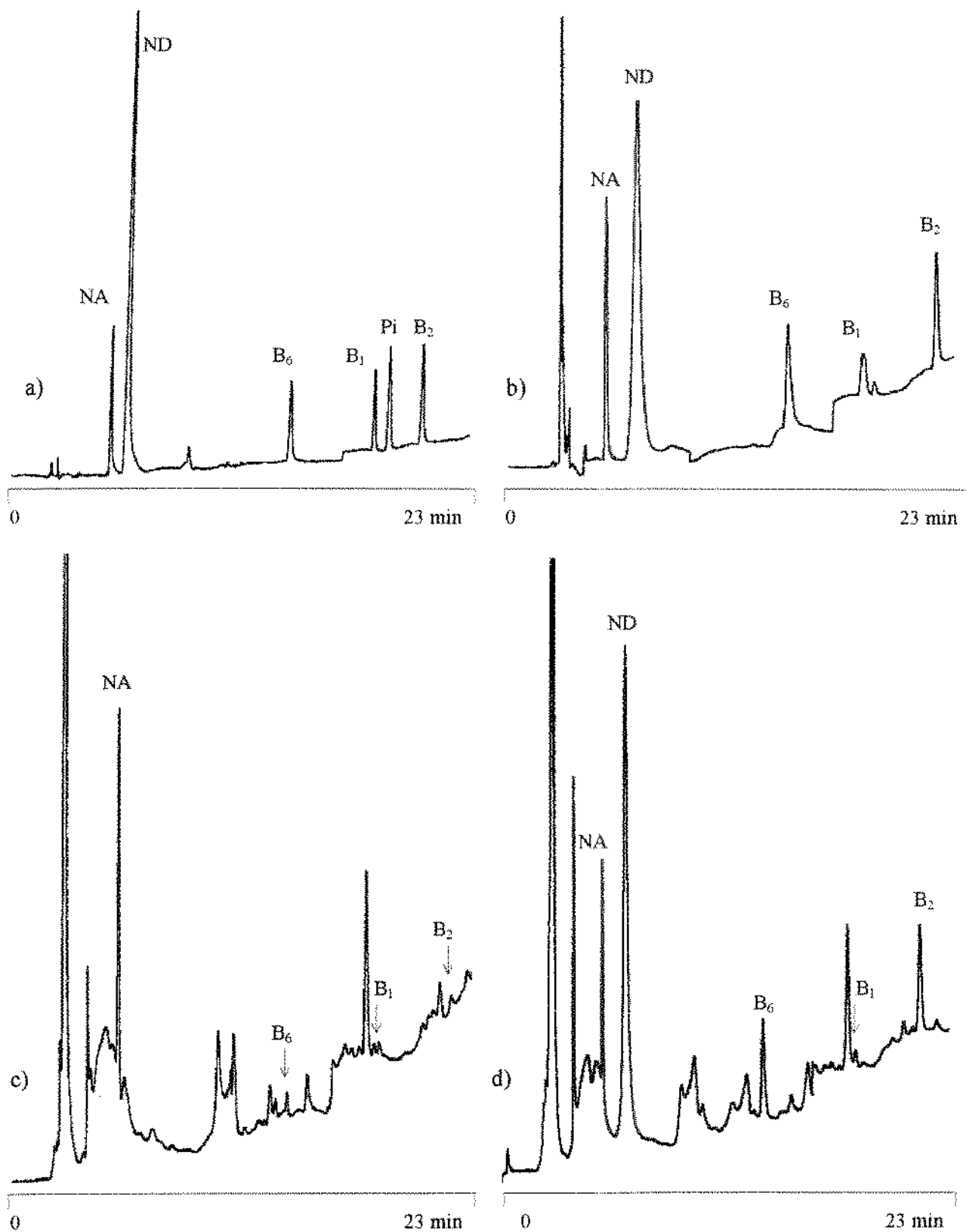


Figura 2-8 Perfis cromatográficos: (a) de padrões vitamínicos com padrão interno, em solução aquosa, (b) de padrões vitamínicos, em solução metanólica, (c) de extrato de biscoitos maria não enriquecidos e (d) de extrato de biscoitos maria enriquecidos. Condições cromatográficas conforme a **Figura 2-7**.

2.4 Conclusões

- A extração multivitamínica com ácido sulfúrico diluído, através de vibração ultrassônica por 60 min, apresenta-se como uma alternativa adequada na determinação das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em biscoitos enriquecidos;
- A precipitação de interferentes com metanol, seguida de refrigeração, é satisfatória, também, na prevenção de precipitações na coluna cromatográfica. A precipitação no ponto isoelétrico pode constituir opção para outros tipos de alimentos;
- Colunas com partículas menores produzem melhor resolução, entretanto o aumento da pressão, relacionado com o aumento do comprimento dessas colunas, limita a utilização de colunas com comprimento superior a 150 mm. Colunas ODS-2 aumentam o alargamento de banda da vitamina B₆, entretanto melhoram a resolução das demais vitaminas;
- A eluição por gradiente é essencial para obtenção de boa resolução durante a determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida por CLAE, em biscoitos enriquecidos;
- Pequenas alterações no pH (2,6-2,9) e nas concentrações de metanol e/ou acetonitrila constituem as variações de primeira escolha na composição da fase móvel, para determinação vitamínica em outros produtos;
- As etapas sugeridas devem ser desenvolvidas ao abrigo da luz, para garantir a estabilidade da vitamina B₂.

2.5 Referências bibliográficas

- AKIYAMA, S.; NAKASHIMA, K.; SHIRAKAMA, N. & YAMADA, K. (1990). New column packing materials for separation of water-soluble vitamins by HPLC. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 2809-2813.
- AUGUSTIN, J. (1984). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. *J. AOAC*, **67** (5), 1012-1015.
- AUGUSTIN, J.; TASSINARI, P. D.; FELLMAN, J. K. & COLE, C. L. (1982) B vitamin content of selected cereals and baked products. *Cereal Foods World*, **27** (4), 159-161.
- BERGLUND, P. T.; DICK, J. W. & DREHER, M. L. (1987). Effect of form of enrichment and iron on thiamin, riboflavin and niacinamide, and cooking parameters of enriched spaghetti. *J. Food Sci.*, **52**(5), 1367-1371.
- BLANCO, D.; SANCHEZ, L. A. & GUTIERREZ, M. D. (1994) Determination of water soluble vitamins by liquid chromatography with ordinary and narrow-bore columns. *J. Liquid Chrom.*, **17** (7), 1525-1539.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O. & SOLIMAN, A. G. (1993). Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and pyridoxine in medical foods. *J. AOAC Int.* **75** (3), 561-565.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; EITENMILLER, R. R. & SOLIMAN, A. G. (1992). Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in infant formula. *J. AOAC Int.*, **75** (3), 561-565.
- CHASE, G. W. & SOLIMAN, A. G. (1990). Analysis of thiamin, riboflavin, pyridoxin and niacin in multivitamin premixes and supplements by HPLC. *J. Micronutrient. Anal.*, **7**, 15-25.
- DAWSON, K. R.; UNKLESBAY, N. F. & HEDRICK, H. B. (1988). HPLC determination of riboflavin, niacin and thiamin in beef, pork and lamb after alternate heat-processing methods. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1176-1179.
- DONG, M. W.; LEPORE, J. & TAURUMOTO, T. (1988). Factors affecting the ion-pair chromatography of water soluble vitamins. *J. Chrom.*, **442**, 81-95.
- FELLMAN, J. K.; ARTZ, W. E.; TASSINARI, P. D. & AUGUSTIN, J. (1982). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by HPLC. *J. Food Sci.*, **47**, 2048-2050.
- GASSIN, A. L. (1991). Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. *Cah. Nutr. Diét.*, **XXVI** (1), 85-88.
- GENNARO, M.C. (1991). Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase ion-interaction reagent HPLC: application to multivitamin pharmaceuticals. *J. Chrom. Sci.*, **29**, 410-415.
- GREGORY, J. F. & SARTAIN, D. B. (1991). Improved chromatographic determination of free and glycosylated forms of vitamin B₆ in foods. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 899-905.
- HOLLMAN, P. C.; SLANGEN, J. H.; WAGSTAFFE, J. P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T. & FINGLAS, P. M. (1993). Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. *Analyst*, **118**, 481-488.
- KOTHARI, R. M., TAYLOR, M. W. (1982). Simultaneous separation of water-soluble vitamins and coenzymes by reversed-phase HPLC. *J. Chrom.*, **247**, 187-192.

- LAM, F.L.; HOLCOMB, I. J. & FUSARI, S.A. (1984). Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, piridoxine, thiamin and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. *J. AOAC*, **67** (5), 1007-1011.
- MACRAE, R. (1990). HPLC determination of vitamins. *J. Micronut. Anal.*, **7**, 247-260.
- MAEDA, Y.; YAMAMOTO, M.; OWADA, K. & SATO, S. (1988). Simultaneous Liquid Chromatographic determination of water-soluble vitamins, caffeine and preservative in oral liquid tonics. *J. AOAC*, **72** (2), 244-247.
- MARINI, D.; SORRENTINO, M.; BALESTRIERI, F. & MAGRI, A. L. (1988). Determinazione di tiamina, riboflavina e niacina in paste alimentari vitaminizzate. *Tec. Molitoria*, **39**, 1-7.
- MAXWELL, D. P. E. (1990). Cost-control implications of nutrient fortification. *Prepared Food*, **Feb.**, 87-88.
- MUÑOZ, R.O. A. & MURCIA, M. A. (1993). Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and non dairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chem.*, **49**, 203-206.
- POLESELLO, A. & RIZZOLO, A. (1990). Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1985-1989). *J. Micronut. Anal.*, **8**, 105-158.
- POLESELLO, A. & RIZZOLO, A. (1986). Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1981-1985). *J. Micronut. Anal.*, **2**, 153-187.
- RANUM, P. (1991). Cereal enrichment. In: *Handbook of Cereals Science and Technology*. Ed. Lowrenz, New York. 882p.
- RICHARDSON, D. P. (1990). Vitamin fortification and implications for health. *J. Micronut. Anal.*, **7**, 223-227.
- TOMA, R. B. & TABEKHIA, M. M. (1979). HPLC analysis of B vitamins in rice and rice products. *J. Food Sci.*, **44** (1), 263-265.
- WALTER, P. (1994). Vitamin Requirements and enrichment of foods. *Food Chem.*, **49**, 113-117.
- WILLS, R. B. H.; WIMALASIRI, P. & GREENFIELD, H. (1985). Comparative determination of thiamin and riboflavin in foods by HPLC and fluorometric methods. *J. Micronut. Anal.*, **1**, 23-29.
- WIMALASIRI, P. & WILLS, R. B. H. (1985). Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by HPLC. *J. Chrom.*, **318**, 412-416.

Capítulo 3

Otimização e valiação de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE¹, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM ALIMENTOS ENRIQUECIDOS

Resumo

O mercado brasileiro tem lançado uma grande variedade de alimentos enriquecidos nos últimos anos. Entretanto, a falta de metodologias analíticas apropriadas tem dificultado o controle dos níveis desses enriquecimentos. Com a finalidade de suprir essa carência, este trabalho propõe e valida uma metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, por CLAE, em alimentos enriquecidos. O extrato vitamínico é obtido por vibração ultra-sônica da amostra, em ácido diluído. A limpeza do extrato é feita por precipitação, através da adição de metanol, seguida de refrigeração a -18°C. As vitaminas são separadas em coluna C18 e eluídas por gradiente, em vazão de 0.7 mL/min. A fase móvel inicial é constituída de 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA² 5mM; 0,15% de TEA³; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído), apresentando 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. O tempo de equilíbrio da coluna, antes de cada nova injeção, é de 20 min. A detecção das vitaminas é feita na região do ultravioleta e sua quantificação através de curvas de padronização externa. Estas curvas apresentaram boa linearidade, sendo os limites de detecção e recuperação, nos níveis médios de enriquecimento dos produtos analisados, respectivamente, 0,04 µg/mL e 102% para a vitamina B₁, 0,03 µg/mL e 96% para a B₂, 0,08 µg/mL e 106% para a B₆, 0,10 µg/mL e 105% para a nicotinamida e 0,03 µg/mL e 81% para o ácido

¹ Cromatografia líquida de alta eficiência

² Ácido hexano sulfônico

³ Trietilamina

nicotínico. Os testes de repetibilidade, nos níveis de enriquecimento, apresentaram um coeficiente de variação inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico (forma vitamínica naturalmente encontrada nos alimentos). A metodologia proposta, aqui validada, apresenta eficiência, simplicidade, rapidez e grande versatilidade, quando aplicada em alimentos enriquecidos.

Abstract

Lately a variety of enriched foods have been launched on to the Brazilian market. However, a lack of appropriate analytical methodologies has made it difficult to control the levels of enrichment. With the objective of overcoming this lack, this work proposes and validates a method for the simultaneous determination by HPLC¹ of the vitamins B₁, B₂, B₆, nicotinic acid and nicotinamide. The vitaminic extract was obtained by ultrasonic vibration of the sample in dilute acid and the extract cleaned up by precipitation, using the addition of methanol followed by refrigeration at -18°C. The vitamins were separated on a C 18 column by gradient elution and a flux of 0.7 mL/min. The starting mobile phase was 2% acetonitrile plus 98% aqueous phase (5 mM SHA²; 0.15% TEA³; pH adjusted to 2.8 with dilute H₂SO₄) changing to 3% acetonitrile plus 95% aqueous phase after 3 minutes and 2% acetonitrile, 41% aqueous phase and 57% methanol after 23 minutes. Column equilibration time before each new injection was 20 minutes. Detection was carried out in the ultraviolet region and quantification effected using external standard curves. These curves presented good linearity, the detection and recuperation limits at the average enrichment levels of the products analysed being respectively 0.04 µg/mL and 102% for vitamin B₁, 0.03 µg/mL and 96% for B₂, 0.08 µg/mL and 106% for B₆, 0.10

¹ High performance liquid chromatography

² Hexanosulfonic acid

³ Triethylamine

$\mu\text{g/mL}$ and 105% for nicotinamide and 0.03 $\mu\text{g/mL}$ and 81% for nicotinic acid. At the levels of enrichment tested, the tests for repeatability presented a coefficient of variability of less than 5% for vitamins B₁, B₂ and nicotinamide, less than 10% for vitamin B₆ and less than 13% for nicotinic acid (naturally occurring form of the vitamin in foods). The proposed methodology, validated here, was shown to be efficient, simple, quick and highly versatile when applied to enriched foods.

3.1 Introdução

Um grande número de países promove o enriquecimento de alimentos com as finalidades de corrigir deficiências nutricionais de uma população, de obter um balanço calórico nutricional adequado, de suprir níveis nutricionais de novos produtos lançados no mercado e de fazer cumprir padrões de identidade e regulamentos nutricionais já existentes.

Embora vários produtos enriquecidos venham sendo lançados no mercado brasileiro, o controle destes produtos tem sido dificultado pela falta de uma legislação específica, pela carência de laboratórios preparados para o desenvolvimento das análises e pela falta de metodologias analíticas adequadas.

A principal vantagem dos métodos da AOAC¹ para determinação de vitaminas é a simplicidade dos equipamentos utilizados, entretanto são procedimentos demorados, minuciosos [HIRAYAMA e MURAYAMA, 1991; FINGLAS e FAULKS, 1984] e utilizam reagentes nocivos, como brometo de cianogênio, ou de difícil obtenção [RUSSEL e VANDERSLICE, 1992]. Além disso, a determinação da vitamina B₆ é feita apenas por método microbiológico. Recentemente, a literatura vem apresentando avanços nos métodos para determinação de vitaminas hidrossolúveis, através de técnicas promissoras, tais como CLAE [Van SCHOONHOVEN *et alii*, 1994; MUNOZ *et alii*, 1994; CHASE *et*

¹ Association Official of Analytical Chemists

alii, 1993], ELISA¹ [FINGLAS e MORGAN, 1994; ALCOOK *et alii*, 1990; LEE *et alii*, 1990] e eletroforese capilar [DINELLI e BONETTI, 1994; SOGA, 1994]. Entretanto, as duas últimas são técnicas ainda muito recentes e sofisticadas para análise de rotina.

O novo enfoque dado ao desenvolvimento de métodos analíticos vem buscando metodologias novas que permitam a determinação simultânea de vários compostos, com rapidez, custos relativamente baixos e que, principalmente, forneçam dados com boa qualidade. Neste sentido, a CLAE apresenta-se como uma das técnicas mais apropriadas para a determinação de vitaminas, incluindo rapidez, alta sensibilidade e exatidão, mesmo quando os analitos estão presentes em quantidades baixas e em matrizes complexas, tais como alimentos [MACRAE, 1990], além de permitir análises diretas sem derivação, determinação simultânea de vários compostos em uma análise única e resolução de isômeros [POLESELLO e RIZZOLO, 1986; TOMA e TABEKHIA, 1971; MARINI *et alii*, 1988; SKURRAY, 1981; WEHLING e WETZEL, 1984; CHASE *et alii*, 1993; CHASE *et alii*, 1992].

A qualidade dos dados analíticos é fator importante para o conhecimento do potencial nutricional dos alimentos, com vistas a garantia da segurança alimentar e ao sucesso do desenvolvimento de novos produtos. Nos últimos anos a AOAC vem estimulando o controle da qualidade analítica, através de planejamentos e análises estatísticas variadas [ULBERTH, 1993; WILRICH, 1993; WERNIMONT, 1985; YODEN, 1982; STEINER, 1982], enquanto que a *Community Bureau of Reference* (BCR) vem desenvolvendo programas de comparação entre métodos analíticos e preparando materiais de referência (Rms) para uso em alimentos [FINGLAS *et alii*, 1993; HOLLMAN *et alii*, 1993a; 1993b]. No Brasil, também, a validação dos métodos tem sido uma preocupação dos pesquisadores, que trabalham com metodologias analíticas para determinação de vitaminas [GODOY, 1996; SABINO, 1996; SILVA, 1996]

¹ *Enzyme-linked immunosorbent assay*

O objetivo deste trabalho foi a otimização e validação de uma metodologia, por CLAE, para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material

Biscoitos maria e de maisena (marca comercial grafada com Z, registrada) enriquecidos e não enriquecidos, biscoitos de coco e de leite enriquecidos, macarrão enriquecido, leite em pó acidificado enriquecido, leite desnatado esterilizado não enriquecido, flocos de milho e farinha de cereais enriquecidos, adquiridos em supermercados da região de Campinas. As amostras de biscoitos, flocos de milho e macarrões foram, previamente, homogeneizadas em multiprocessador.

3.2.2 Reagentes

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆), ácido nicotínico (vitamina PP) e nicotinamida (vitamina PP) foram cedidos pela F. HOFFMANN-LA ROCHE Ltda, São Paulo, Brasil. O sal sódico do 1-ácido hexanosulfônico, aproximadamente 98%, foi fornecido pela SIGMA Chemicals Co, USA. O metanol (*ominsolv*) e a trietilamina (para síntese) foram fornecidos pela MERCK, Alemanha. A acetonitrila com pureza cromatográfica foi fornecida pela MERCK, Brasil. Todos os outros reagentes químicos utilizados apresentaram grau de pureza analítico e foram obtidos no comércio local. A água utilizada no preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros MILLIPORE, com poros de 0,45 µm de diâmetro, e degaseificadas em banho ultra-sônico.

3.2.3 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido VARIAN com bomba ternária modelo 9010, sistema de injeção manual tipo *Rheodyne*, equipado com *loop* de 20 μL , detector policromático de arranjo de diodos, modelo 9065. Acoplado a esse sistema um integrador VARIAN, modelo 4400. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna *Spherisorb ODS-2*, 5 μm 150 x 4,6 mm d.i. (SIGMA-ALDRICH, USA) protegida por coluna de guarda, empacotada com o mesmo material da coluna analítica.

Foi utilizado, também, um fotofluorômetro eletrônico COLLEMAN, modelo 12C, com lâmpada de vapor de mercúrio e filtros 12-221 e 12-225, para a vitamina B₁, e 12-222 e 14-212, para a vitamina B₂.

3.2.4 Métodos

3.2.4.1 Metodologia analítica

Para a extração, foram tomadas entre 4 e 5g de amostra, previamente homogeneizada. As vitaminas são extraídas com 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N em banho ultra-sônico, por 60 min. O extrato é purificado pela adição de metanol, em quantidade suficiente para completar 100mL, e refrigerado à -18°C, por 60 min. A amostra é, então, adequadamente filtrada em papel de filtro e em membrana fluoropore, FHLP 01300 (MILLIPORE), com poros de 0,5 μm .

As vitaminas são separadas através de eluição por gradiente, em vazão de 0,7 mL/min, com 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA 5mM; 0,15% de TEA; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. As condições iniciais são, então, retomadas e a coluna é re-equilibrada por 20 min. Os compostos são detectados pela absorção na região do ultravioleta a 254 nm até 9

min, 287 nm entre 9 e 15 min e 254 nm entre 15 e 23 min. A identificação é feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia, pelos espectros de absorção, fornecidos pelo detector de arranjo de diodos, e pelas razões entre as absorbâncias, obtidas em dois diferentes comprimentos de onda. A quantificação das vitaminas é feita por curvas de padronização externa, construídas com 6 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de 3 determinações. As curvas foram feitas com 1, 4, 8, 12, 16 e 20 mL de solução padrão contendo 5,11; 3,99; 6,09; 50,75; e 11,67 µg/100 mL das vitaminas B₁, B₂, B₆, nicotinamida e ácido nicotínico, respectivamente. As alíquotas são diluídas para 45 mL com água e para 100 mL com metanol, imediatamente filtradas em filtro fluoropore (MILLIPORE FHLP 01300), com poros de 0,5 µm, e injetadas no cromatógrafo. Todas as precauções, necessárias para evitar a degradação e perda das vitaminas durante a análise, foram tomadas, realizando-se as análises o mais rapidamente possível e protegendo as vitaminas da ação da luz.

O fluxograma da metodologia, desenvolvida para determinação simultânea de vitaminas do complexo B em alimentos enriquecidos, está disposto na **Figura 3-1**.

3.2.2.3 Validação da metodologia

a) Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção foi estimado, segundo CAULCUTT e BODDY (1983), através da estimativa do desvio padrão (DP) produzida por 8 leituras, em duplicata, do branco. O critério de detecção (CD) pressupõe que 5% das amostras, com concentração zero, devem fornecer uma leitura correspondente a este valor:

$$CD = 1,86 \times DP;$$

Assim, o limite de detecção pode ser estimado como sendo 2 vezes o critério de detecção, adicionado de 20% do valor encontrado. A estimativa do desvio padrão fornecida pelas leituras da amostra no limite de detecção estimado (8 determinações, em duplicata), fornece, em conjunto com o critério de detecção, o limite de detecção (LD) do composto de interesse:

$$LD = CD + 1,86 \times DP$$

O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção.

b) Comparação com métodos oficiais

Determinações em paralelo, realizadas em triplicata, utilizando a metodologia por CLAE e os métodos da AOAC (CUNNIFF, 1995), foram feitas para determinação das vitaminas em biscoitos de maisena enriquecidos. Os métodos da AOAC (CUNNIFF, 1995), utilizados para cada vitamina, estão apresentados abaixo:

- vitamina B₁: método fluorimétrico 957.17;
- Vitamina B₂: método fluorimétrico 970.65;
- Vitamina B₆: não foi determinada segundo a AOAC, pois esta não oferece método químico para determinação desta vitamina;
- Ácido nicotínico e nicotinamida: não foram determinadas segundo a AOAC, pois o laboratório não dispunha de segurança para o manuseio de CNBr, reagente exigido pelo método químico 961.14.

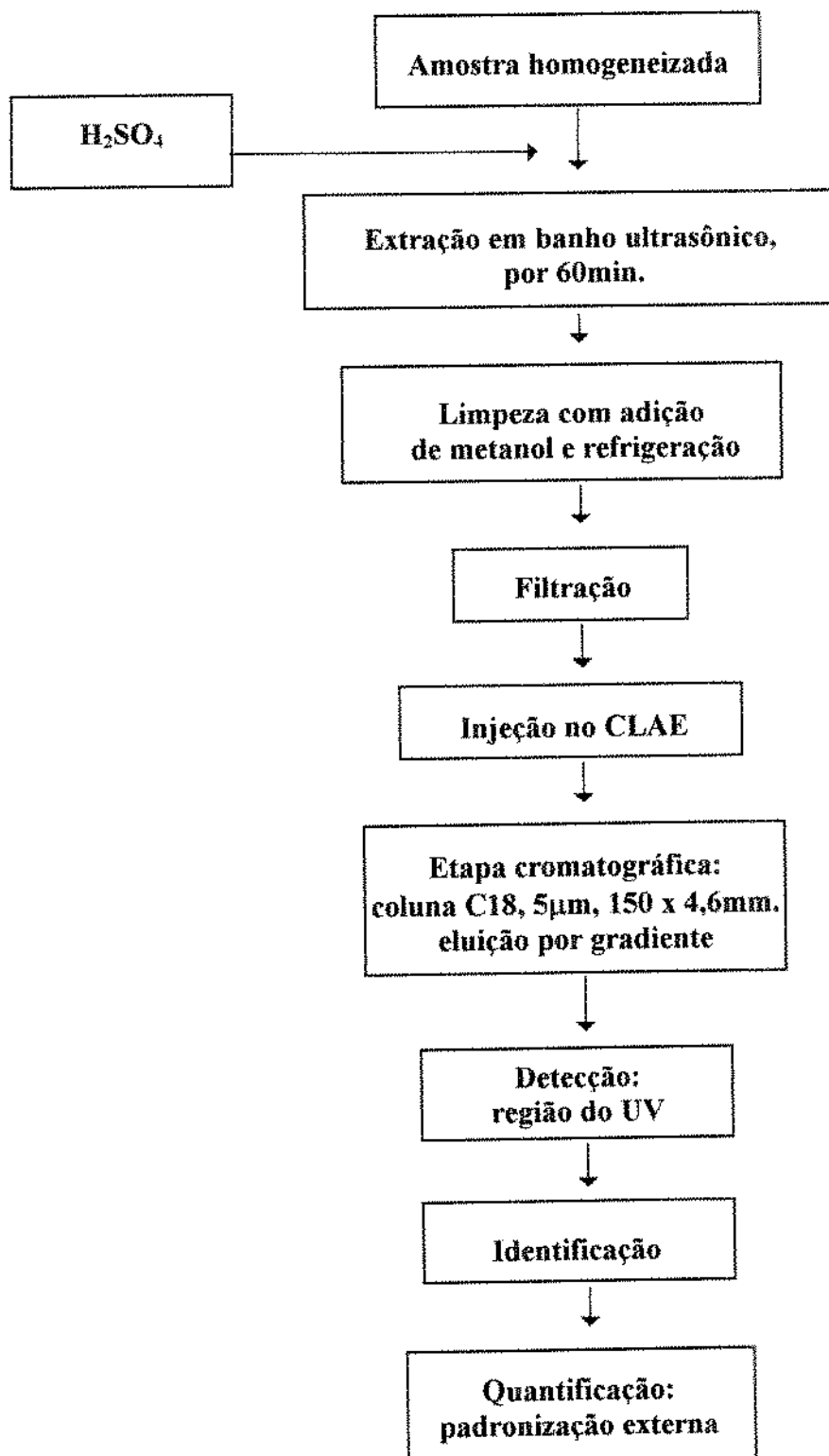


Figura 3-1 -Fluxograma do método para determinação simultânea de vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em biscoitos enriquecidos.

c) Recuperação de padrões

Foram feitos testes de recuperação de padrões, em triplicata, adicionados, em 4 diferentes níveis de concentração, em leite esterilizado desnatado não enriquecido e, em 5 níveis, em biscoitos de maisena não enriquecidos. Foram utilizadas, para a análise, 5 g (mL) de amostra.

d) Repetibilidade

Foi determinada, segundo CAULCUTT e BODDY (1983), através de determinações, em triplicata, de 5 níveis de concentrações vitamínicas em solução padrão e adicionadas nos biscoitos de maisena não enriquecidos. A repetibilidade foi calculada segundo a fórmula:

$$R = 2,92 \sqrt{2DP},$$

onde *R*: repetibilidade, com significância de 90%

DP: estimativa do desvio padrão

e) Robustez

Foi feito um estudo, através de planejamento fracionário de 16 ensaios, para avaliar como 7 variáveis, consideradas como pontos críticos nas etapas de extração e purificação do extrato, (**Tabela 3-1**) afetam as concentrações das vitaminas do complexo B em biscoitos enriquecidos - planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} (**Tabela 3-2**)

Tabela 3-1 Condições pré-estabelecidas (+) e alternativas (-) na determinação da rusticidade do método desenvolvido

VARIÁVEIS		+	-
A (Blocos)	Período entre extração e injeção	0 horas	24 horas
B	Peso da amostra	5g	7g
C	Volume de solução extratora	45mL	50mL
D	Concentração da solução extratora	0,1N	0,2N
E	Tempo de extração	60min.	30min.
F	Metanol	Synth	Merck
G	Tempo de resfriamento	60 min.	30 min.

Tabela 3-2- Distribuição aleatória de 6 variáveis em 2 blocos através de um planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} (PROC. FACTEX, the SAS System)

Blocos	Ensaio	A	B	C	D	E	F	G
1	1	+	-	-	-	+	-	+
	2	+	-	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	+	+	-
	4	+	+	-	+	+	+	+
	5	+	+	-	-	-	+	+
	6	+	+	+	+	-	+	-
	7	+	-	-	+	-	-	+
	8	+	-	+	+	+	-	-
2	9	-	+	+	+	+	-	+
	10	-	-	-	-	-	+	-
	11	-	-	+	+	-	+	+
	12	-	+	+	-	-	-	+
	13	-	-	-	+	+	+	-
	14	-	+	-	+	-	-	-
	15	-	-	+	-	+	+	+
	16	-	+	-	-	+	-	-

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Etapas analíticas

A **Figura 3-2 a** mostra o cromatograma de separação simultânea das vitaminas em solução padrão. O ácido nicotínico, a nicotinamida, e as vitaminas B₆, B₁ e B₂ são eluídas, com boa resolução, em tempos de retenção em torno de 5, 7, 14, 18 e 21 min, respectivamente. Em função da utilização do sistema de eluição por gradiente, o tempo de re-equilíbrio da coluna (20 min), após o final da corrida, é fundamental para a boa resolução das vitaminas, na determinação seguinte. Os picos fantasmas, que são observados no cromatograma, provavelmente são decorrentes de impurezas presentes no ácido sulfúrico e na trietilamina, que são eluídas durante o gradiente desenvolvido com concentrações crescentes de metanol. Além disso, a mudança do comprimento de onda, feita em 9 e em 15 min de corrida, também provoca um sinal na linha de base.

Os cromatogramas obtidos para o macarrão, o leite em pó acidificado e os biscoitos de maisena, enriquecidos, estão dispostos nas **Figuras 3-2 b, c e d**, respectivamente. O principal problema de interferência ocorreu com o ácido nicotínico em biscoitos. Entretanto, observamos que a metodologia desenvolvida apresenta grande versatilidade para os alimentos enriquecidos, com aplicação em biscoitos, macarrão, leite e flocos de milho. Os **Anexos 1, 2 e 3** mostram os perfis dos espectros de absorção das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, presentes em solução padrão e em alimentos enriquecidos, obtidos através de detectores de arranjo de diodos. A **Tabela 3-3** apresenta as razões entre as absorbâncias, obtidas em diferentes λ , para as vitaminas presentes nas soluções padrões e nas amostras analisadas. Os valores mais diferenciados, entre as amostras e os padrões, foram aqueles obtidos para o ácido nicotínico em biscoitos, quando não ocorre a perfeita separação entre este e um interferente.

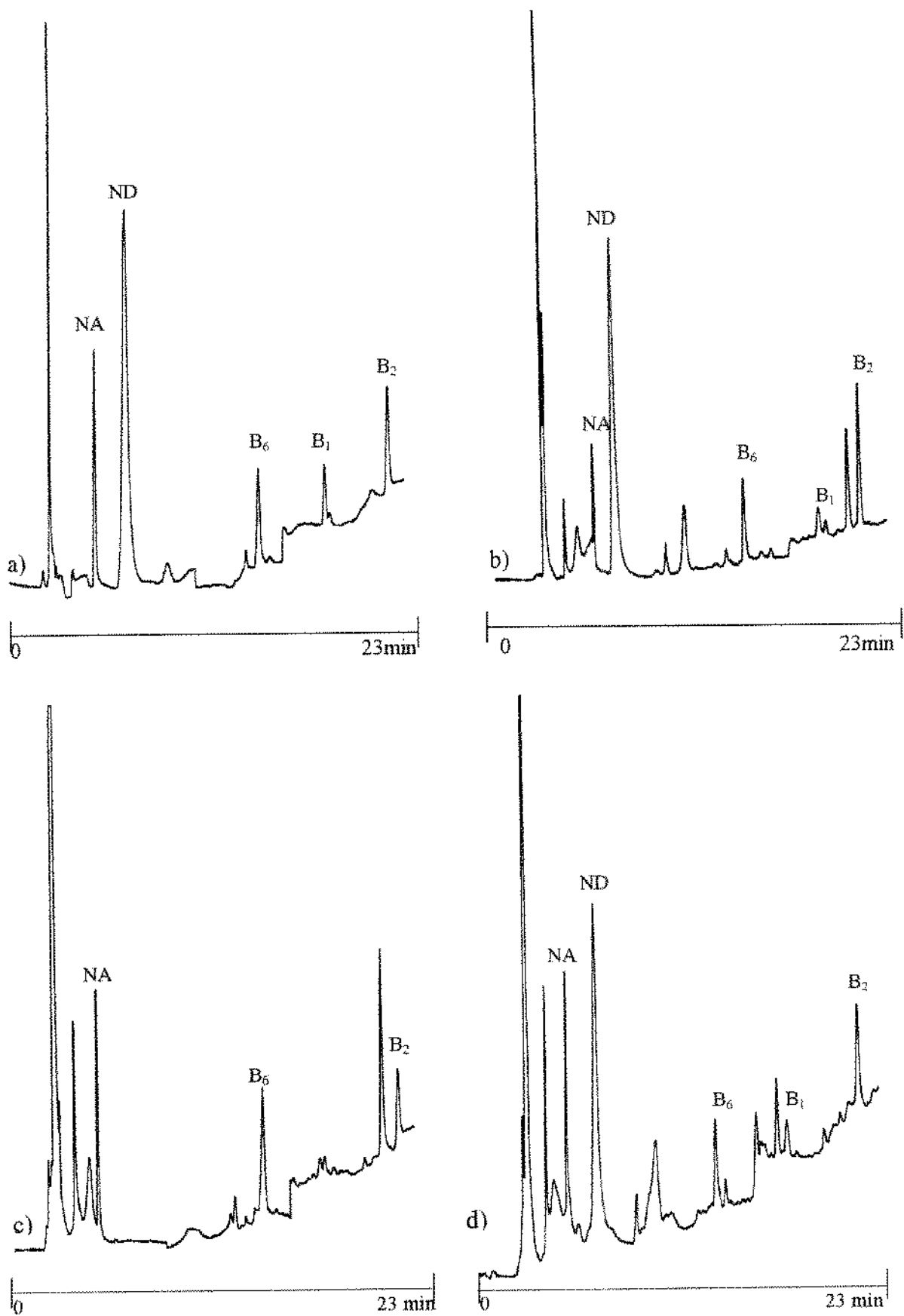


Figura 3-2 Perfis cromatográficos: (a) de solução padrão; (b) de macarrão; (c) de leite em pó e (d) de biscoitos de maisena. Condições cromatográficas descritas no texto.

Tabela 3-3 Razão entre absorvâncias a 234 e 254 nm, para as vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND), e a 254 e 278 nm, para a vitamina B₆

Amostras	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND
Biscoito de maisena	241	244	264	240	246
Biscoito maria	245	246	267	244	246
Biscoito de leite	243	246	267	242	249
Biscoito de coco	245	247	267	243	248
Flocos de milho QL	246	246	269	246	248
Macarrão	244	245	266	246	247
Padrões	242; 245	243, 247	268, 269	249	247

As curvas de padronização das vitaminas apresentam boa linearidade, nas faixas de concentração pré-estabelecidas (**Anexos 4 a 6**). As regressões lineares para estas curvas, onde $y = A + B x$, estão dispostas na **Tabela 3-4**. Os coeficientes lineares (termo A), de todas as curvas de padronização, foram desprezados durante as quantificações analíticas, em função dos altos valores das estimativas de desvios padrão, fornecidos para este termo.

Tabela 3-4 Regressão linear das curvas de padronização das vitaminas B₁, B₂ e B₆, ácido nicotínico e nicotinamida

Vitaminas	A	DP	B	DP	R
B ₁	-442	245	108	4	0,9973
B ₂	272	366	254	7	0,9982
B ₆	214	328	164	4	0,9986
Ácido nicotínico	-392	373	133	3	0,9992
nicotinamida	-1681	2170	148	4	0,9989

A: coeficiente linear; B: coeficiente angular; R: coeficiente de correlação; DP: estimativa do desvio padrão.

A **Tabela 3-5** apresenta os teores das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, determinados em biscoitos, macarrão, flocos de milho e leite em pó, enriquecidos. Esses valores apresentam algumas variações, em torno daqueles declarados nas embalagens dos produtos.

Tabela 3-5 Concentrações de vitaminas do complexo B (mg/100g) em alimentos enriquecidos

Produto	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
Biscoitos Maria	1,01	0,93	1,5	0,8	12,4	13,2
Biscoitos de maisena	0,71	0,86	1,4	1,4	10,3	11,7
Biscoitos de leite	0,77	1,03	1,4	0,7	10,8	11,5
Biscoitos de coco	1,53	1,61	2,0	2,4	17,7	20,07
Embalagem*	0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
Flocos de milho	1,61	1,80	2,2	2,0	20,2	22,2
Embalagem*	1,67	1,25	1,42	—	—	15,83
Macarrão	1,29	1,61	2,3	3,0	15,9	19,0
Embalagem*	1,2	1,5	2,0	—	—	17,0
Leite em pó	0,29	0,82	1,1	2,3	0,2	2,5
Embalagem*	0,3	0,8	0,4	—	—	3,6

NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos. CV, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

3.3.2 Validação do método

Os limites de detecção encontrados para as vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida foram 0,04; 0,03; 0,08; 0,03 e 0,10 µg/mL, respectivamente (**Tabela 3-6**). Os limites de quantificação obtidos foram 0,08; 0,06; 0,16; 0,06 e 0,20 µg/mL, para as vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, entretanto, as curvas de padronização das vitaminas B₁, B₂ e B₆ apresentaram boa linearidade a partir de soluções padrão contendo 0,05; 0,04 e 0,06 µg/mL, respectivamente. As determinações simultâneas das vitaminas B₁ e B₂, realizadas pelo método CLAE, foram,

respectivamente, 21 e 8% superiores às determinações realizadas pelos métodos fluorimétricos, estabelecidos pela AOAC (Tabela 3-7). Estas diferenças foram significativas ao nível de 5% e, provavelmente, são conseqüências de perdas vitamínicas, causadas pelo método da AOAC durante a etapa de extração, feita em banho-maria, por 30 min., e/ou durante as reações de derivação. A pureza das vitaminas, determinadas pelo método por CLAE, é garantida pela separação cromatográfica dos interferentes, pelos espectros de absorção fornecidos pelo detector de arranjo de diodos, e pela relação das absorvâncias obtidas, em diferentes λ .

Tabela 3-6 Limite de detecção (LD) das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND), segundo as condições de trabalho deste estudo

Variáveis	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND
DP*	119	164	254	129	293
CD (área)	221	305	472	240	844
Estimativa do LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,05	0,03	0,07	0,04	0,06
DP	83	243	433	61	345
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,04	0,03	0,08	0,03	0,10

DP*: estimativa do desvio padrão do branco; CD: critério de detecção; DP: estimativa do desvio padrão das soluções padrão

Tabela 3-7 Valores obtidos para as vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND), determinadas por CLAE, e para vitaminas B₁ e B₂ determinadas pelos métodos da AOAC, em biscoitos de maisena enriquecidos

Método por CLAE (mg/100g)					
Determinação	B₁	B₂	B₆	NA	ND
I	0,72	1,41	1,66	0,96	14,1
II	0,70	1,46	1,82	1,07	15,1
III	0,70	1,42	1,72	1,00	13,7
Média (DP)	0,71 (0,01)	1,43 (0,03)	1,73 (0,08)	1,01 (0,05)	14,3 (0,7)
CV (%)	2	2	5	5	5
Métodos da AOAC (mg/100g)					
Determinação	B₁	B₂	B₆	NA	ND
I (DP)	0,56 (0,01)	1,29 (0,01)	—	—	—
II (DP)	0,53 (0,00)	1,36 (0,02)	—	—	—
III (DP)	0,59 (0,00)	1,28 (0,00)	—	—	—
Média (DP)	0,56 (0,03)	1,31 (0,04)	—	—	—
CV (%)	5	3	—	—	—

CLAE I, II e III: determinações simples; AOAC I, II e III: médias de duplicatas; DP: estimativa do desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

As taxas de recuperação das vitaminas B₁, B₂ e B₆ e nicotinamida, determinadas por CLAE em biscoitos de maisena não enriquecidos, variaram entre 96-114%, sendo que os valores correspondentes ao 1^o nível de enriquecimento foram desconsiderados, por estarem abaixo do limite de quantificação. As mesmas taxas, para o ácido nicotínico, variaram entre 75 e 88% (**Tabela 3-8**). As taxas de recuperação das vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, em leite desnatado, variaram entre 87-105%. As mesmas taxas para as vitaminas B₆ e ácido nicotínico variaram entre 72-111% (**Tabela 3-9**). Estes valores indicam um boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos presentes nos alimentos

enriquecidos, e recomendam cautela para aplicação do método em alimentos não enriquecidos, que apresentam baixos teores dessas vitaminas.

Tabela 3-8 Recuperação de padrões adicionados, em diferentes níveis de concentração, em biscoitos de maisena não enriquecidos¹.

Nível	B ₁		B ₂		B ₆		NA		ND	
	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Con.	Rec	Conc.	Rec.
I	0,09	103	0,08	120	0,12	194	0,20	169	1,1	106
II	0,38	105	0,32	98	0,49	114	0,81	75	4,2	107
III	0,76	102	0,64	96	0,98	106	1,63	76	8,4	105
IV	1,14	103	0,96	97	1,47	104	2,44	88	12,7	105
V	1,52	99	1,29	95	1,96	97	3,26	81	16,9	101

¹ Os resultados são médias de determinações em triplicata. NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; Conc.: concentração (mg/100g); Rec.: recuperação (%).

Tabela 3-9 Recuperação de padrões adicionados, em diferentes níveis de concentração, em leite desnatado não enriquecido¹.

Nível	B ₁		B ₂		B ₆		NA		ND	
	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Conc.	Rec.	Con.	Rec	Conc.	Rec.
I	0,20	87	0,15	95	0,24	72	0,30	79	2,0	94
II	0,51	91	0,37	87	0,61	105	1,17	91	5,1	90
III	1,02	104	0,75	93	1,22	102	2,33	111	10,2	102
IV	1,53	105	1,12	98	1,83	99	3,50	102	15,2	99

¹ Os resultados são médias de determinações em duplicata. NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; conc.: Concentração (mg/100mL de leite); Rec.: recuperação (%).

Os **Anexos 7 a 9** mostram os resíduos das concentrações (diferença entre cada valor determinado e a média encontrada) deixados pelas determinações, em triplicata, das vitaminas adicionadas em biscoitos de maisena não vitaminados e em solução padrão, contra as concentrações previstas. Nenhuma das vitaminas apresentou diferença significativa, ao nível de 5%, entre os conjuntos dos resíduos deixados pelas análises dos padrões e aqueles deixados pelas análises das amostras (biscoitos). As vitaminas B₁ e B₂, com concentrações de 4,7 e 4,0 µg/100mL, respectivamente, apresentaram coeficiente de variação (CV) em torno de 20%, durante as determinações em biscoitos. Em concentrações superiores, as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida apresentaram CV em torno de 5%. As vitaminas B₆ e ácido nicotínico apresentaram CV acima de 15%, quando adicionadas em biscoitos em concentrações inferiores a 30µg/mL.

A **Tabela 3-10** apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre duas determinações das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em solução padrão e em biscoitos, com 90% de confiança. Desta forma, espera-se que os valores fornecidos por determinações, em duplicata, difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada. As vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, respectivamente, apresentaram os melhores valores de repetibilidade, com a redução das suas respectivas concentrações. De acordo com a **Tabela 3-11**, a diferença fornecida pelas duas médias de determinações padrões, feitas em triplicata, com um intervalo de 50 dias, permanecem dentro dos limites de repetibilidade esperados para cada vitamina, previamente determinada sob as mesmas condições. O resultado demonstra a estabilidade das curvas padrões, neste intervalo de tempo.

Tabela 3-10 Repetibilidade das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em biscoitos de maisena e em solução padrão, em 5 diferentes níveis de concentração

Vitamina	Concentração (mg/100g)	Repetibilidade (biscoitos)	Concentração (µg/100 mL)	Repetibilidade (padrões)
B₁	0,09	4	4,74	3
	0,38	4	18,96	5
	0,76	6	37,92	5
	1,14	5	56,9	5
	1,52	7	75,8	8
B₂	0,08	5	4,0	4
	0,32	4	16,1	5
	0,64	4	32,2	5
	0,96	5	48,2	4
	1,29	3	64,3	6
B₆	0,12	7	6,1	2
	0,49	9	24,4	6
	0,98	18	48,9	5
	1,47	8	73,3	4
	1,96	8	97,8	6
Ácido nicotínico	0,20	12	10,2	3
	0,81	10	40,7	4
	1,63	9	81,4	5
	2,44	10	122,2	8
	5,26	17	162,9	15
Nicotinamida	1,1	8	52,7	7
	4,2	17	210,8	11
	8,4	18	421,6	16
	12,7	20	632,4	15
	16,9	20	843,2	18

Nível de significância: 10%.

A **Tabela 3-12** apresenta as concentrações das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida determinadas em biscoitos de maisena vitaminados, por combinações fatoriais das variáveis inerentes aos procedimentos de extração e limpeza do extrato, para avaliação da rusticidade do método de determinação simultânea das vitaminas, por CLAE. A **Tabela 3-13** mostra que o tempo de injeção foi a variável com efeito mais pronunciado, entre os tratamentos promovidos, durante as determinações das vitaminas B₁, B₂ e ácido nicotínico. Entretanto, nas condições estudadas, o mesmo foi significativo, ao nível de 5%, apenas para a vitamina B₂, sendo que a injeção com 24 horas apresentou um efeito positivo de 5% sobre a média total desta. A quantidade de amostra foi a variável que exerceu maior influência na determinação da vitamina B₆ e o tempo de extração, a concentração do ácido e o tipo de metanol foram as variáveis de maior efeito na determinação da nicotinamida. Nessas condições, a extração por 30 min, o ácido 0,1N e o metanol Merck exerceram efeitos positivos de, aproximadamente, 5% sobre a média total de nicotinamida.

Tabela 3-11 Diferenças médias deixadas pelas determinações dos padrões ($\mu\text{g}/100\text{mL}$), com 50 dias de intervalo

Determinação	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND
Inicial	78,9	62,6	102,4	188,5	814,4
Após 50 dias	74,3	61,8	100,0	202,6	823,0
Diferença	4,6	0,8	2,4	14,1	8,6

NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida.

Tabela 3-12 Concentrações (mg/100g) das vitaminas determinadas em biscoitos de maisena vitaminados, através de combinações fatoriais, para avaliação da rusticidade do método de determinação simultânea, por CLAE

Combinação*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND
1	0,89	1,30	1,92	2,9	12,1
2	0,95	1,29	1,83	2,1	13,1
3	0,89	1,32	1,59	3,2	13,0
4	0,85	1,37	1,47	1,5	13,3
5	0,82	1,35	1,66	2,1	12,9
6	0,78	1,34	1,75	1,2	13,9
7	0,75	1,32	1,62	2,2	13,3
8	0,76	1,27	1,58	1,0	12,4
9	0,76	1,44	1,74	2,7	12,3
10	0,67	1,31	1,66	3,3	13,1
11	0,77	1,38	1,67	2,7	13,3
12	0,82	1,40	1,72	3,4	13,0
13	0,72	1,36	1,68	2,8	13,6
14	0,72	1,45	1,63	3,3	13,4
15	0,72	1,38	1,73	2,4	13,0
16	0,73	1,33	1,42	2,6	11,3
Média	0,79	1,35	1,67	2,46	12,93
CV (%)	11	2	9	38	0,8
Pr > F	0,70	0,25	0,73	0,78	0,02

* De acordo com a Tabela 3-2; CV: coeficiente de variação; Pr: probabilidade; NA: ácido nicotínico; ND; nicotinamida; F: valor teste-F.

Tabela 3-13 Estimativas dos efeitos das variáveis de extração e limpeza do extrato durante as determinações das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND) em biscoitos de maisena enriquecidos

Vita- mina	Observação	Variáveis*						
		A	B	C	D	E	F	G
B ₁	Estimativa do efeito	0,10	0,02	0,04	-0,05	0,01	-0,02	0,02
	Significância (Pr >F)	0,15	0,74	0,49	0,37	0,92	0,68	0,71
B ₂	Estimativa do efeito	-0,06	0,05	0,00	0,03	-0,01	0,00	0,03
	Significância (Pr >F)	0,05	0,08	0,80	0,17	0,56	0,96	0,14
B ₆	Estimativa do efeito	0,02	-0,09	0,07	-0,05	-0,05	-0,03	0,05
	Significância (Pr >F)	0,80	0,34	0,45	0,57	0,53	0,71	0,56
NA	Estimativa do efeito	-0,9	0,1	-0,3	-0,6	-0,1	-0,1	0,0
	Significância (Pr >F)	0,20	0,90	0,63	0,34	0,79	0,81	0,93
ND	Estimativa do efeito	0,13	-0,11	0,12	0,51	-0,63	0,65	-0,11
	Significância (Pr >F)	0,13	0,15	0,15	0,01	0,01	0,01	0,17

* De acordo com a Tabela 3-1; Pr: probabilidade; F: valor teste-F

3.4 Conclusões

As taxas de recuperação para as vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em leite são satisfatórias. Os dados de recuperação e repetibilidade, em biscoitos, recomendam cautela na aplicação do método, por CLAE, para determinação das vitaminas presentes em baixos níveis de concentração. A recomendação deve ser mais rigorosa, quando consideradas as vitaminas B₆ e ácido nicotínico. A análise de robustez do método mostra que o tempo de injeção é a variável com efeito mais pronunciado, entre os tratamentos promovidos, durante as determinações das vitaminas B₁, B₂ e ácido nicotínico. A

quantidade de amostra é a variável com maior influência na determinação da vitamina B₆ e o tempo de extração, a concentração do ácido e o tipo de metanol são as variáveis de maior efeito na determinação da nicotinamida.

Recomendamos a aplicação do método de determinação simultânea, por CLAE, em alimentos enriquecidos, com grandes vantagens em relação aos métodos recomendados pela AOAC, principalmente pelos fatores que seguem:

- determinação simultânea de 4 vitaminas;
- separação das duas formas da vitamina PP, ácido nicotínico e nicotinamida;
- simplicidade e versatilidade nas etapas de extração e purificação;
- uso de detector UV em substituição ao de fluorescência, com eliminação de reações de derivação;
- menores possibilidades de perdas vitamínicas na execução do método;
- utilização de reagentes com menores níveis de toxicidade e baixo custo;
- rapidez.

3.5 Referências bibliográficas

- ALCOOCK, S.C; FINGLAS, P. M. & MORGAN, M. R. A (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for pyridoxamine and its comparison with alternative analytical procedures. *Food and Agric. Immunol.*, 2 (4), 197-204.
- CAULCUTT, R. & BODDY, R. (1983). *Statistics for analytical chemists*. 1th. ed., Chapman and Hall, Londres, 253p.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O. & SOLIMAN, A. G. (1993). Method modification for liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and pyridoxine in medical foods. *J. AOAC. Int.* 75 (3), 561-565.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; EITENMILLER, R. R. & SOLIMAN, A. G. (1992). Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in infant formula. *J. AOAC Int.*, 75 (3), 561-565.
- CUNNIFF, P. (ed). (1995) *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- DINELLI, G & BONETTI, A. (1994). Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-solubles vitaminas and multi-vitamin integrators. *Electrophoresis*, 15 (8-9), 1147-1150.

- FINGLAS, P. M. & MORGAN, M. R. A. (1994). Application of biospecific methods to the determination of B-group vitamins in food - a review. *Food Chem.*, **49**, 191-201.
- FINGLAS, P. M.; FAURE, U. & WAGSTAFFE, P. J. (1993). Improvements in the determination of vitamins in food through intercomparisons and preparation of RMs for vitamin analysis within the BCR programme. *Frenesius J. Anal. Chem.*, **345**, 180-184.
- FINGLAS, P. M. & FAULKS, R. M. (1984). The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in potatoes. *Food Chem.*, **15**, 37-44.
- GODOY, H. T. (1996). Análise de vitaminas - Interpretação e expressão de resultados. In: *II Seminário sobre Alimentos Enriquecidos*. ITAL, Campinas. p. 59-70.
- HIRAYAMA, S. & MARAYAMA, M. (1991). Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by HPLC. *J. Chrom.* **588**, 171-175.
- HOLLMAN, P. C.; BOENKE, A. & WAGSTAFFE, J. P. (1993a). The certification of major components and major elements in five food reference materials. *Frenesius J. Anal. Chem.*, **345**, 174-179.
- HOLLMAN, P. C.; SLANGEN, J. H.; WAGSTAFFE, J. P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T. & FINGLAS, P. M. (1993b). Intercomparison of methods for the determination of vitamins in food. *Analyst*, **118**, 481-488.
- LEE, H. A.; MILLS, E. N. C.; FINGLAS, P. M. & MORGAN, M. R. A. (1990). Rapid biospecific methods of vitamin analysis. *J. Micronut. Analysis*, **7**, 261-270.
- MACRAE, R. (1990). HPLC determination of vitamins. *J. Micronut. Anal.*, **7**, 247-260.
- MARINI, D.; SORRENTINO, M.; BALESTRIERI, F. & MAGRI, A. L. (1988). Determinazione di tiamina, riboflavina e ácido nicotínico in paste alimentari vitaminizzate. *Tec. Molitoria*, **39**, 1-7.
- MUÑOZ, A.; ORTIZ, R. & MURCIA, M. A. (1994). Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and non dairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chem.*, **49**, 203-206.
- POLESELLO, A. & RIZZOLO, A. (1986). Application of HPLC to the determination of water-soluble vitamins in foods: 2 (a review 1981-1985). *J. Micronut. Anal.*, **2**, 153-187.
- RUSSEL, L. F. & VANDERSLICE, J. T. (1992). Comments on the standard fluorometric determination of riboflavin in foods and biological tissues. *Food Chem.*, **43**, 79-82.
- SABINO, M. (1996). Análise de vitaminas - Interpretação e expressão de resultados. In: *II Seminário sobre Alimentos Enriquecidos*. ITAL, Campinas. p. 53-58.
- Van SCHOONHOVEN, J.; SCHRIJVER, J.; BERG, H. & HAENEN, G. R. M. M. (1994). Reliable and sensitive HPLC method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B₆ in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1475-1480.
- SILVA, M. G. (1996).). Análise de vitaminas - Interpretação e expressão de resultados. In: *II Seminário sobre Alimentos Enriquecidos*. ITAL, Campinas. p. 83-86.
- SKURRAY, G. R. (1981). A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamin in foods. *Food Chem.* **7**, 77-80.
- SOGA, T. (1994). Simultaneous Analysis of water-solublesvitamins using capillary electrophoresis. *Hewlet-Packard Appl. Notes*, 12-5962-98126, Jun. 4p.
- STEINER, E. H. (1982). Planning and analysis of results of collaborative tests. In: *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. 3th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 88p.

- TOMA, R. B. & TABEKHIA, M. M. (1979). HPLC analysis of B vitamins in rice and rice products. *J. Food Sci.*, **44** (1), 263-265.
- ULBERTH, F. (1993). Optimizing methods by ruggedness testing. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. Proceedings of an International Seminar. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. *Int. Dairy Federation, Belgica*, **9302**, 202-203.
- WEHLING, R. L. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin and thiamin in fortified cereals products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1326-1331.
- WERNIMONT, G. T. (1985). *Use of statistics to develop and evaluate analytical methods*. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, 183p.
- WILRICH, P. (1993). Role of statistics in analytical quality assurance. In: Analytical quality assurance and good laboratory practice in dairy laboratories. *International Seminar of AOAC*. AOAC International, CEC, IDF, VDM, Alemanha, 1992. *Int. Dairy Federation, Belgica*, **9302**, 61-79.
- YOU DEN, W. J. (1982). Statistical techniques for collaborative tests. In: *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. 3th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 88p.

Capítulo 4

Determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em biscoitos enriquecidos

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE¹, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM BISCOITOS ENRIQUECIDOS

Resumo

O mercado brasileiro vem oferecendo uma grande variedade de biscoitos enriquecidos com vitaminas do complexo B, nos últimos anos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de enriquecimento, entre os diferentes tipos e marcas de biscoitos enriquecidos, utilizando a CLAE para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP. Foram analisados 3 lotes diferentes de 24 tipos/marcas de biscoitos. As vitaminas são extraídas com ácido diluído, através de vibração ultra-sônica, e a limpeza do extrato é feita pela adição de metanol e refrigeração. As vitaminas são separadas em coluna C18, em eluição por gradiente com 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA² 5mM; 0,15% de TEA³; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. A detecção é feita através da absorção da radiação na região do ultravioleta e a quantificação por padronização externa. Os biscoitos de chocolate apresentaram interferentes que dificultaram a determinação da vitamina B₆. Todos os diferentes tipos de biscoitos, de uma única marca, apresentaram apenas 30% dos teores de vitamina B₂, descritos nas embalagens dos produtos. Os biscoitos de coco, de uma segunda marca, apresentaram níveis vitamínicos aproximadamente dobrados, em relação aos valores declarados. Os demais biscoitos apresentaram níveis vitamínicos de acordo com os valores declarados, ou com pequenas variações em relação a estes.

¹ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

² Ácido hexanosulfônico

³ Trietilamina

Abstract

In recent years a great variety of enriched biscuits have become available on the Brazilian market. The objective of this research was to determine the levels of enrichment in different types and brands of enriched biscuits using HPLC¹ for the simultaneous determination of the vitamins B₁, B₂, B₆ and PP. Three different batches of 24 types/brands of biscuit were analysed. The vitamins were extracted using dilute acid and ultrasonic vibration and the clean-up effected by the addition of methanol followed by refrigeration. The vitamins were separated on a C 18 column and gradient elution starting at 2% acetonitrile plus 98% aqueous phase (5mM SHA²; 0.15% TEA³ the pH being adjusted to 2.8 with dilute H₂SO₄), changing to 3% acetonitrile and 97% aqueous phase after 3 minutes and to 2% acetonitrile, 41% aqueous phase and 57% methanol after 23 minutes. Detection was carried out by absorption in the ultraviolet region and quantification by external standards. The chocolate flavoured biscuits presented interference which hampered the detection of vitamin B₆. Of one brand, all the different types of biscuit analysed presented only 30% of the levels of vitamin B₂ stated on the package. The coconut biscuits of a second brand presented approximately double the levels of vitamin stated on the package. The remaining biscuits tested presented vitamin levels equivalent to those stated on the package or with only slight variations.

¹ High performance liquid chromatography

² Hexanesulfonic acid

³ Trimethylamine

4.1 Introdução

Os derivados de cereais são responsáveis por mais de 40% da ingestão de tiamina e aproximadamente 30% da ingestão de niacina e riboflavina nos Estados Unidos. A maior parte destes nutrientes são provenientes de enriquecimento e fortificação: 31% da tiamina; 18% da riboflavina e 19% de niacina [COOK e WELSH, 1987]. Embora uma grande variedade de alimentos enriquecidos, com vitaminas do complexo B, estejam sendo oferecidos no mercado brasileiro, a grande diversidade de tipos e marcas de biscoitos vitaminados fazem destes produtos um dos principais veículos dessas vitaminas.

A aplicação de branqueamento, maturação e agentes oxidantes, em condições normais de processamento, não apresenta nenhum efeito sobre as vitaminas adicionadas no enriquecimento da farinha de trigo [RANUM, 1991]. Nenhuma perda mensurável de tiamina tem sido observada durante a produção e assamento de pães e, durante a estocagem do produto, as perdas são mínimas. Entretanto, a sua destruição, durante o assamento de biscoitos, é extensiva em função da elevada área superficial e do pH suficientemente elevado, consequência da substituição do fermento pela soda [RANHOTRA e GELROTH, 1986]. Visando a estabilidade, o mononitrato de tiamina tem sido a forma mais empregada no enriquecimento dos derivados de cereais.

A riboflavina é muito sensível a luz, o que pode ser um problema no caso de embalagens transparentes, sendo que a instabilidade aumenta com a temperatura e o pH. A niacina é uma das vitaminas mais estáveis e, em função do tratamento alcalino, tal como é usado no tratamento de tortilhas e biscoitos, ocorre um aumento da niacina assimilável, provavelmente em função da hidrólise da niacina ligada durante o assamento [BOCK, 1991; RANUM, 1991; RANHOTRA e GELROTH, 1986]. A piridoxina, aparentemente, não apresenta grandes problemas de estabilidade em produtos de panificação.

A determinação das vitaminas do complexo B em produtos de panificação tem sido feita por métodos microbiológicos [RANHOTRA E GELROTH, 1986], fluorimétricos [RANHOTRA e GELROTH, 1986] e por CLAE [HAGG, 1994; WEHLING e WETZEL, 1984; MAURO e WETZEL, 1984; FELLMAN *et alii*, 1982; AUGUSTIN *et alii*, 1982]. AGOSTINI e GODOY (1996) desenvolveram e validaram uma metodologia, por CLAE, com aplicação em alimentos enriquecidos, que, além das vantagens de eficiência, rapidez e simplicidade, permite a determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, com separação das duas formas da última vitamina, ácido nicotínico e nicotinamida.

Este trabalho teve como objetivo a determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, por CLAE, em biscoitos enriquecidos.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material

Foram analisadas 24 tipos/marcas de biscoitos enriquecidos, de acordo com a disponibilidade no mercado, sendo: 5 marcas de biscoitos de maisena (marca comercial grafada com Z, registrada), 5 marcas de biscoitos de leite, 4 marcas de biscoitos maria, 2 marcas de biscoitos de coco e 8 marcas de biscoitos recheados de morango, sendo 4 destes com massa de chocolate. Para cada marca/tipo de biscoito, foram analisados 3 diferentes lotes, identificados pela data de fabricação. As amostras foram adquiridas, entre setembro de 1995 e janeiro de 1996, em 5 supermercados de médio e grande porte na cidade de Campinas, SP, sendo que apenas a marca RC foi proveniente da cidade de Fortaleza, CE. Os ingredientes descritos nas embalagens dos produtos analisados estão dispostos no **Anexo 10**. As amostras foram preparadas com 200 g de biscoitos, previamente homogeneizados em multiprocessador de alimentos. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

4.2.2 Reagentes

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆), ácido nicotínico (vitamina PP) e nicotinamida (vitamina PP) foram cedidos pela F. HOFFMANN-LA ROCHE Ltda, São Paulo, Brasil. O sal sódico do 1-ácido hexanosulfônico, aproximadamente 98%, foi fornecido pela SIGMA Chemicals Co, USA. O metanol (*ominsolv*) e a trietilamina (para síntese) foram fornecidos pela MERCK, Alemanha. A acetonitrila com pureza cromatográfica foi fornecida pela MERCK, Brasil. Todos os outros reagentes químicos utilizados apresentaram grau de pureza analítico e foram obtidos no comércio local. A água, utilizada no preparo das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros FLUOROPORE (MILLIPORE HAWP 0013), com poros de 0,45 µm de diâmetro, e degaseificadas em banho ultra-sônico.

4.2.3 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido VARIAN com bomba ternária modelo 9010, sistema de injeção manual tipo *Rheodyne*, equipado com *loop* de 20 µL, detector policromático de arranjo de diodos, modelo 9065. Acoplado a esse sistema um integrador VARIAN, modelo 4400. Foram utilizadas coluna analítica *Spherisorb* ODS-2, 5µm, 150 x 4,6 mm, SIGMA-ALDRICH, USA e colunas de guarda C18, 5 µm, ODS-1 VARIAN, empacotadas no laboratório.

4.2.4 Métodos

4.2.4.1 Extração

Entre 4 e 5 g de amostra, previamente homogeneizadas, foram utilizadas para a extração das vitaminas, feita com 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N em banho ultra-sônico, por 60

min. A limpeza do extrato é feita pela adição de metanol, em quantidade suficiente para completar 100mL, e refrigeração a -18°C, por 60 min. O extrato é filtrado em papel de filtro comum e, antes de ser injetado no cromatógrafo, em filtros fluoropore (MILLIPORE FHLP 01300), com poros de 0,5µm.

4.2.4.2 Cromatografia

As vitaminas são separadas através de eluição por gradiente, em vazão de 0,7 mL/min, com 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA 5mM; 0,15% de TEA; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. As condições iniciais são, então, retomadas e a coluna é re-equilibrada por 20 min. Os compostos são detectados pela absorção na região do ultra violeta a 254 nm até 9 min., 287 nm entre 9 e 15 min e 254 nm entre 15 e 23 min. A identificação é feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros de absorção, fornecidos pelo detector de arranjo de diodos. Os graus de pureza dos picos são determinados pelas razões entre as absorbâncias obtidas em diferentes λ . A quantificação das vitaminas é feita por curvas de padronização externa, contruídas com 6 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de 3 determinações. As curvas foram feitas com 1, 4, 8, 12, 16 e 20 mL de solução padrão contendo 5,11; 3,99; 6,09; 50,75; e 11,67 µg/100 mL das vitaminas B₁, B₂, B₆, nicotinamida e ácido nicotínico, respectivamente. As alíquotas são diluídas para 45 mL com água e para 100 mL com metanol, imediatamente filtradas em filtros fluoropore (MILLIPORE FHLP 01300), com poros de 0,5µm, e injetadas no cromatógrafo. Todas as etapas desenvolvidas são devidamente protegidas da luz.

4.2.4.3 Determinação de pH

O pH das amostras foi determinado, por potenciometria, a partir de suspensões a 10%, conforme método da AOAC nº 940.22 [CUNNIFF, 1995].

4.3 Resultados e discussão

A **Figura 4-1** mostra os perfis cromatográficos da solução padrão e dos extratos vitamínicos de algumas amostras de biscoitos. Os **Anexos 1, 2 e 3** mostram perfis de alguns espectros, obtidos através de detector de arranjo de diodos, nos tempos de retenção correspondentes às vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida. O grau de pureza de cada pico foi observado através das relações entre absorvâncias, de cada vitamina, obtidas em 2 diferentes λ . As relações obtidas para os biscoitos analisados foram comparadas com aquelas obtidas para os padrões. A **Tabela 4-1** apresenta as relações entre absorvâncias de cada vitamina, obtidas em diferentes λ , para os padrões e os diferentes biscoitos analisados. As relações mais diferenciadas, entre as vitaminas presentes nas soluções padrões e nas amostras, foram aquelas obtidas para o ácido nicotínico, forma vitamínica naturalmente presente em alimentos, como farinhas e biscoitos. Embora esta vitamina apresente um pico cromatográfico sempre muito fino, este coeluiu com a cauda de um interferente, o que influenciou, parcialmente, na identificação e quantificação desta vitamina. Entretanto, os resultados obtidos funcionaram, satisfatoriamente, como uma estimativa do valor real desta vitamina em biscoitos. Em biscoitos recheados, com massa de chocolate, um interferente, provavelmente presente no cacau, dificultou a determinação da vitamina B₆. Em biscoitos de leite, da marca RC', a determinação da vitamina B₂ também foi dificultada pela presença de interferente (**Figura 4-1d**). As **Tabelas 4-2 à 4-7** apresentam os teores vitamínicos determinados nos diferentes tipos de biscoitos.

Todos os diferentes tipos de biscoitos da marca NS apresentaram menos de 30% do teor de vitamina B₂ descrito na embalagem. Esses baixos teores, provavelmente, são consequência de degradações durante o processamento dos biscoitos, pois nenhum outro produto analisado, da mesma marca, apresentou este perfil vitamínico, sendo que a farinha láctea NS (**Capítulo 5**) chegou a apresentar o dobro dos níveis de B₁ e B₂, em relação aos valores declarados. Além disso, um pico cromatográfico (Z), com tempo de retenção 4-5

min inferior ao da vitamina B₂ (**Figura 4-1b**), detectado apenas nos biscoitos desta marca, apresentou o mesmo perfil do espectro de absorção desta vitamina (**Anexo 1 g**). Se considerado com a mesma atividade da vitamina B₂, a soma dos 2 picos forneceria os teores vitamínicos declarados nas embalagens dos biscoitos desta marca.

Os biscoitos de maisena CR apresentaram 70% do valor descrito para a vitamina B₂. Os biscoitos de coco da marca BD (**Figura 4-1c**) apresentaram níveis vitamínicos aproximadamente dobrados, em relação aos valores declarados nas embalagens deste produto. Os demais produtos analisados apresentaram níveis vitamínicos de acordo com os valores declarados, ou com pequenas variações em relação a estes.

Tabela 4-1 Razão entre absorbâncias a 234 e 254 nm, para as vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND), e a 254 e 278 nm, para a vitamina B₆

Amostras	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND
Maisena NS	245	244	267	242	247
Maisena RC	241	244	264	240	246
Maisena IL	245	244	270	243	247
Maisena CR	245	246	264	241	246
Maisena TD	244	245	269	242	246
Maria NS	245	246	266	244	247
Maria TR	245	246	267	244	246
Maria IL	245	246	266	243	247
Maria CR	244	246	266	244	247
Leite BD	244	244	270	243	247
Leite TR	243	246	267	242	249
Leite RC	243	247	268	240	246
Leite RC'	243	245	269	245	247
Leite BL	244	246	267	241	248
Coco NS	245	247	266	243	247
Coco BD	245	247	267	243	248
Chocolate CR	244	244	264	242	247
Chocolate NB	242	243	267	241	247
Chocolate RC	240	246	267	240	247
Chocolate RC'	241	246	265	240	247
Morango NS	247	251	267	240	247
Morango TR	245	245	266	240	247
Morango IL	242	244	267	241	247
Morango BD	246	244	266	243	245
Padrões	242; 245	243, 247	268, 269	249	247

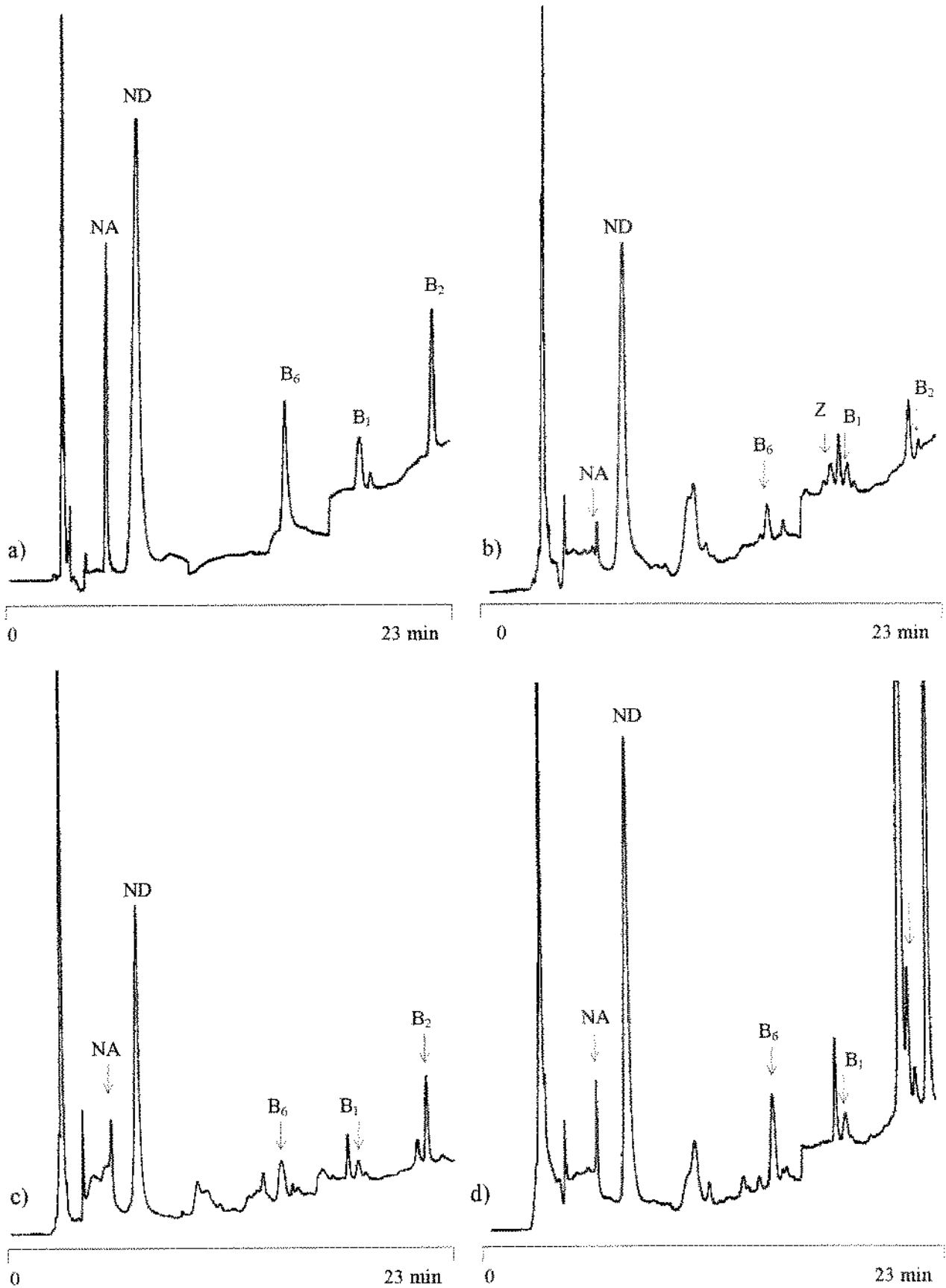


Figura 4-1 Perfis cromatográficos: (a) de solução padrão, (b) de biscoitos de morango NS; (c) de biscoitos de coco BD; e (d) de biscoitos de leite RC^o (d). Condições cromatográficas descritas no texto.

Tabela 4-2 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em biscoitos de maisena enriquecidos

Marcas/lotos	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
NS1	5	0,85	0,28	1,6	2,1	18,6	20,7
NS2	5	1,07	0,25	1,2	2,3	17,1	19,4
NS3	6	1,00	0,31	1,0	0,8	15,8	16,6
Média - DP		0,97 - 0,11	0,28 - 0,03	1,2 - 0,3	1,7 - 0,8	17,2 - 1,4	18,9 - 2,1
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
RC1	5	0,45	0,87	1,2	1,0	10,0	11,2
RC2	5	0,46	0,96	1,4	1,8	10,0	11,8
RC3	5	0,71	0,86	1,4	1,4	10,3	11,7
Média - DP		0,54 - 0,15	0,90 - 0,06	1,4 - 0,1	1,4 - 0,4	10,2 - 0,2	11,6 - 0,3
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
IL1	4	0,67	0,93	1,3	1,0	13,3	14,2
IL2	5	1,12	1,13	1,0	1,5	11,5	12,9
IL3	7	0,99	1,09	1,1	1,9	12,0	—
Média - DP		0,93 - 0,23	1,05 - 0,11	1,1 - 0,2	1,2 - 0,4	12,3 - 0,9	13,6 - 0,9
Embalagem*		0,96	1,08	1,20	—	—	10,40
CR1	12	1,09	1,02	1,1	1,8	12,5	14,32
CR2	12	0,86	0,97	1,1	2,2	12,3	14,56
CR3	16	1,09	1,23	1,7	2,2	10,8	12,96
Média - DP		1,03 - 0,13	1,07 - 0,14	1,3 - 0,3	2,1 - 0,3	11,9 - 1,0	14,0 - 0,9
Embalagem*		1,04	1,43	1,22	—	—	13,54
TD1	5	1,20	1,15	1,8	1,9	14,1	15,3
TD2	7	1,13	1,07	1,7	2,0	12,7	14,8
TD3	8	1,36	1,37	2,2	2,3	12,6	14,9
Média		1,23 - 0,12	1,20 - 0,16	1,9 - 0,2	2,1 - 0,2	13,1 - 0,9	15,0 - 0,3
Embalagem*		0,60	1,08	1,02	—	—	12,06

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; * valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficiente de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 4-3 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em biscoitos maria enriquecidos

Marcas/lotos	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
NS1	4	0,90	0,22	1,5	1,7	15,5	17,2
NS2	4	0,78	0,19	1,2	2,0	14,7	16,6
NS3	6	0,90	0,28	1,2	1,8	15,0	16,8
Média - DP		0,86 - 0,07	0,23 - 0,05	1,3 - 0,2	1,8 - 0,1	15,1 - 0,4	16,9 - 0,3
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
TR1	5	0,45	1,23	1,6	1,8	13,0	14,8
TR2	7	1,01	0,93	1,5	0,8	12,4	13,2
TR3	7	0,85	1,03	1,6	2,0	13,7	15,7
Média - DP		0,77 - 0,29	1,06 - 0,15	1,6 - 0,1	1,5 - 0,6	13,0 - 0,7	14,6 - 1,3
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
IL1	3	1,10	1,37	1,2	1,7	10,7	12,3
IL2	3	1,35	0,98	0,8	1,2	11,0	12,2
IL3	5	1,45	1,07	1,1	1,0	14,3	15,4
Média - DP		1,30 - 0,18	1,14 - 0,21	1,0 - 0,2	1,3 - 0,3	12,0 - 2,0	13,3 - 1,8
Embalagem*		0,96	1,08	1,20	—	—	10,40
CR1	11	1,19	1,28	1,9	2,2	10,5	12,7
CR2	11	0,99	1,32	1,4	2,1	11,0	13,1
CR3	12	0,91	1,07	1,0	1,1	12,3	13,5
Média - DP		1,03 - 0,14	1,22 - 0,13	1,4 - 0,5	1,8 - 0,6	11,3 - 1,0	13,1 - 0,4
Embalagem*		1,07	1,47	1,26	—	—	13,89

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; * valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficiente de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 4-4 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em biscoitos de leite enriquecidos

Marcas/lotos	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
BD1	7	0,87	1,8	1,4	2,0	13,6	15,6
BD2	10	1,09	1,5	2,0	0,6	15,8	16,4
BD3	11	0,97	1,4	1,6	1,1	14,9	16,0
Média - DP		0,98 - 0,11	1,6 - 0,2	1,7 - 0,3	1,2 - 0,7	14,8 - 1,1	15,8 - 0,7
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	10,20
TR1	9	0,65	0,82	1,8	2,2	12,3	14,4
TR2	9	0,62	1,06	1,7	1,9	12,1	14,0
TR3	9	0,77	1,03	1,4	0,7	10,8	11,5
Média - DP		0,68 - 0,08	0,97 - 0,13	1,7 - 0,2	1,6 - 0,8	11,7 - 0,8	13,3 - 1,6
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
RC1	6	1,29	1,15	1,5	0,8	13,4	14,2
RC2	6	1,24	1,06	1,9	1,2	12,5	13,7
RC3	6	1,17	1,09	1,8	0,8	13,9	14,8
Média - DP		1,22 - 0,09	1,10 - 0,05	1,7 - 0,2	0,9 - 0,3	13,3 - 0,7	14,2 - 0,5
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
RC*1	6	0,52	1,60	2,2	0,5	14,0	14,5
RC*2	6	0,83	1,32	2,3	0,9	15,5	16,4
RC*3	6	0,76	1,28	2,3	1,0	14,9	15,9
Média - DP		0,70 - 0,16	1,40 - 0,17	2,2 - 0,1	0,8 - 0,2	14,8 - 0,8	15,6 - 1,0
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
BL1	8	1,59	1,17	1,3	0,8	11,5	12,2
BL2	9	1,39	1,19	1,6	1,3	12,5	13,9
BL3	9	1,48	1,34	1,6	1,6	11,0	12,6
Média - DP		1,49 - 0,1	1,23 - 0,09	1,5 - 0,2	1,2 - 0,4	11,7 - 0,8	12,9 - 0,8
Embalagem*		0,96	1,08	1,20	—	—	10,40

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; * valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 4-5 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em biscoitos de coco enriquecidos

Marcas/lotes	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
NS1	4	0,83	0,28	1,1	1,9	14,3	16,2
NS2	5	0,59	0,41	1,0	0,5	13,3	13,8
NS3	6	1,19	0,21	1,0	0,7	15,2	15,9
Média - DP		0,87 - 0,30	0,30 - 0,10	1,0 - 0,1	1,0 - 0,8	14,3 - 0,9	15,3 - 1,3
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
BD1	8	0,73	2,02	2,2	1,1	17,0	18,08
BD2	6	1,53	1,61	2,0	2,4	17,7	20,07
BD3	11	1,13	1,83	2,4	1,7	19,2	20,84
Média - DP		1,13 - 0,4	1,82 - 0,21	2,2 - 0,2	1,7 - 0,7	18,0 - 1,1	19,66
Embalagem*		0,60	0,90	1,2	—	—	10,2

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 4-6 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em biscoitos de chocolate enriquecidos, recheados

Marcas/lotes	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
CR1	10	0,62	0,93	—	0,9	10,2	11,1
CR2	10	0,83	0,92	—	0,6	10,0	10,6
CR3	11	1,11	0,78	—	0,6	10,0	10,5
Média - DP		0,85 - 0,25	0,88 - 0,08	—	0,7 - 0,2	10,0 - 0,2	10,7 - 0,3
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	11,00	—
NB1	0	0,91	0,96	1,4	—	15,6	—
NB2	3	0,80	1,20	0,8	1,5	19,3	20,8
NB3	4	0,61	1,21	—	1,7	19,9	21,6
Média DP		0,77 - 0,15	1,12 - 0,14	1,13 - 0,40	1,59 - 0,16	18,3 - 2,3	21,2 - 0,5
Embalagem*		0,8	0,9	1,3	—	—	12,0
RC1	5	0,72	1,00	1,5	0,7	11,0	11,7
RC2	6	0,74	1,07	1,7	0,4	11,2	11,6
RC3	6	1,00	0,93	1,3	0,7	11,1	11,8
Média DP		0,82 - 0,16	1,00 - 0,07	1,5 - 0,2	0,6 - 0,2	11,1 - 0,1	11,7 - 0,1
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,0
RC*1	5	0,76	1,19	1,5	1,0	12,8	13,8
RC*2	5	0,87	1,09	1,7	0,4	13,4	13,8
RC*3	6	1,10	1,22	—	1,2	13,7	15,1
Média DP		0,91 - 0,17	1,17 - 0,07	1,6 - 0,2	0,9 - 0,4	13,3 - 0,4	14,2 - 0,8
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,0

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 4-7 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em biscoitos enriquecidos recheados de morango

Marcas/lotos	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
NS1	4	1,09	0,40	1,5	1,3	15,0	16,7
NS2	4	1,23	0,24	1,5	0,5	18,3	18,8
NS3	4	1,08	0,33	1,3	0,7	19,3	20,0
Média - DP	—	1,13 - 0,08	0,32 - 0,08	1,4 - 0,3	0,8 - 0,4	17,6 - 2,2	18,5 - 1,7
Embalagem*	—	0,60	0,90	1,20	—	11,00	—
TR1	9	0,75	0,77	1,1	0,8	10,0	10,8
TR2	9	0,57	1,09	1,5	0,9	11,3	12,3
TR3	10	0,71	0,94	1,8	0,9	11,8	12,7
Média - DP	—	0,68 - 0,09	0,93 - 0,16	1,4 - 0,4	0,9 - 0,1	11,0 - 1,0	11,9 - 1,0
Embalagem*	—	0,60	0,90	1,20	—	—	11,00
IL1	6	0,91	1,14	1,4	0,5	12,2	12,7
IL2	6	0,88	1,17	1,0	0,4	11,6	12,1
IL3	7	1,00	1,19	1,6	0,7	11,7	12,3
Média - DP	—	0,93 - 0,06	1,17 - 0,03	1,3 - 0,3	0,53 - 0,11	11,84 - 0,31	12,4 - 0,3
Embalagem*	—	0,96	1,08	1,20	—	—	10,4
BD1	8	0,73	1,21	1,2	0,4	10,9	11,3
BD2	9	0,74	0,96	1,2	0,8	11,6	12,4
BD3	11	0,71	1,00	1,1	0,4	10,5	10,8
Média DP	—	0,73 - 0,02	1,06 - 0,13	1,2 - 0,0	0,5 - 0,3	11,0 - 0,6	11,5 - 0,8
Embalagem*	—	0,60	0,90	1,20	—	—	10,2

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Aparentemente, as vitaminas se mantêm estáveis durante a vida útil do produto, sendo que não foi observada alguma tendência de redução dos teores vitamínicos em lotes com menores prazos de validade. Nenhuma relação foi observada entre os níveis vitamínicos e os diferentes tipos de biscoitos analisados. Os biscoitos de coco, da marca BD, apresentaram os maiores teores vitamínicos, entre todas as amostras analisadas, enquanto que os biscoitos de leite, da marca RC, apresentaram altos níveis de B₆. Os biscoitos recheados apresentaram os menores níveis vitamínicos, entre os biscoitos analisados da marca BD e CR. Os diferentes tipos de biscoitos das marcas NS, TR e IL apresentaram níveis vitamínicos semelhantes, dentro da mesma marca. A **Figura 4-2** mostra a relação entre as médias totais de cada vitamina, determinadas entre os diferentes tipos de biscoitos fornecidos pela mesma marca, entre as quais foram analisados 3 ou mais tipos de biscoitos enriquecidos. Estes níveis foram significativamente diferentes, ao nível de 5%, apenas para a vitamina B₂, determinada na marca NS, indicando, desta forma, que os diferentes fabricantes apresentaram níveis de enriquecimento semelhantes nestes produtos.

Considerando a sensibilidade das vitaminas, com relação às diferentes faixas de pH, os valores deste foram determinados em todos os biscoitos analisados (**Tabela 4-8**), entretanto, não foi observada nenhuma relação entre estes valores e os teores vitamínicos determinados.

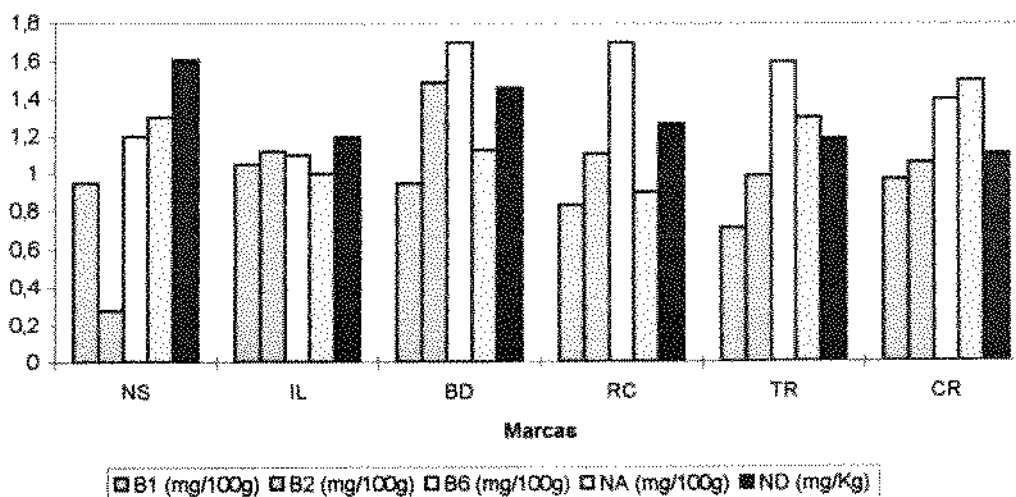


Figura 4-2 Médias de teores vitamínicos, com relação às diferentes marcas de biscoitos enriquecidos.

Tabela 4-8 Valores de pH dos biscoitos analisados, provenientes de diferentes fabricantes

Produto	pH	Produto	pH
Biscoitos de leite		Biscoitos de maisena	
BD	6,8	NS	6,4
TR	6,8	RC	6,3
RC	7,3	IL	6,4
RC*	6,8	CR	6,5
BL	6,9	TD	6,5
Biscoitos maria		Biscoitos de coco	
NS	6,7	NS	7,2
TR	6,0	BD	7,0
IL	6,5	---	---
CR	7,0	---	---
Biscoitos de chocolate recheados		Biscoitos recheados de morango	
CR	6,7	NS	6,7
NB	6,7	TR	6,8
RC	6,8	IL	6,6
RC*	7,0	BD	6,5

As taxas de recuperação das vitaminas determinadas por CLAE, em biscoitos de maisena não enriquecidos, variaram entre 96-114%, para concentrações entre 5-100 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ de vitamina B₁, B₂ e B₆ e entre 100-750 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ de nicotinamida. As mesmas taxas variaram entre 75-88%, para concentrações entre 15-175 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ de ácido nicotínico.

Considerando-se 40 g a porção média diária de biscoitos doces para coletividades [SILVA e MONNERAT, 1986], os teores vitamínicos descritos na maioria das embalagens dos biscoitos enriquecidos (0,60, 0,90, 1,20 e 11,00 mg/100 para as vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP, respectivamente) correspondem a cerca de 20% da RDA média para a vitamina B₁ e 25% desta para as vitaminas B₂, B₆ e PP. De acordo com estes percentuais e com a média calórica para biscoitos doces, que, segundo FRANCO (1992), é de 379 cal/100g, a ingestão vitamínica/2000cal de produto corresponde a cerca de 2,5 e 3,0 RDAs para as vitaminas B₁, B₂, respectivamente, e 3,5 RDAs para as vitaminas B₆ e PP. Estes dados sugerem a necessidade de maior rigor no estabelecimento das taxas de enriquecimento dos biscoitos, de acordo com as calorias fornecidas pelo produto, com o objetivo de prevenir ingestões excessivas dessas vitaminas.

4.4 Conclusões

- A determinação do ácido nicotínico, nos biscoitos enriquecidos, é dificultada pela presença de compostos interferentes, que coeluem com a mesma, entretanto os resultados obtidos fornecem uma estimativa bastante satisfatória do teor dessa vitamina.
- Interferentes presentes nos biscoitos de chocolate e nos biscoitos de leite RC' dificultaram a determinação das vitaminas B₆ e B₂, respectivamente. As demais determinações foram facilmente conduzidas pelo método apresentado.

- Os biscoitos da marca NS apresentaram apenas 30 % dos teores de vitamina B₂ descritos nas embalagens dos produtos. Apenas os biscoitos dessa marca apresentaram um pico com características espectrais idênticas a B₂, sendo, provavelmente, um produto de degradação dessa vitamina.
- Os biscoitos de coco da marca BD apresentaram níveis vitamínicos aproximadamente dobrados, em relação aos valores declarados.

4.5 Referências bibliográficas

- AGOSTINI, T. S. & GODOY, H. T. (1996). Otimização e validação de metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, por CLAE. In: *Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, por CLAE*. Tese de doutorado em Ciências de Alimentos. FEA, UNICAMP, Campinas. p 85-113.
- AUGUSTIN, J.; TASSINARI, P. D.; FELLMAN, J. K. & COLE, C. L. (1982) B vitamin content of selected cereals and baked products. *Cereal Foods World*, **27** (4), 159-161.
- BOCK, M. A. (1991). Minor constituents of cereals. In: *Handbook of Cereal Science and technology*. New York: Ed. Lowrenz. 883p.
- COOK, D. A. & WELSH, S. O. (1987). The effect of enriched and fortified grain products on nutrient intake. *Cereal Foods World*, **32** (2), 191-196.
- CUNNIFF, P. (ed). (1995) *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- FELLMAN, J. K.; ARTZ, W. E.; TASSINARI, P. D. & AUGUSTIN, J. (1982). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by HPLC. *J. Food Sci.*, **47**, 2048-2050.
- FRANCO, G. (1992). *Tabela de Composição Química de Alimentos*. 8ª ed. Livraria Atheneu Ed., Rio de Janeiro - São Paulo, 230p.
- HAGG, M. (1994). Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. *J. AOAC Int.*, **77** (3), 681-686.
- MAURO, D. J. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using selective detection. *J. Chrom.*, **299**, 281-287.
- RANHOTRA, G. S. & GELROTH, J. A. (1986). Stability of enrichment vitamins in bread and cookies. *Cereal Chem.*, **63** (5), 401-403.
- RANUM, P. (1991). Cereal enrichment. In: *Handbook of Cereals Science and Technology*. Ed. Lowrenz, New York. 882p.

SILVA, L. B. & MONNERAT, M. P. (1986). *Alimentação para Coletividades*. 2ª ed. Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 246p.

WEHLING, R. L. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin and thiamin in fortified cereals products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1326-1331.

Capítulo 5

Determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA, POR CLAE¹, DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM ALIMENTOS ENRIQUECIDOS

Resumo

Uma ampla variedade de alimentos enriquecidos vem sendo oferecida no mercado brasileiro, nos últimos anos. O principal alvo desses programas de enriquecimento está relacionada com o *marketing* do produto, o que nem sempre vai de encontro com a garantia da melhor qualidade nutricional. O objetivo deste trabalho foi a determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, por CLAE, em alguns alimentos enriquecidos. As vitaminas são extraídas em solução ácida, através de vibração ultra-sônica. A limpeza do extrato é feita pela adição de metanol e refrigeração. As vitaminas são separadas em colunas C18, utilizando eluição por gradiente com 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA²5mM; 0,15% de TEA³; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. As vitaminas são detectadas através de detector ultravioleta e quantificadas por padronização externa. Entre as 5 marcas de flocos de milho analisadas, 4 apresentaram menos de 30% dos níveis vitamínicos declarados. Uma marca de macarrão, entre as 3 analisadas, não apresentou nenhuma das vitaminas descritas nas embalagens do produto. As farinhas lácteas, em geral, apresentaram níveis vitamínicos superiores aos declarados. O complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular apresentou teores de B₁, B₂ e nicotinamida superiores a 300% dos valores declarados. Os resultados indicaram a necessidade de maior rigor no controle dos teores vitamínicos desses produtos.

¹ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

² Ácido hexanosulfônico

³ Trietilamina

Abstract

In recent years a wide variety of enriched foods have become available on the Brazilian market. The main target of these enrichment programmes is related to the *marketing* of the product, which does not necessarily guarantee the best nutritional quality. The objective of this research was the simultaneous determination by HPLC¹ of the vitamins B₁, B₂, B₆, nicotinic acid and nicotinamide in some enriched foods. The vitamins are extracted by dilute acid with ultrasonic vibration. The clean-up of the extract is carried out by the addition of methanol followed by refrigeration. The vitamins are separated on a C 18 column using gradient elution starting at 2% acetonitrile plus 98% aqueous phase (5 mM SHA²; 0.15% TEA³; the pH being adjusted to 2.8 with dilute H₂SO₄), changing to 3% acetonitrile plus 97% aqueous phase after 3 minutes and to 2% acetonitrile, 41% aqueous phase and 57% methanol after 23 minutes. The vitamins were detected using an ultraviolet detector and quantified using external standards. Of the 5 brands of cornflake analysed, 4 presented less than 30% of the levels stated on the package. Of the 3 brands of macaroni analyzed, one did not present any of the vitamins stated on the package. In general the lactic flours showed vitamin levels superior to those stated on the package. The food supplement destined to develop muscle mass presented levels of B₁, B₂ and nicotinamide 300% greater than the declared values. The results indicated the need for greater control of the vitamin levels of these products.

¹ High performance liquid chromatography

² Hexanesulfonic acid

³ Triethylamine

5.1 Introdução

Os cereais desempenham um importante papel no atendimento às necessidades nutricionais humanas e, assim como outros alimentos, são boas fontes de alguns nutrientes e pobres em outros. O trigo e o milho são as maiores fontes mundiais de calorias e proteínas, especialmente em países do terceiro mundo, fornecendo até 80% das calorias na Rússia, 55% no México e 67% na Índia [EL -DASH, 1994]. No Brasil, os cereais fornecem em torno de 40% das calorias consumidas, com exceção da região nordeste (28%), onde a farinha de mandioca também supre grande parte das necessidades calóricas [IBGE, 1974].

No trigo, o conteúdo vitamínico varia de uma parte para outra no grão integral, sendo que o endosperma é convertido em farinha durante a moagem, enquanto o aleurona e o germe são separados como farelo. Apesar de melhorar as características tecnológicas da farinha, a retirada destes componentes promove uma redução drástica da tiamina e vitamina B₆ (cerca de 90%), niacina (80%), ácido pantotênico (70%), riboflavina (50%) e minerais [MATTERN, 1991]. Entretanto, a medida que se aumenta a extração, a farinha torna-se mais escura, seu valor tecnológico diminui, porém seu valor nutricional aumenta. Além das vitaminas naturalmente presentes, vários países promovem o enriquecimento da farinha e dos demais derivados de cereais durante o processamento.

A legislação brasileira define como alimentos enriquecidos todos aqueles aos quais forem adicionados nutrientes, seja visando a reposição de perdas pelo processamento, seja suplementando o alimento com níveis nutricionais superiores ao seu conteúdo normal. Com relação ao complexo B, permite a adição das vitaminas B₁, B₂, B₆, fator PP cobalamina e ácido fólico em alimentos que devem fornecer, na porção média diária ingerida, 60%, no mínimo, das recomendações para adultos - RDA americana. É permitida, ainda, a adição de níveis superiores em até 100% para compensar eventuais perdas durante o armazenamento, desde que o alimento apresente necessidade

comprovada. A única restrição refere-se a adição de vitaminas em bebidas alcóolicas [ABIA, 1992].

A maioria das vitaminas são altamente instáveis e adversamente afetadas pelo processamento dos alimentos. O efeito do cozimento convencional depende da natureza do alimento e das condições do processo, podendo afetar, principalmente, a vitamina B₁. A retenção vitamínica no macarrão cozido depende da possibilidade de degradação, em função das altas temperaturas aplicadas, e das taxas de lixiviação. Entretanto, as maiores perdas observadas resultam, geralmente, da lixiviação das vitaminas hidrossolúveis para a água de cozimento [AYRANCI e KAYA, 1993]. RANHOTRA *et alii* (1985) verificaram retenções em torno de 55, 54-65 e 53-72 % das vitaminas B₁, B₂ e niacina e B₆, respectivamente, em macarrões de marcas variadas, preparados conforme as recomendações descritas nas embalagens dos produtos.

A extrusão, baseada na *high-temperature short time* (HTST), tem sido aplicada, principalmente, no processamento de derivados de cereais. A retenção das vitaminas, no produto acabado, geralmente decresce com o aumento da temperatura e/ou do tempo de residência no extrusor. O aumento da umidade inicial do material a ser extrudado, pela adição de 3-11% de água, geralmente melhora a retenção das vitaminas B₁ e B₆ [KILLEIT, 1994].

A determinação das vitaminas do complexo B em alimentos tem sido feita através de métodos microbiológicos [OAMEN *et alii*, 1989; RANHOTRA *et alii*, 1985], fluorimétricos [VARGAS *et alii*, 1995; RANHOTRA *et alii*, 1985] e por CLAE [AYRANCI e KAYA, 1993; MARINI *et alii*, 1988; MAURO e WETZEL, 1984]. A metodologia, desenvolvida por AGOSTINI e GODOY (1996), para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, com aplicação em alimentos enriquecidos, apresenta algumas vantagens como rapidez e simplicidade, além de eficiência e boa versatilidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de enriquecimento, com as vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, utilizando a CLAE como técnica de determinação, em alguns derivados de cereais enriquecidos como farinhas de cereais, farinhas lácteas, flocos de milho, e macarrão, além de uma bebida dietética e um complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular, também enriquecidos.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Material

Foram analisadas 4 marcas de farinhas de cereais, 3 marcas de farinhas lácteas, 5 marcas de flocos de milho, 3 marcas de macarrões enriquecidos, 1 marca de bebida dietética e 1 marca de complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular, todos enriquecidos. As análises foram feitas, em duplicata, em 3 diferentes lotes de cada produto, para cada marca. As amostras foram adquiridas em 5 super mercados de médio e grande porte na cidade de Campinas, SP, entre setembro de 1995 e janeiro de 1996. Os ingredientes descritos nas embalagens dos produtos analisados estão dispostos no **Anexo 11**. As amostras foram preparadas com 200 g de cada lote de alimento enriquecido e homogeneizadas em multiprocessador.

5.2.2 Reagentes

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆), ácido nicotínico (vitamina PP) e nicotinamida (vitamina PP) foram cedidos pela F. HOFFMANN-LA ROCHE Ltda, São Paulo, Brasil. O sal sódico do 1-ácido hexanosulfônico, aproximadamente 98%, foi fornecido pela SIGMA Chemicals Co, USA. O metanol (*ominsolv*) e a trietilamina (para síntese) foram fornecidos pela MERCK, Alemanha. A acetonitrila com pureza cromatográfica foi fornecida pela

MERCK, Brasil. Todos os outros reagentes químicos utilizados apresentaram grau de pureza analítico e foram obtidos no comércio local. A água utilizada no preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros fluoropore (MILLIPORE FHLP 01300), com poros de 0,45 µm de diâmetro, e desgaseificadas em banho ultra-sônico.

5.2.3 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido VARIAN com bomba ternária modelo 9010, sistema de injeção manual tipo *Rheodyne*, equipado com *loop* de 20 µl, detector policromático de arranjo de diodos, modelo 9065. Acoplado a esse sistema um integrador VARIAN, modelo 4400. A separação dos compostos foi feita em coluna *Spherisorb* ODS-2, 5 µm 150 x 4,6 mm d.i. (SIGMA-ALDRICH, USA) protegida por uma coluna de guarda, empacotada com o mesmo material da coluna analítica.

5.2.4 Métodos

5.2.4.1 Extração

Foram utilizadas entre 1 e 8g de amostra, previamente homogeneizadas. A extração das vitaminas é feita com 45-50 mL de ácido sulfúrico 0,1 N em banho ultra-sônico, por 60 min. A limpeza do extrato é feita através da adição de metanol, em quantidade suficiente para completar 100mL, e refrigeração, por 1 hora, a -18°C.

5.2.4.2 Cromatografia

O sistema cromatográfico, utilizado para separação das vitaminas, é de eluição por gradiente, em vazão de 0,7 mL/min. A fase móvel utilizada no início da corrida é composta por 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA 5mM; 0,15% de TEA; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído), chegando a 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em

3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. As condições iniciais são, então, retomadas e a coluna é re-equilibrada por 20 min. Os compostos são detectados pela absorção na região do ultravioleta a 254 nm até 9 min, 287 nm entre 9 e 15 min e 254 nm entre 15 e 23 min. A identificação é feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros de absorção, fornecidos pelo detector de arranjo de diodos. Os graus de pureza dos picos são determinados pelas razões entre as absorbâncias, obtidas em diferentes λ . A quantificação das vitaminas é feita por curvas de padronização externa, contruídas com 6 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de 3 determinações. As curvas foram feitas com 1, 4, 8, 12, 16 e 20 mL de solução padrão contendo 5,11; 3,99; 6,09; 50,75; e 11,67 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ das vitaminas B₁, B₂, B₆, nicotinamida e ácido nicotínico, respectivamente. As alíquotas são diluídas para 45 mL com água e para 100 mL com metanol, imediatamente filtradas em filtro millipore com 0,45 μm e injetadas no cromatógrafo. Todas as etapas desenvolvidas são devidamente protegidas da luz.

5.2.4.3 Determinação de pH

Os valores de pH das amostras foram determinados, por potenciometria, a partir de suspensões à 10%, conforme método da AOAC nº 940.22 (CUNNIFF, 1995). O pH da bebida dietética foi diretamente determinado na solução, após homogeneização.

5.3 Resultados e discussão

A **Figura 5-1** mostra os perfis cromatográficos da solução padrão e dos extratos de bebida dietética, de flocos de milho e de farinha láctea, respectivamente. Os **Anexos 1, 2 e 3** mostram alguns perfis de espectros, obtidos através do detector de arranjo de diodos, nos tempos de retenção correspondentes às vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e

nicotinamida. A **Tabela 5-1** apresenta as relações entre as absorvâncias de cada vitamina, obtidas em diferentes λ , para os diferentes tipos/marcas de alimentos analisados. As relações mais diferenciadas, entre as vitaminas presentes nas soluções padrões e nas amostras, foram aquelas obtidas para o ácido nicotínico, forma vitamínica naturalmente presente em vários alimentos, como os derivados de cereais. O mesmo foi observado, quando se aplicou essa técnica de análise em biscoitos enriquecidos [AGOSTINI e GODOY, 1996], o que aponta para um interferente encontrado, principalmente, em cereais.

Entre as três marcas de macarrões analisados, a marca RC não apresentou nenhuma das vitaminas declaradas, com exceção da vitamina PP, detectada apenas como ácido nicotínico, forma química naturalmente presente na farinha (**Tabela 5-2**). O macarrão da marca SL apresentou os maiores teores de ácido nicotínico, entre todos os tipos de amostras analisadas. Tal fato pode estar relacionado com a presença de sêmola de trigo duro importado, declarado na embalagem desta marca de macarrão (**Anexo 11**).

Os valores descritos nas embalagens de flocos de milho são, aproximadamente, 1,0, 1,5, 1,2 e 16,7 mg/100g de vitamina B₁, B₂, B₆ e PP, respectivamente. Entretanto, estes produtos apresentaram menos de 30% dos níveis declarados para todas as vitaminas, com exceção de 0,6 mg/100g de vitamina B₆ na marca NF e dos teores encontrados na marca QL, que chegaram a apresentar o dobro do valor de vitamina B₆ declarado (**Tabela 5-3**). Entre 15 diferentes tipos de alimentos enriquecidos com ácido nicotínico, analisados pelo FDA, apenas os flocos de milho apresentaram níveis inferiores aos valores declarados (28% do declarado) [CHASE *et alii*, 1993].

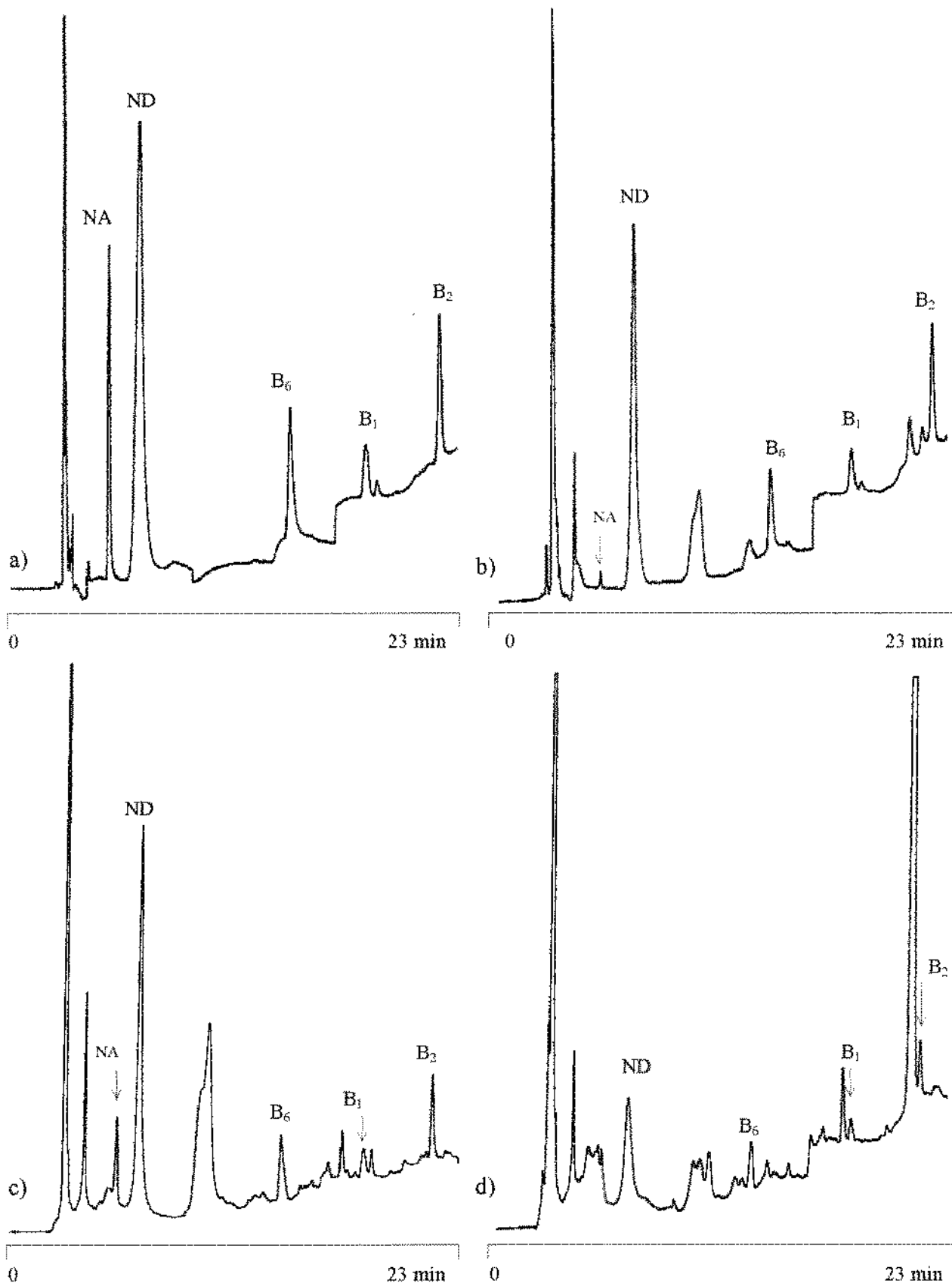


Figura 5-1 Perfis cromatográficos: (a) de solução padrão; (b) de bebida dietética aromatizada IQ; (c) de flocos de milho QL e (d) de farinha láctea MC. Condições cromatográficas descritas no texto.

Tabela 5-1 Razão entre absorvâncias a 234 e 254 nm, para as vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND), e a 254 e 278 nm, para a vitamina B₆

Amostras	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND
Farinha de arroz CL	246	nd	nd	242	247
F. de milho/arroz RF	247	248	nd	240	246
F. de milho RF	241	240	nd	240	246
F. arroz/milho/centeio/aveia RF	241	240	nd	243	246
F. láctea NS	245	244	266	nd	246
F. láctea NS'	245	243	264	nd	246
F. láctea MC	242	244	266	nd	246
Flocos de milho CF	246	243	267	245	245
F. de milho SB	246	242	267	246	247
F. de milho FT	244	243	267	246	247
F. de milho QL	246	246	269	246	248
F. de milho NF	244	244	267	244	247
Macarrão SL	244	245	266	246	247
Macarrão SL'	243	244	266	246	247
Macarrão RC	nd	nd	nd	246	nd
Bebida dietética IQ	244	245	269	nd	247
Complemento alimentar SP	242	246	270	nd	247
Padrões	242; 245	243, 247	268, 269	249	247

nd: não detectado

Tabela 5-2 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em macarrões enriquecidos

Marcas/lotos	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
SL1	10	1,54	1,45	2,0	5,0	16,5	21,5
SL2	11	1,29	1,61	2,3	3,0	15,9	19,0
SL3	11	1,47	1,51	2,0	4,0	14,6	18,2
Média - DP		1,43 - 0,13	1,52 - 0,08	2,1 - 0,2	4,0 - 1,0	15,7 - 1,0	19,6 - 1,7
Embalagem*		1,2	1,5	2,0	—	—	17,0
SL'1	—	1,32	1,70	2,0	1,6	16,2	17,8
SL'2	—	1,30	1,31	2,0	0,9	16,0	16,9
Média - DP		1,31 - 0,01	1,51 - 0,28	2,0 - 0,0	1,3 - 0,5	16,1 - 0,1	17,4 - 0,6
Embalagem*		1,2	1,5	2,0	—	—	17,0
RC	5	nd	nd	nd	1,3	nd	1,3
Embalagem*		0,60	0,90	1,20	—	—	11,0

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; nd: não detectado; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 5-3 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em flocos de milho enriquecidos

Marcas/lotes	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
CF1	7	0,12	0,21	0,4	1,2	3,0	4,2
CF2	9	0,24	0,24	0,5	1,4	2,4	3,8
CF3	10	0,12	0,17	0,2	1,1	2,2	3,3
Média - DP		0,16 - 0,07	0,21 - 0,04	0,4 - 0,2	1,2 - 0,2	2,5 - 0,4	3,8 - 0,5
Embalagem*		1,0	1,5	1,2	—	—	16,67
SB1	10	0,10	0,31	0,5	1,8	3,6	5,4
SB2	10	0,11	0,45	0,2	1,5	1,8	3,3
SB3	11	0,10	0,20	0,6	1,3	2,8	4,1
Média - DP		0,10 - 0,01	0,32 - 0,13	0,4 - 0,2	1,5 - 0,3	2,7 - 0,9	4,3 - 1,1
Embalagem*		1,0	1,5	1,2	—	—	16,7
FT1	9	0,11	0,16	0,7	1,6	3,7	5,3
FT2	9	nd	0,37	0,3	1,5	1,3	2,8
FT3	10	0,15	0,28	0,4	1,6	2,9	4,5
Média - DP		0,13 - 0,03	0,27 - 0,11	0,5 - 0,2	1,6 - 0,06	2,6 - 1,2	4,2 - 1,3
Embalagem*		1,0	1,5	1,2	—	—	16,7
QL1	4	1,90	1,85	3,3	2,8	20,0	22,8
QL2	6	1,76	1,61	4,0	1,7	15,1	16,8
QL3	9	1,61	1,80	2,2	2,0	20,2	22,2
Média - DP		1,76 - 0,15	1,75 - 0,13	3,2 - 0,9	2,2	18,4 - 2,9	20,6 - 3,3
Embalagem*		1,67	1,25	1,42	—	—	15,83
NF1	10	0,15	0,31	0,6	1,3	3,7	5,0
NF2	11	0,24	0,43	0,6	0,9	4,2	5,1
NF3	12	0,17	0,51	0,8	1,2	6,2	7,4
Média - DP		0,19 - 0,05	0,42 - 0,10	0,7 - 0,1	1,1 - 0,2	4,7 - 1,3	5,8 - 1,4
Embalagem*		1,0	1,5	1,2	—	—	16,7

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; nd: não detectado; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; — : não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

A vitamina B₆, que não é adicionada nas farinhas de cereais analisadas, não foi detectada em nenhuma destas marcas e a B₂ não foi detectada em farinha de arroz (**Tabela 5-4**). A farinha de cereais variados (arroz, milho, centeio e aveia), marca RF, apresentou maiores níveis de vitamina B₁ e PP, com relação as outras farinhas da mesma marca (arroz e milho). A diferença, provavelmente, é consequência da presença de maiores teores de vitaminas naturais nas farinhas de centeio e aveia, que, também, compõem esta farinha.

O ácido nicotínico não foi determinado em farinhas lácteas, em função das baixas concentrações e da presença de interferentes. Os valores das vitaminas B₁ e B₂, determinados nas farinhas lácteas da marca NS, foram mais de duas vezes superiores aos valores descritos nas embalagens (**Tabela 5-5**).

Embora a embalagem do complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular SP declare 1,0, 2,0, 6,0 e 15,0 mg/100g de vitamina B₁, B₂, B₆ e niacina, respectivamente, os valores determinados foram muito superiores aos declarados para as mesmas vitaminas: 4,83, 6,30, 8,2 e 57,4 mg/100g (**Tabela 5-6**). Cabe ressaltar a ocorrência de reações tóxicas, devido à injeção de doses contendo 50-100 mg de vitamina B₁ e o relato de mortes súbitas observadas após a injeção de altas doses dessa vitamina por via intravenosa e, até mesmo, por via intramuscular [FRANCO, 1992]. Efeitos de neuroapatia muscular, também, foram observados após a injeção de altas doses de vitamina B₆, na prevenção dos sintomas da síndrome pré-menstrual [SCHAUMBURG *et alii*, 1983] e vários sintomas de intolerância têm sido relatados, devidos a injeção de altas doses de niacina [EYS, 1991].

As bebidas dietéticas apresentaram níveis vitamínicos de acordo com os valores declarados.

Tabela 5-4 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em farinhas de cereais enriquecidas

Farinhas/Marcas/lotos	PV*	B ₁	B ₂	NA	ND	PP
Arroz /CL1	14	1,49	nd	0,9	12,4	13,3
Arroz/CL2	15	1,33	nd	0,8	9,0	10,4
Arroz/CL3	21	1,18	nd	1,1	11,7	12,8
Média - DP		1,33 - 0,16	nd	0,9 - 0,2	11,0 - 1,8	12,2 - 1,6
Embalagem*		0,72	—	—	—	12,0
Milho e arroz/RF1	12	0,19	0,21	0,3	2,3	2,6
Milho e arroz/RF2	13	0,20	0,21	nd	2,8	2,8
Milho e arroz/RF3	13	0,26	0,20	0,2	2,7	2,9
Média - DP		0,22 - 0,04	0,21 - 0,01	0,3 - 0,1	2,6 - 0,3	2,8 - 0,2
Embalagem*		0,15	0,24	—	—	2,7
Milho/RF1	10	0,21	0,21	0,2	2,6	2,8
Milho/RF2	12	0,27	0,17	0,2	2,7	2,9
Milho/RF3	13	0,27	0,19	0,1	2,6	2,7
Média - DP		0,25 - 0,03	0,19 - 0,02	0,2 - 0,1	2,6 - 0,1	2,8 - 0,1
Embalagem*		0,15	0,24	—	—	2,7
Cereais variados/RF1	4	0,37	0,25	1,0	3,6	4,6
Cereais variados/RF2	4	0,40	0,18	0,8	3,1	3,9
Cereais variados/RF3	5	0,43	0,21	1,0	2,9	3,9
Média - DP		0,40 - 0,03	0,21 - 0,04	0,9	3,2 - 0,4	4,1 - 0,4
Embalagem*		0,15	0,24	—	—	2,7

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; nd: não detectado; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 5-5 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100g) em farinhas lácteas enriquecidas

Marcas/lotes	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	ND
NS1	20	1,01	0,75	0,2	4,8
NS2	20	0,89	0,73	0,2	5,1
NS3	22	0,93	0,81	0,2	5,3
Média - DP		0,94 - 0,06	0,76 - 0,04	0,2 - 0,0	5,1 - 0,3
Embalagem*		0,30	0,30	0,20	3,80
NS'1	8	1,25	0,73	0,5	10,5
NS'2	14	0,71	1,16	0,7	11,3
NS'3	16	1,17	0,89	0,5	10,5
Média - DP		1,04 - 0,29	0,93 - 0,22	0,6 - 0,1	10,8 - 0,5
Embalagem*		0,6	0,7	0,4	9,4
MC1	10	0,60	0,45	0,1	4,5
MC2	11	0,44	0,67	0,2	3,6
MC3	11	0,34	0,49	0,2	3,8
Média - DP		0,46 - 0,13	0,54 - 0,12	0,2 - 0,1	4,0
Embalagem*		0,30	0,30	0,20	3,80

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; nd: não detectados; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 5-6 Concentração de vitaminas do complexo B em bebida dietética¹ e em complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular² (mg /100g)

Produto/Marcas/lotes	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
Beb. dietet./IQ1 ¹	4	1,35	0,98	1,4	0,1	10,7	10,8
Beb. dietet./IQ2 ¹	4	1,45	1,36	1,9	0,2	11,8	12,0
Beb. dietet./IQ3 ¹	5	1,44	1,23	1,6	0,2	11,7	11,9
Média - DP		1,41 - 0,05	1,19 - 0,19	1,6 - 0,3	0,2 - 0,1	11,4 - 0,6	11,6 - 0,7
Embalagem*		1,190	1,190	1,429	—	—	11,405
Comp. alim/SP1 ²	23	4,83	6,30	8,2	nd	57,4	57,4
Comp. alim/SP2 ²	24	4,96	6,39	7,7	nd	57,5	57,5
Comp. alim/SP3 ²	24	3,98	5,87	8,4	nd	64,6	64,6
Média - DP		4,89 - 0,53	6,19 - 0,28	8,1 - 0,4	nd	59,8 - 4,1	59,8 - 4,1
Embalagem*		1,00	2,00	6,00	15,00	—	—

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; nd: não detectado; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Considerando a sensibilidade das vitaminas frente ao pH do meio, foram determinados os valores de pH de todos os alimentos analisados (**Tabela 5-7**), entretanto, nenhuma relação foi observada entre estes valores e os níveis vitamínicos determinados.

A **Tabela 5-8** mostra a correspondência dos valores vitamínicos descritos nas embalagens dos produtos analisados em percentuais de RDAs presentes nas porções médias diárias para coletividades, segundo SILVA E MONNERAT (1986), e em 2000 cal (1300, para crianças) de alimentos. As embalagens de macarrão declaram valores vitamínicos correspondentes a 55-67% da RDA, na porção média, entretanto é importante considerar a possibilidade de perdas, em torno de 50%, durante o cozimento [AYRANCI e KAYA, 1993; RANHOTRA *et alii*, 1985]. As farinhas de cereais apresentam os menores teores vitamínicos por calorias, entre os produtos analisados. O maior rigor, no enriquecimento destes produtos, com relação ao número de calorias fornecidas,

provavelmente decorre do fato de que estes são oferecidos para crianças nos primeiros anos de vida.

Tabela 5-7 Valores de pH determinados nos alimentos enriquecidos selecionados

Produtos	pH
Macarrões	
SL	6,0
SL'	—
RC	—
Farinhas de cereais	
F. de arroz / CL	6,3
F. de milho e arroz / RF	5,9
F. de milho / RF	6,7
F. de cereais (arroz, milho, centeio e aveia) / RF	6,2
Farinhas Lácteas	
NS	6,4
NS'	6,5
MC	6,2
Flocos de milho	
CF	5,0
SB	5,1
FT	5,3
NF	5,2
QL	5,0
Outros	
Bebida dietética	2,8
complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular	6,7

—: não determinado.

Tabela 5-8 Correspondência dos valores declarados em % da RDA na porção média diária e em números de RDA/2000 cal (1300cal, para crianças) de alimento

Amostra	Porção média ¹	cal/100g ²	Observação	B ₁	B ₂	B ₆	PP
Macarrão	60 g	344	embalagem	1,2	1,5	2,0	17,0
			% RDA	55	60	67	60
			RDA/2000cal	5	6	6,5	6
Flocos de milho	30 g	385	embalagem	1,0	1,25	1,20	15,83
			% RDA	23	25	20	28
			RDA/2000cal	4	4	3,5	5
Farinhas lácteas	20 g	424	embalagem	0,3-0,6	0,3-0,7	0,2-0,4	3,8-9,4
			% RDA	5-9	4-9	2-4	4-11
			RDA/2000cal	2-4	2-4	1-2	2-5
Farinhas de cereais	10 g	345	embalagem	0,15-0,72	0,24	—	2,7-12
			% RDA	2-8	2,5	—	2,5-11
			RDA/1300cal	1-3	1	—	1-4
Bebida dietética	110 mL ³	72 ³	embalagem	1,19	1,19	1,43	11,41
			% RDA	100	87	87	70
			RDA/2000cal	25	22	22	18
Complemento alimentar	100g ³	377 ³	embalagem	1,0	2,0	6,0	15,0
			% RDA	77	130	330	83
			RDA/2000cal	4	7	18	4

¹ SILVA E MONNERAT (1986); ² FRANCO (1992); embalagem: mg/100g; ³ valores obtidos nas embalagens dos produtos; —: não determinado.

Os alimentos selecionados para o programa de fortificação devem ter um consumo bem definido e estar presentes em quantidades capazes de contribuir significativamente na dieta da população deficiente, sem provocar ingestões excessivas ou desbalanços nutricionais e sem alterar o custo do alimento, como ocorre com a farinha de trigo, cujo enriquecimento é subsidiado em vários países. O programa de enriquecimento, no Brasil, tem lançado, constantemente, novos produtos. Porém, curiosamente, tais produtos não são, via de regra, acessíveis para aqueles grupos da população que parecem apresentar maiores riscos nutricionais.

Uma legislação específica, definindo os tipos de alimentos a serem enriquecidos e os tipos e quantidades de nutrientes a serem adicionados, assim como o controle dos níveis presentes nos produtos lançados no mercado, são medidas fundamentais para que o enriquecimento de alimentos no Brasil não apresente apenas características de bom *marketing*, mas que seja também eficiente e fiel aos objetivos propostos.

5.4 Conclusões

- Entre as 5 marcas de flocos de milho analisadas, 4 apresentaram menos de 30% dos níveis vitamínicos declarados, o que pode ser consequência de degradação, durante o processamento.
- Uma, entre as 3 marcas de macarrões analisados, não apresentou nenhuma das vitaminas, que são adicionadas pelo processo de enriquecimento, descritas nas embalagens do produto.
- O complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular apresentou teores de B₁, B₂ e nicotinamida superiores a 300% dos valores declarados.
- Os resultados obtidos apontam a necessidade de maior rigor no controle das taxas de enriquecimento.

5.5 Referências bibliográficas

- ABIA - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (1992). *Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos*. 5. rev. São Paulo: ABIA, v. 1A.
- AGOSTINI, T. S. & GODOY, H. T. (1996). Otimização e validação de metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, por CLAE. In : *Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, por CLAE*. Tese de doutorado em Ciências de Alimentos. FEA, UNICAMP, Campinas. p 85-113.
- AYRANCI, G. & KAYA, S. (1993). Kinetic analysis of the loss of some B-vitamins during the cooking of macaroni. *Die Nahr.*, **37**, 153-155.

- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; SOLIMAN, A. G. & EITENMILLER, R. R (1993). Liquid chromatography analysis of niacin in fortified food products. *J. AOAC Int.*, **76** (2), 390-393.
- CUNNIFF, P. (ed). (1995) *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
- EL-DASH, A. (1994). Enriquecimento de cereais e derivados. In: *I Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos*. ITAL-UNICAMP, Campinas, SP. p 47-48.
- EYS, J. V. (1991). Nicotinic acid. In: *Handbook of vitamins*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 595p.
- FRANCO, G. (1992). *Tabela de Composição Química de Alimentos*. 8ª ed. Livraria Atheneu Ed., Rio de Janeiro - São Paulo, 230p.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1983). *Metodologia Nacional do Estudo da despesa Familiar (ENDEF)*. Núcleo do Banco de Informações.
- KILLEIT, U. (1994). Vitamin retention in extrusion cooking. *Food Chem.* **49**, 149-155.
- MARINI, D.; SORRENTINO, M.; BALESTRIERI, F. & MAGRI, A. L. (1988). Determinazione di tiamina, riboflavina e niacina in paste alimentari vitaminizzate. *Tec. Molitoria*, **39**, 1-7.
- MATTERN, P. J. (1991). Wheat. In: *Handbook of Cereals Science and Technology*. Ed. Lowrenz, New York, 882p.
- MAURO, D. J. & WETZEL, D. L. (1984). Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in enriched cereal based products by HPLC using selective detection. *J. Chrom.*, **299**, 281-287.
- OAMEN, E. E.; HANSEN, A. P. & SWARTZEL, K. E. (1989). Effect of ultra high temperature steam injection processing and aseptic storage on labile water-soluble vitamins in milk. *J. Dairy Sci.* **72**, 614-619.
- RANHOTRA, G. S. & GELROTH, J. A.; NOVAK, F. A. & MATTHEUS, R. H. (1985). Retention of selected B vitamins in cooked pasta products. *Cereal Chem.*, **62** (6), 476-477.
- SCHAUMBURG, H.; KAPLAN, J.; WINDEBANK, A.; VICK, N.; RASMUS, S.; PLEASURE, D. & BROWN, M. J. (1983). Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. *New Eng. J. Med.*, **309** (8), 445 - 453.
- SILVA, L. B. & MONNERAT, M. P. (1986). *Alimentação para Coletividades*. 2ª ed. Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 246p.
- VARGAS, E. F.; VILLANUEVA, M. T. O. & MARQUINA, A. D. (1995). Incidencia de la condimentación tradicional y microondas en el contenido en vitaminas hidrossolubles en coles: repollo y coliflor. I. Tiamina y riboflavina. *Alimentaria*, **abril**, 111-117.

Capítulo 6

Aplicação da CLAE na determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em leites e derivados lácteos enriquecidos

APLICAÇÃO DA CLAE¹ NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆, ÁCIDO NICOTÍNICO E NICOTINAMIDA EM LEITES E DERIVADOS LÁCTEOS ENRIQUECIDOS.

Resumo

O leite e os produtos lácteos, além de funcionarem como boas fontes naturais de vitamina B₂, também estão sendo enriquecidos, no Brasil, com as vitaminas B₁, B₂, B₆ e nicotinamida, entre aquelas hidrossolúveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de enriquecimento destes produtos, de acordo com a disponibilidade em supermercados da região de Campinas, SP. A metodologia empregada utiliza a extração das vitaminas com ácido diluído, através de vibração ultra-sônica, e limpeza do extrato pela adição de metanol e refrigeração. A separação das vitaminas é feita em coluna C18 com eluição por gradiente, utilizando 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA² 5mM; 0,15% de TEA³; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído) no início da corrida, atingindo 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. O tempo de re-equilíbrio da coluna é de 20 min. A detecção das vitaminas é feita na região do ultravioleta e sua quantificação por padronização externa. Os níveis de vitamina B₂, determinados em leite em pó integral, leite em pó desnatado e em uma marca de bebida láctea aromatizada foram, aproximadamente, o dobro dos valores descritos nas embalagens dos produtos. O mesmo aconteceu com as vitaminas B₆ e PP determinadas na mesma bebida láctea e com a vitamina B₆ determinada em leite acidificado. A alta concentração de vitamina B₂

¹ Cromatografia líquida de alta eficiência

² Ácido hexanosulfônico

³ Trietilamina

naturalmente presente no leite integral e a predominância da forma livre permitiram a determinação desta vitamina em leite não enriquecido.

Abstract

In addition to serving as good natural sources of vitamin B₂, milk and milk products are currently being enriched with the vitamins B₁, B₂, B₆ and nicotinamide in Brasil. The objective of this research was to evaluate the levels of enrichment of these products according to their availability in supermarkets in the Campinas (SP, Brasil) region. The methodology employed extraction of the vitamins with dilute acid and ultrasonic vibration and the clean-up of the extract with methanol and refrigeration. The separation of the vitamins is carried out on a C 18 column with gradient elution, starting at 2% acetonitrile plus 98% aqueous phase (5 mM HSA¹, 0.15% TEA², the pH being adjusted to 2.8 with dilute H₂SO₄), increasing to 3% acetonitrile and 97% aqueous phase after 3 minutes and 2% acetonitrile, 41% aqueous phase and 57% methanol after 23 minutes. The reequilibration of the column took 20 minutes. Detection of vitamins was affected in the ultraviolet region and quantification by an external standard. The levels of vitamin B₂ determined in powdered whole milk, skimmed milk powder and one brand of flavoured lactic beverage, were practically double the stated on the package. The same occurred with vitamins B₆ and PP, when determined in the same lactic beverage and with vitamin B₆, determined in acidified milk. The high levels of vitamin B₂, naturally present in whole milk, and the predominance of the free form, allowed for the determination of this vitamin in non-enriched milk.

¹ *Hexanesulfonic acid*

² *Triethylamine*

6.1 Introdução

Estudos recentes, em muitos países, sugerem que o estado vitamínico de um grande número de pessoas não é adequado, como acreditava-se a alguns anos atrás. O nível vitamínico é insuficiente em certos grupos de pessoas de países industrializados, entretanto a extensão dessas deficiências é mínima, comparada com a extensão dos problemas nutricionais existentes em países desfavorecidos. O leite e os produtos lácteos fornecem quantidades significativas de B₂ à dieta e a prevalência da deficiência desta vitamina, nos países em desenvolvimento, tem sido relacionada com o baixo consumo destes alimentos [BOISVERT *et alii*, 1993; BATES *et alii*, 1989; SGARBIERI, 1986].

Além da presença das vitaminas naturais, o leite e os derivados lácteos têm sido adicionados de vitaminas do complexo B, através do enriquecimento. Entretanto, várias destas vitaminas são lábeis e facilmente degradadas durante o processo e a estocagem destes produtos. Os teores de tiamina e niacina são progressivamente reduzidos durante a concentração de leite por ultrafiltração [PREMARATNE e COUSIN, 1991]. Esta redução está relacionada com a presença de quantidades muito pequenas, ou ausência, das vitamina B₁ e B₂ ligadas às proteínas e aos fosfatos [LAVIGNE *et alii*, 1987].

Os processos rápidos de pasteurização e esterilização do leite (HTST¹, UHT²) provocam menores perdas vitamínicas do que os processos de pasteurização prolongada (LTLT³) [LAVIGNE *et alii*, 1989]. O tratamento térmico por UHT apresenta um efeito negligenciável sobre as vitaminas B₂ e B₆ presentes no leite. Entretanto, a estocagem, à temperatura ambiente por 20 dias, provoca perdas de vitamina B₆ em torno de 90% e alterações negligenciáveis na vitamina B₂. Antagonistas naturais podem estar funcionando como inativadores da vitamina B₆ no leite [OAMEN *et alii*, 1989]. A estocagem de leites pasteurizados, previamente abertos, em refrigerador por 6 dias, a 8°C, provoca perdas de

¹ High temperature short time

² Ultra high temperature

³ Low temperature long time

B₂ em torno de 20%. As perdas são função da capacidade de penetração de luz no interior do produto [MUNHOS *et alii*, 1994].

Entre os leites fortificados e pasteurizados, analisados pelo FDA¹ [TANNER *et alii*, 1988], aproximadamente 60% daqueles, com declaração de níveis de B₂ iguais a 30% da RDA², estavam abaixo do limite tolerado de 80% e apenas 4% daqueles, com declaração de níveis iguais a 25%, estavam abaixo do limite.

A determinação das vitaminas do complexo B em leite tem sido feita por métodos microbiológicos [PREMARATNE e COUSIN, 1991; OAMEN *et alii*, 1989; TANNER *et alii*, 1988] e por CLAE [MUNHOS *et alii*, 1994; CHASE *et alii*, 1992; LAVIGNE *et alii*, 1987; AYI *et alii*, 1986; ASHOOR *et alii*, 1985]. A técnica, por CLAE, desenvolvida por AGOSTINI e GODOY (1996), promove a determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, com rapidez, simplicidade e versatilidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de enriquecimento, de leites e derivados lácteos, com vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida, utilizando uma metodologia de determinação simultânea, por CLAE.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Material

Foram analisadas 7 marcas de bebidas lácteas aromatizadas, 1 marca de leite em pó integral, 1 marca de leite em pó desnatado, 1 marca de leite em pó acidificado e 1 marca

¹ *Food and Drug Administration*

² *Recommended Dairy Allowances*

de leite integral esterilizado enriquecidos. As determinações foram feitas em 3 diferentes lotes de cada marca, em duplicata, escolhidos aleatoriamente. As amostras foram adquiridas em 5 supermercados de médio e grande porte na cidade de Campinas, SP, entre setembro de 1995 e janeiro de 1996. Os ingredientes descritos nas embalagens dos produtos analisados estão dispostos no **Anexo 12**. As amostras foram preparadas com 200 mL (g) de leite enriquecido, previamente homogeneizados.

6.2.2 Reagentes

Os padrões mononitrato de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆), ácido nicotínico (vitamina PP) e nicotinamida (vitamina PP) foram cedidos pela F. HOFFMANN-LA ROCHE Ltda, São Paulo, Brasil. O sal sódico do 1-ácido hexanosulfônico, aproximadamente 98%, foi fornecido pela SIGMA Chemicals Co, USA. O metanol (*ominsolv*) e a trietilamina (para síntese) foram fornecidos pela MERCK, Alemanha. A acetonitrila com pureza cromatográfica foi fornecida pela MERCK, Brasil. Todos os outros reagentes químicos utilizados apresentaram grau de pureza analítico e foram obtidos no comércio local. A água utilizada no preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros fluoropore (MILLIPORE FHLF 01300), com poros de 0,45 µm de diâmetro, e degaseificadas em banho ultra-sônico.

6.2.3 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido VARIAN com bomba ternária modelo 9010, sistema de injeção manual tipo "Rheodyne", equipado com *loop* de 20 µl, detector policromático de arranjo de diodos, modelo 9065. Acoplado a esse sistema um integrador VARIAN, modelo 4400. Foram utilizadas colunas de guarda C18, 5 µm, VARIAN e coluna *Spherisorb* ODS-2, 5 µm, 150 x 4,6 mm, SIGMA-ALDRICH, USA.

6.2.4 Métodos

A metodologia utilizada neste trabalho para a determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos foi desenvolvida e validada por AGOSTINI e GODOY (1996).

6.2.4.1 Extração

Foram utilizadas entre 5 e 8g de amostra, previamente homogeneizadas. As vitaminas são extraídas com 45 mL de ácido sulfúrico 0,1 N em banho ultra-sônico, por 60 min. O extrato é purificado pela adição de metanol, em quantidade suficiente para completar 100mL, e refrigerado a -18°C, por 60 min. O extrato é, então, filtrado em papel de filtro comum e, logo após, em filtro fluoropore (MILLIPORE FHLP 01300) com poros de 0,5 µm e injetado no cromatógrafo.

6.2.4.2 Cromatografia

A separação das vitaminas é feita através de eluição por gradiente, com vazão de 0,7 mL/min. A fase móvel utilizada no início da corrida é composta por 2% de acetonitrila e 98% de fase aquosa (SHA 5mM; 0,15% de TEA; pH 2,8 ajustado com H₂SO₄ diluído), chegando a 3% de acetonitrila e 97% de fase aquosa em 3 min e 2% de acetonitrila, 41% de fase aquosa e 57% de metanol, em 23 min de corrida. As condições iniciais são, então, retomadas e a coluna é re-equilibrada por 20 min. Os compostos são detectados pela absorção na região do ultravioleta a 254 nm até 9 min., 287 nm entre 9 e 15 min e 254 nm entre 15 e 23 min. A identificação é feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros de absorção, fornecidos pelo detector de arranjo de diodos. Os graus de pureza dos picos são determinados pelas razões entre as absorbâncias, obtidas em diferentes λ . A quantificação das vitaminas é feita por curvas de padronização externa, contruídas com 6 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de 3 determinações. As curvas

foram feitas com 1, 4, 8, 12, 16 e 20 mL de solução padrão contendo 5,11; 3,99; 6,09; 50,75; e 11,67 µg/100 mL das vitaminas B₁, B₂, B₆, nicotinamida e ácido nicotínico, respectivamente. As alíquotas são diluídas para 45 mL com água e para 100 mL com metanol, imediatamente filtradas em filtro fluoropore (MILLIPORE FHLP 01300), com poros de 0,5 µm, e injetadas no cromatógrafo. Todas as etapas desenvolvidas são devidamente protegidas da luz.

6.2.4.3 Determinação de pH

Os valores de pH das amostras líquidas foram determinados, por potenciometria, nas soluções previamente homogeneizadas. O pH das amostras sólidas foi determinado a partir de soluções a 10%, adequadamente homogeneizadas.

6.3 Resultados e discussão

A **Figura 6-1** mostra os perfis cromatográficos da solução padrão e dos extratos de leite em pó acidificado, de leite em pó desnatado e de leite aromatizado, respectivamente. Os **Anexos 1, 2 e 3** mostram alguns perfis de espectros de absorção, obtidos através de detectores de arranjo de diodos, nos tempos de retenção correspondentes às vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida. A **Tabela 6-1** apresenta as relações entre absorbâncias, obtidas em diferentes λ , para todas as marcas de leite analisados. As relações mais diferenciadas, entre as vitaminas presentes nas soluções padrões e nas amostras, foram aquelas obtidas para o ácido nicotínico, forma vitamínica naturalmente presente no leite. Entretanto, a diferença observada foi mais discreta do que aquelas apresentadas para os derivados de cereais [AGOSTINI e GODOY, 1996] e, como mostram os cromatogramas obtidos (**Figura 6-1**), não estavam associadas com a presença de interferentes.

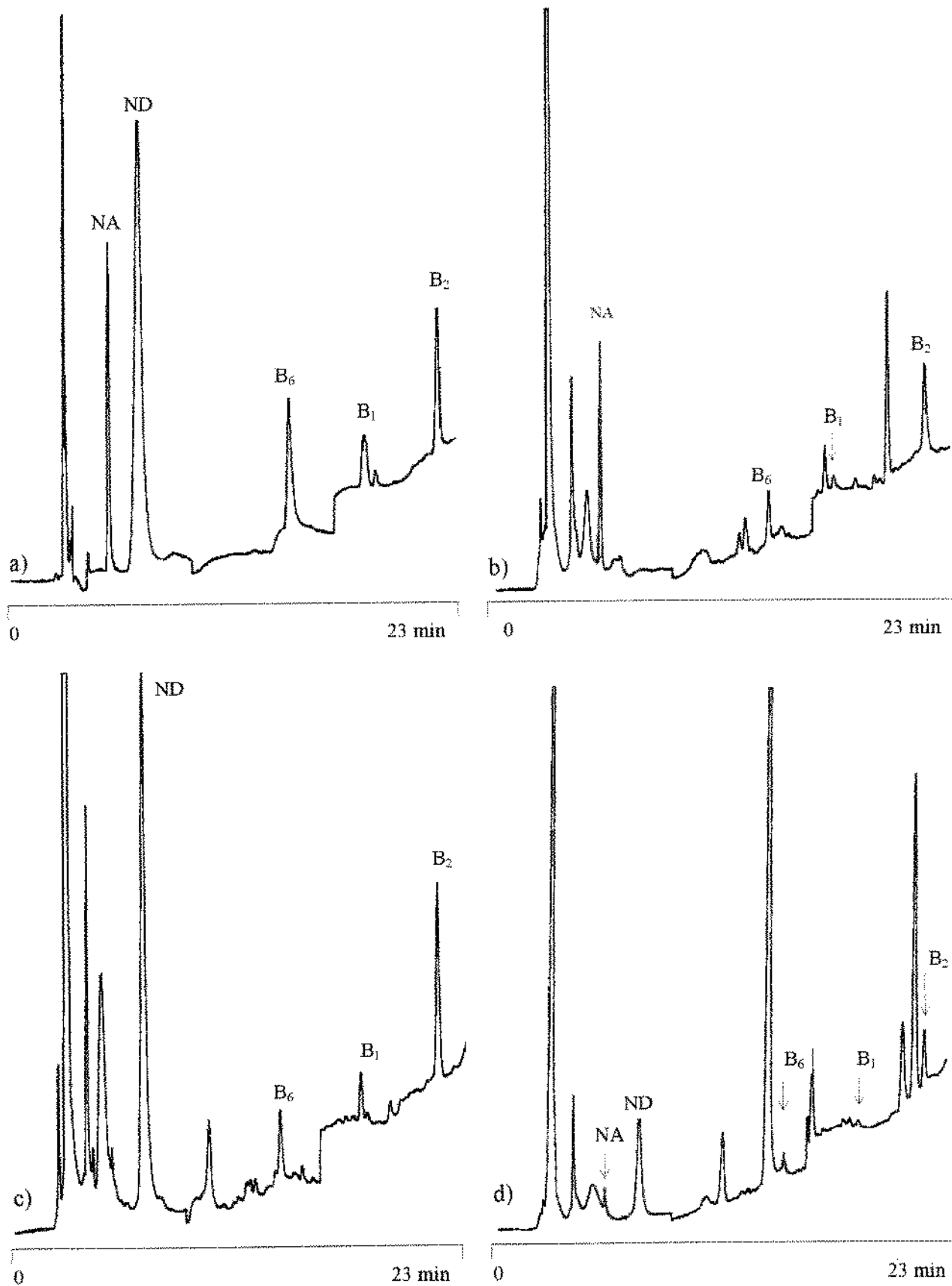


Figura 6-1 Perfis cromatográficos: (a) solução padrão; (b) leite em pó acidificado NS, (c) leite em pó BR e (d) leite aromatizado QQ. Condições cromatográficas descritas no texto.

Os teores das vitaminas B₁ e B₆, em bebidas lácteas (**Tabela 6-2**), são médias aproximadas, cujas determinações apresentaram coeficientes de variação muito elevados, em função das baixas concentrações de B₁ e pela presença de interferentes, incorporados com o chocolate, eluindo muito próximos a vitamina B₆. Entretanto, a maior parte destas bebidas não são enriquecidas com estas vitaminas. A bebida láctea, de marca FL, apresentou o dobro dos valores declarados de vitamina B₂, B₆ e PP nos 3 lotes analisados, incluindo um lote com tempo de prateleira muito próximo a data de vencimento do produto. A vitamina B₁ não foi detectada nesta marca, como nas outras, também analisadas.

Tabela 6-1 Razão entre absorvâncias a 234 e 254 nm, para as vitaminas B₁, B₂, ácido nicotínico (NA) e nicotinamida (ND), e a 254 e 278 nm, para a vitamina B₆

Amostras	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND
Leite aromatizado NS	nd	245	262	243	245
Leite aromatizado CF	nd	243	nd	244	246
Leite aromatizado RS	nd	242	264	244	246
Leite aromatizado LC	nd	245	265	245	246
Leite aromatizado QQ	nd	245	264	244	246
Leite aromatizado PL	nd	246	261	243	246
Leite aromatizado FL	nd	243	264	244	248
Leite em pó integral NS	246	246	268	nd	245
Leite em pó desnatado BR	243	246	268	239	247
Leite em pó acidificado NS	245	247	264	246	nd
Leite esterilizado IL	nd	243	268	243	246
Padrões	242; 245	243, 247	268, 269	249	247

nd: não detectado

Tabela 6-2 Concentração de vitaminas do complexo B (mg/100mL) em bebidas lácteas, sabor chocolate.

Marcas/lotos	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
NS1	4	nd	0,41	0,3	0,3	3,2	3,5
NS2	4	nd	0,36	0,2	0,4	3,2	3,6
NS3	5	nd	0,40	nd	0,5	3,4	3,9
Média - DP		nd	0,39 - 0,03	0,3 - 0,1	0,4 - 0,1	3,3 - 0,1	3,7 - 0,2
Embalagem*		0,1	0,2	0,2	—	2,7	—
CF1	0	0,2	0,73	nd	0,4	5,1	5,5
CF2	2	nd	0,67	nd	0,3	4,6	4,9
CF3	3	nd	0,65	nd	0,3	4,2	4,5
Média - DP		0,2	0,68 - 0,04	nd	0,3 - 0,06	4,6 - 0,5	5,0
Embalagem*		—	0,6	—	—	—	5,1
RS1	3	nd	0,64	0,2	0,4	3,9	4,3
RS2	4	nd	0,48	nd	0,3	4,2	4,5
RS3	6	0,09	0,47	0,2	0,4	3,7	4,1
Média - DP		0,09	0,53 - 0,10	0,2 - 0,0	0,4 - 0,06	3,9 - 0,3	4,3 - 0,2
Embalagem*		—	0,39	—	—	—	3,25
LC1	3	0,08	0,69	0,2	0,5	4,8	5,3
LC2	3	nd	0,75	0,3	0,4	4,6	5,0
LC3	3	nd	0,74	nd	0,5	4,6	5,1
Média - DP		0,08	0,73 - 0,03	0,3 - 0,1	0,5 - 0,06	4,7 - 0,1	5,1 - 0,2
Embalagem*		—	0,6	—	—	—	5,1
QQ1	3	0,16	0,58	0,2	0,3	3,8	4,1
QQ2	5	nd	0,89	nd	0,3	5,6	5,9
QQ3	6	nd	0,60	nd	0,2	3,0	3,2
Média - DP		0,16	0,69 - 0,17	0,2	0,3 - 0,06	4,2 - 1,3	4,4 - 1,4
Embalagem*		—	0,45	—	—	—	3,0
PL1	0	nd	0,76	0,2	0,4	5,8	6,2
PL2	1	0,18	0,67	nd	0,5	5,4	5,9
PL3	1	nd	0,62	nd	0,5	5,4	5,9
Média - DP		0,18	0,68 - 0,07	0,2	0,5 - 0,06	5,5 - 0,2	6,0 - 0,2
Embalagem*		—	0,45	0,60	—	—	5,5
FL1	0	nd	1,12	1,8	0,4	11,7	12,1
FL2	3	nd	1,17	1,2	0,6	10,0	10,6
FL3	6	nd	1,11	nd	0,6	10,5	11,1
Média - DP		nd	1,13 - 0,03	1,5 - 0,4	0,5 - 0,1	10,7 - 0,9	11,3 - 0,8
Embalagem*		0,30	0,45	0,60	—	—	5,1

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; nd: não detectado; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

A embalagem do leite esterilizado integral IL não declara a presença de vitamina B₂, entretanto foram determinadas 0,19 mg/100 mL desta vitamina, naturalmente presente no leite (**Tabela 6-3**). Embora este método analítico não seja direcionado às vitaminas naturalmente presentes nos alimentos, a elevada concentração de vitamina B₂, com predominância da forma livre, permitiu a sua determinação no leite integral. Os níveis de vitamina B₂ determinados nos leites em pó integral NS e desnatado BR enriquecidos foram aproximadamente o dobro dos valores descritos nas embalagens dos produtos. O leite em pó acidificado NS apresentou o dobro da quantidade de vitamina B₆ declarada e apenas 2,6 mg/100g de vitamina PP, contra 3,6 mg/100g declarados. O ácido nicotínico foi a única forma da vitamina PP, detectada nesta marca de leite. Os demais produtos analisados apresentaram níveis vitamínicos de acordo com os valores declarados, ou com pequenas variações em relação a estes.

As taxas de recuperação das vitaminas determinadas por CLAE, em leite desnatado não enriquecido, variaram entre 87-105%, para concentrações entre 7-80 µg/100mL de vitamina B₁ e B₂ e entre 100-760 µg/100mL de nicotinamida. As mesmas taxas variaram entre 72-111%, para concentrações entre 12-100µg/100mL de vitamina B₆ e entre 15-175 µg/100mL de ácido nicotínico.

Os valores de pH das amostras variaram em torno de 6,5, com exceção do leite em pó acidificado, cujo pH foi 5,3 (**Tabela 6-4**). Entretanto nenhuma relação foi observada entre as concentrações vitamínicas e os valores de pH determinados. A **Tabela 6-5** mostra a correspondência dos valores vitamínicos descritos nas embalagens dos leites analisados em percentuais de RDAs presentes nas porções médias diárias para coletividades e em 2000 cal de produto.

Tabela 6-3 Concentração de vitaminas do complexo B em leites em pó (mg/100g)¹ e em leite integral esterilizado (mg/100mL)²

Produto/Marcas	PV*	B ₁	B ₂	B ₆	NA	ND	PP
LP.integral/NS1 ¹	8	0,62	1,28	0,4	nd	3,2	3,2
LP.integral/NS2 ¹	10	0,41	1,24	0,4	nd	4,6	4,6
LP.integral/NS3 ¹	—	0,26	1,44	0,4	nd	3,8	3,8
Média - DP		0,43 - 0,18	1,32 - 0,11	0,4 0,0	nd	3,9 - 0,7	3,9 - 0,7
Embalagem*		0,3	0,7	0,4	—	3,7	—
LP.acidificado/NS1 ¹	3	0,23	0,92	1,0	2,7	nd	2,7
LP.acidificado/NS2 ¹	4	0,29	1,10	0,9	2,7	nd	2,7
LP.acidificado/NS3 ¹	6	0,29	0,82	1,1	2,3	0,2	2,5
Média - DP		0,27 - 0,03	0,95 - 0,14	1,0 - 0,1	2,6 - 0,2	0,2 - -	2,6 - 0,1
Embalagem*		0,3	0,8	0,4	—	—	3,6
LP.desnatado/BR1 ¹	23	0,99	2,03	1,3	nd	14,7	14,8
LP.desnatado/BR2 ¹	23	1,15	2,26	1,2	0,2	14,6	14,8
LP.desnatado/BR3 ¹	24	1,37	2,38	1,2	0,2	16,0	16,2
Média - DP		1,17 - 0,19	2,22 - 0,17	1,23 - 0,06	0,2 - 0,0	15,1 - 0,8	15,2
Embalagem*		1,1	1,1	1,1	—	—	11,0
LE.integral/IL1 ²	3	nd	0,14	0,6	0,7	4,0	4,7
LE.integral/IL2 ²	3	nd	0,19	0,6	0,2	5,7	5,9
LE.integral/IL3 ²	3	nd	0,23	0,8	nd	6,0	6,0
Média - DP		—	0,19 - 0,05	0,7 - 0,1	0,4 - 0,4	5,2 - 1,1	5,5 - 0,7
Embalagem*		—	—	0,6	—	—	5,1

PV: prazo de validade (meses); NA: ácido nicotínico; ND: nicotinamida; vitamina PP = NA+ND; DP: estimativa do desvio padrão; nd: não detectado; *valores fornecidos pelas embalagens dos produtos; —: não fornecidos. Coeficientes de variação, entre duplicatas, inferior a 5% para as vitaminas B₁, B₂ e nicotinamida, inferior a 10% para a vitamina B₆ e inferior a 13% para o ácido nicotínico.

Tabela 6-4 Valores de pH dos produtos analisados, distribuídos entre os vários fabricantes

Produto	pH
Leites	
Leite em pó integral / NS	6,4
Leite em pó acidificado / NS	5,3
Leite em pó desnatado / NS	6,6
Leite esterilizado integral / IL	6,6
Bebidas lácteas aromatizadas	
NS	6,4
CF	6,3
RS	6,3
LC	6,4
QQ	6,4
PL	6,5
FL	6,4

Tabela 6-5 Correspondência dos valores declarados em % da RDA na porção média diária e em números de RDA/2000 cal

Amostra	Porção média ¹	cal/100g ²	Descrição	B ₁	B ₂	B ₆	PP
Bebidas lácteas	200 mL	100	embalagem	—	0,45	0,60	5,1
			% RDA	—	60	66	60
			RDA/2000cal	—	6	6,5	6
Leite esterilizado integral	200 mL	61	embalagem	—	—	0,6	5,1
			% RDA	—	—	66	60
			RDA/2000cal	—	—	10	11
Leite em pó integral	25 g	484	embalagem	0,3	0,8	0,4	3,7
			% RDA	6	13	6	6
			RDA/2000cal	1	2	1	1
Leite em pó desnatado	50 g	350	embalagem	1,1	1,1	1,1	11,0
			% RDA	43	36	31	33
			RDA/2000cal	5	4	3,5	4

¹- SILVA e MONNERAT (1986); ²- FRANCO (1992); embalagem: mg/100g; —: não fornecido ou não determinado.

As embalagens das bebidas lácteas e do leite esterilizado declaram cerca de 60% da RDA vitamínica nas porções médias, com equivalências em torno de 6 RDA/2000 cal nas bebidas lácteas achocolatadas e 10 RDA/2000 cal no leite esterilizado. Os valores vitamínicos descritos nas embalagens dos leites em pó desnatados também apresentam equivalências, em RDA/2000 cal, elevadas. Os valores declarados nas embalagens de leites em pó integrais fornecem relações mais adequadas, entre 1-2 RDA/2000 cal.

6.4 Conclusões

- Embora este método analítico não seja direcionado às vitaminas naturalmente presentes nos alimentos, a concentração elevada e a predominância da forma livre permitiram a determinação da vitamina B₂ no leite integral, não enriquecido com esta vitamina;
- O ácido nicotínico foi a única forma da vitamina PP, detectada no leite em pó acidificado NS;
- Os níveis de vitamina B₂ nos leites em pó integral NS, desnatado BR e na bebida láctea FL, B₆ no leite acidificado NS e na bebida láctea FL, e PP na bebida láctea FL foram, aproximadamente, o dobro dos valores descritos nas embalagens dos produtos;
- As vitaminas B₁ e B₆, em bebidas lácteas, tiveram as suas determinações dificultadas em função das baixas concentrações e de interferentes incorporados pela presença de chocolate, respectivamente;
- Observou-se uma necessidade de maior rigor no controle das taxas de enriquecimento.

6.5 Referências bibliográficas

- AGOSTINI, T. S. & GODOY, H. T. (1996). Otimização e validação de metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, por CLAE. In : *Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, por CLAE*. Tese de doutorado em Ciências de Alimentos. FEA, UNICAMP, Campinas. p 85-113.
- ASHOOR, S. H.; KNOX, M. J.; OLSEN, J. R. & DEGER, D. A. (1985). Improved liquid chromatographic determination of riboflavin in milk and dairy products. *J. AOAC.*, **68** (4), 693-696.
- AYI, B. K.; YUHAS, D. A. & DEANGELIS, N. J. (1986). Simultaneous determination of vitamins B₂ (riboflavin) and B₆ (pyridoxine) in infant formula products by reversed phase liquid chromatography. *J. AOAC*, **69** (1), 56-59.
- BATES, J. C.; POWERS, H. J.; DOWNES, R.; BRUBACHER, D.; SUTCLIFFE, V.; THURNHILL, A. (1989). Riboflavin status of adolescent vs elderly Gambian subjects before and during supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, **50**, 825 - 829.
- BOISVERT, W. A.; CASTAÑEDA, C.; MENDOZA, I.; LANGELOH, G.; SOLOMONS, N. W.; GERSHOFF, S. N. & RUSSELL, R. M. (1993) Prevalence of riboflavin deficiency among Guatemalan elderly people and its relationship to milk intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, **58**, 85-90.
- CHASE, G. W.; LANDEN, W. O.; EITENMILLER, R. R. & SOLIMAN, A. G. (1992). Liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin, and pyridoxine in infant formula. *J. AOAC Int.*, **75** (3), 561-565.
- FRANCO, G. (1992). *Tabela de Composição Química de Alimentos*. 8ª ed. Livraria Atheneu Ed., Rio de Janeiro - São Paulo, 230p.
- LAVIGNE, C.; ZEE, J. A.; SIMARD, R. E. & BELLVEAU, B. (1989). Effect of processing and storage conditions on the fate of vitamins B₁, B₂, and C on the shelf-life of goat's milk. *J. Food Sci.*, **54** (1), 30-34.
- LAVIGNE, C.; ZEE, J. A.; SIMARD, R. E. & GOSSELIN, C. (1987). High performance liquid chromatographic-diode array determination of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in goats' milk. *J. Chrom.* **410**, 201-205.
- MUÑOZ, A.; ORTIZ A. & MURCIA, M. A. (1994). Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and non dairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chem.*, **49**, 203-206.
- OAMEN, E. E.; HANSEN, A. P. & SWARTZEL, K. E. (1989). Effect of ultra high temperature steam injection processing and aseptic storage on labile water-soluble vitamins in milk. *J. Dairy Sci.* **72**, 614-619.
- PREMARATNE, R. J. & COUSIN, M. A. (1991). Changes in the chemical composition during ultrafiltration of skim milk. *J. Dairy Sci.* **74**, 788-795.
- SGARBIERI, V. C. (1986). Nutrição e tecnologia de alimentos. *Bol. SBCTA*, **20** (3/4), 115 - 139.
- SILVA, L. B. & MONNERAT, M. P. (1986). *Alimentação para Coletividades*. 2ª ed. Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 246p.
- TANNER, J. T.; SMITH, J.; DEFIBAUGH, P.; ANGYAL, G.; VILLALOBOS, M.; BUENO, M. P.; MCGARRAHAN, E.; WEHR, H. M.; MUNIZ, J. F.; HOLLIS, B. W.; KOH, Y.; REICH, P. & SIMPSON, K. L. (1988). Survey of vitamin content of fortified milk. *J. AOAC*, **71** (3), 607-610.

Conclusões

CONCLUSÕES

1. A extração multivitamínica com ácido sulfúrico diluído, através de vibração ultrassônica por 60 min, apresentou-se eficiente na determinação das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e niacinamida em alimentos enriquecidos. A precipitação do extrato com metanol, seguida de refrigeração, é satisfatória tanto na limpeza do extrato quanto na prevenção de precipitações na coluna cromatográfica. A eluição por gradiente é essencial para obtenção de boa resolução cromatográfica, quando se deseja a determinação simultânea dessas vitaminas em alimentos.
2. Pequenas alterações nas concentrações dos modificadores orgânicos e no pH da fase móvel podem melhorar, principalmente, a separação de interferentes que eluem próximos às vitaminas B₂ e niacinamida, respectivamente.
3. Os limites de detecção encontrados para as vitaminas B₁, B₂, B₆, ácido nicotínico e nicotinamida foram 0,08; 0,06; 0,16; 0,06 e 0,20 µg/mL, respectivamente. Os dados de recuperação e repetibilidade das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e niacinamida foram bons nos níveis de enriquecimento dos produtos analisados, entretanto, recomendam cautela para aplicação do método em alimentos que apresentam baixos níveis de concentrações vitamínicas. A recomendação deve ser mais rigorosa, quando consideradas as vitaminas B₆ e niacina.
4. O método proposto apresenta menor sensibilidade, em relação aos métodos da AOAC, devido a utilização de detector ultravioleta, dificultando, assim, a aplicação deste em alimentos não enriquecidos. Entretanto, o método pode ser aplicado, com vantagens, em alimentos não enriquecidos, que sejam fontes naturais de vitaminas presentes em grande quantidade e na forma livre, como a riboflavina em leite.

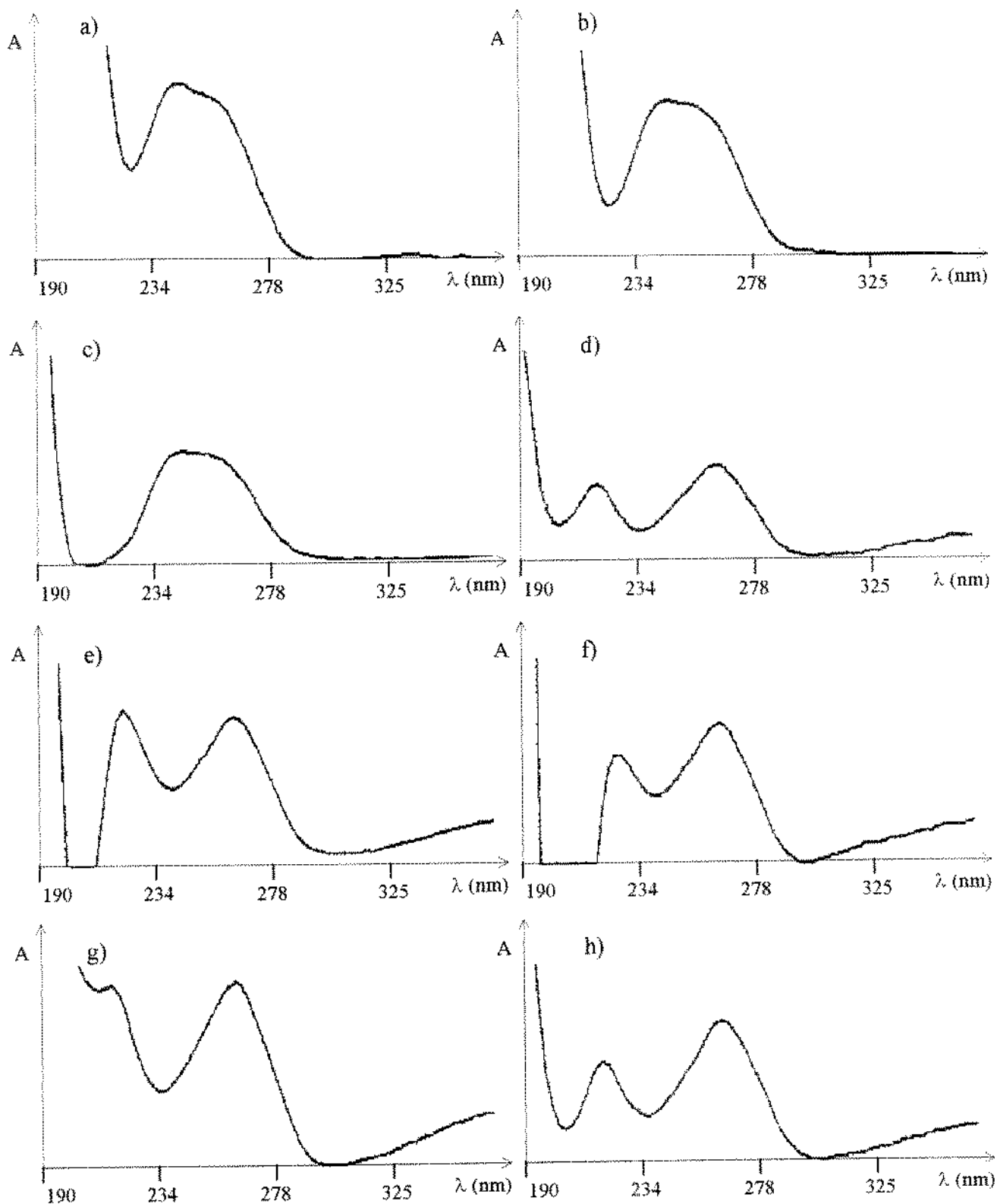
5. A análise de robustez do método mostra que o tempo de injeção é a variável com efeito mais pronunciado, entre os tratamentos promovidos, durante as determinações das vitaminas B₁, B₂ e ácido nicotínico. A quantidade de amostra é a variável com maior influência na determinação da vitamina B₆ e o tempo de extração, a concentração do ácido e o tipo de metanol são as variáveis de maior efeito na determinação da nicotinamida.
6. As vantagens do método de determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e niacinamida, por CLAE, com relação aos métodos da AOAC, incluem a determinação simultânea de 4 vitaminas; a determinação das duas formas da vitamina PP, niacina e niacinamida; simplicidade e versatilidade das etapas de extração e purificação, assim como baixo custo de reagentes; utilização de reagentes com menores níveis de toxicidade; uso de detector UV, em substituição ao de fluorescência, com eliminação de reações de derivação, e rapidez.
7. Entre os alimentos enriquecidos analisados, todos os diferentes tipos de biscoitos, de 1 única marca, apresentaram apenas 30 % dos teores descritos nas embalagens dos produtos; os flocos de milho, de 4 diferentes marcas, apresentaram menos de 30% dos níveis vitamínicos declarados; os macarrões, de 1 única marca, não apresentaram nenhuma das vitaminas descritas nas embalagens do produto e o complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular apresentou níveis de B₁, B₂ e niacinamida superiores a 300% dos valores declarados.
8. Observou-se uma necessidade de maior rigor no controle das taxas de enriquecimento.

Sugestões

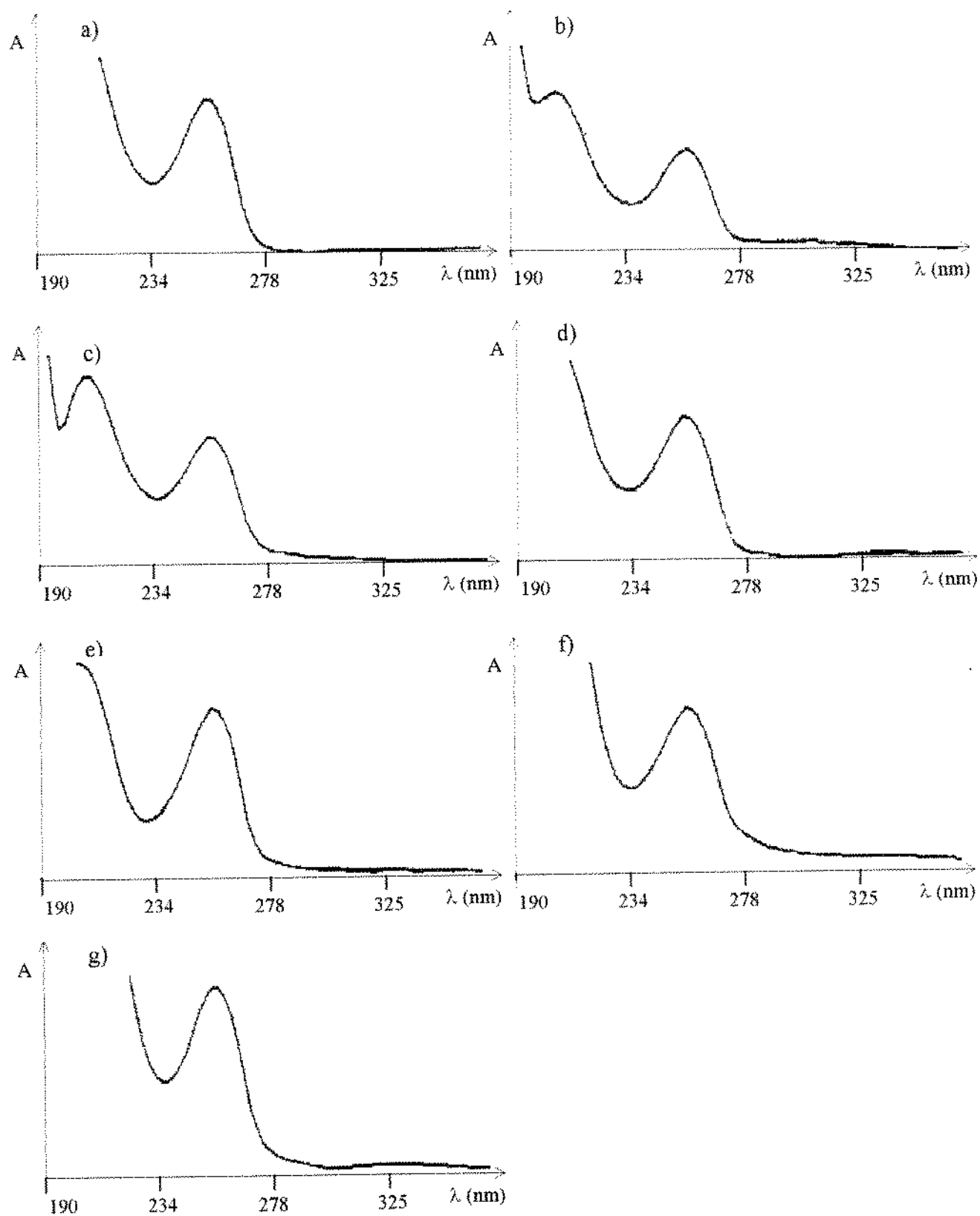
SUGESTÕES

1. Extensão da metodologia de determinação simultânea das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e niacinamida, por CLAE, para premix e formulações farmacêuticas, com eliminação da etapa de limpeza do extrato.
2. Extensão da metodologia de determinação das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina e niacinamida, por CLAE, para outros alimentos enriquecidos, com melhoramento da etapa de limpeza do extrato e eliminação dos interferentes que eluem próximos às vitaminas B₆, quando determinada em achocolatados, e niacina, determinada em biscoitos.
3. Estímulo do enriquecimento subsidiado da farinha de trigo com 60% dos valores de referência (VR) fornecidos pela FAO para as vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP na porção média diária ingerida pela coletividade. O enriquecimento dos outros produtos, para fins comerciais, deve obedecer a uma relação de proporcionalidade entre os níveis de nutrientes (valores de referência) e as calorias fornecidas pelo alimento, na porção média diária. Não devem ser enriquecidos alimentos como as bebidas alcólicas, as bebidas carbonatadas, o açúcar e os produtos de confeitaria, balas, gomas de mascar, bombons e similares.

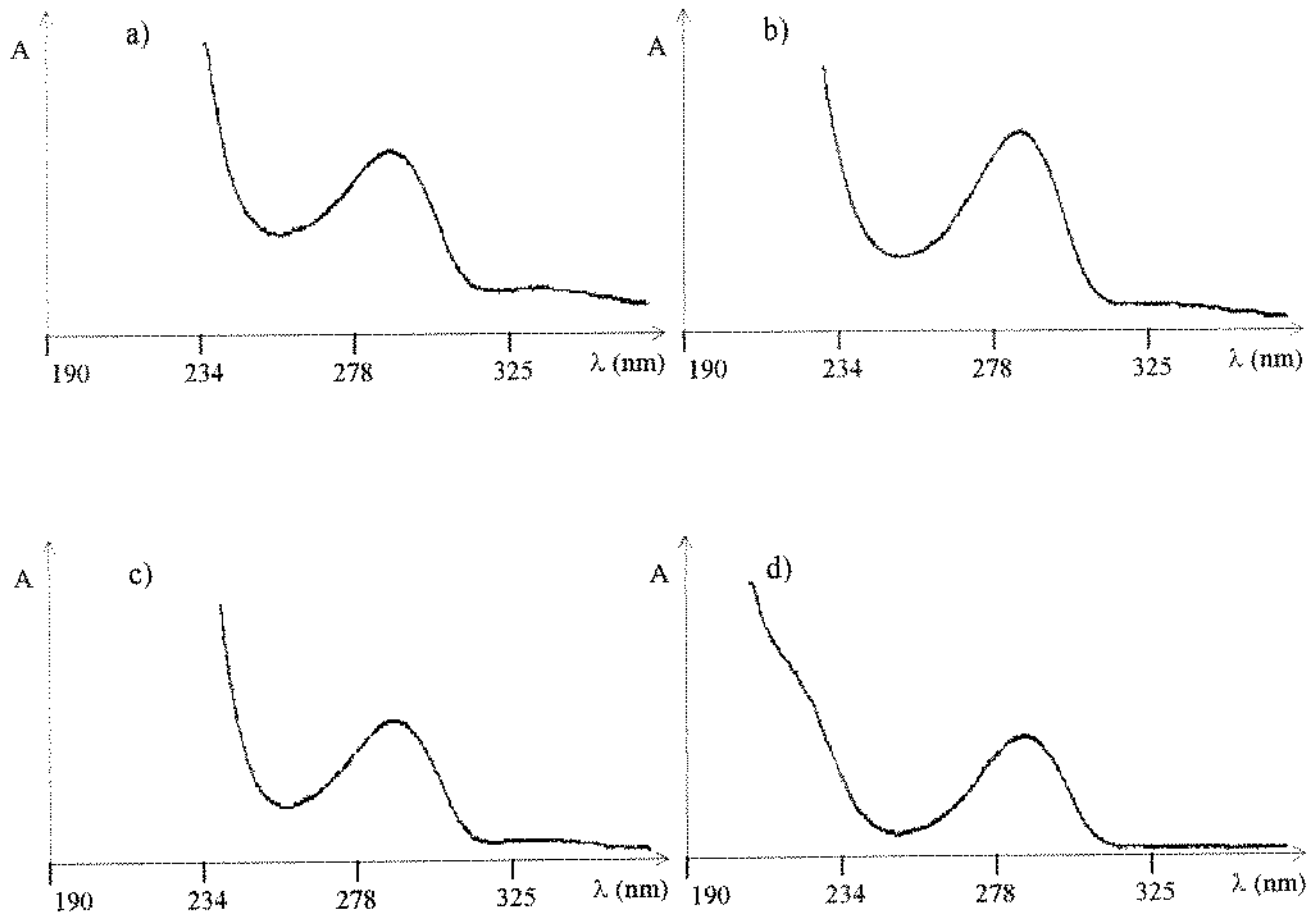
Anexos



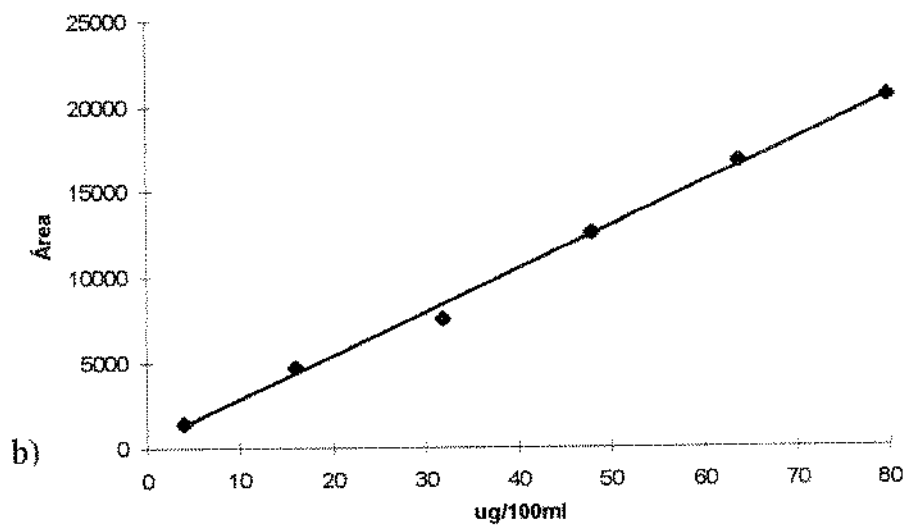
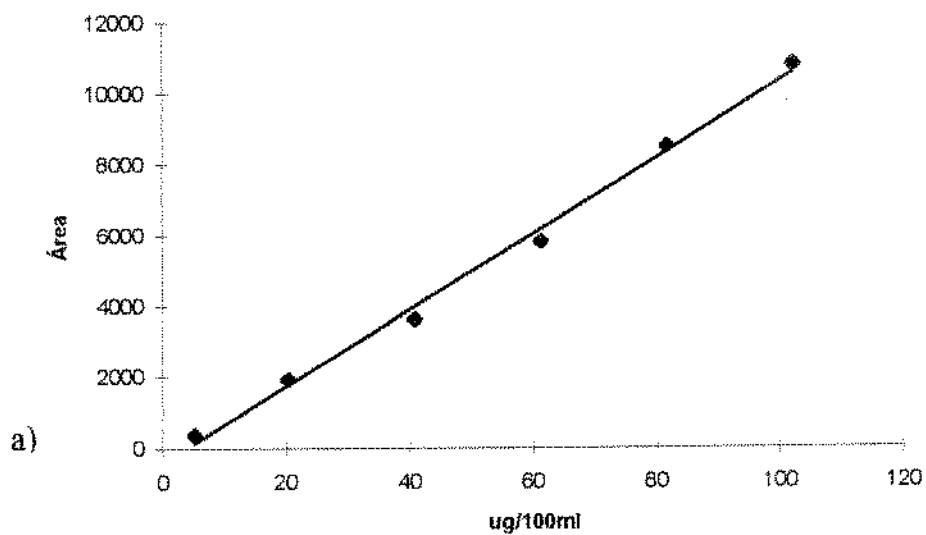
ANEXO 1- Espectros de absorção, obtidos através de detector de arranjo de diodos, da vitamina B₁ (a) em solução padrão, (b) em biscoitos de coco e (c) em creme de arroz; da vitamina B₂ (d, e) em solução padrão e (f) em biscoitos de maizena NS; e do composto similar a B₂ [Z], (g) em biscoitos de maizena NS e (h) em biscoitos de coco NS.



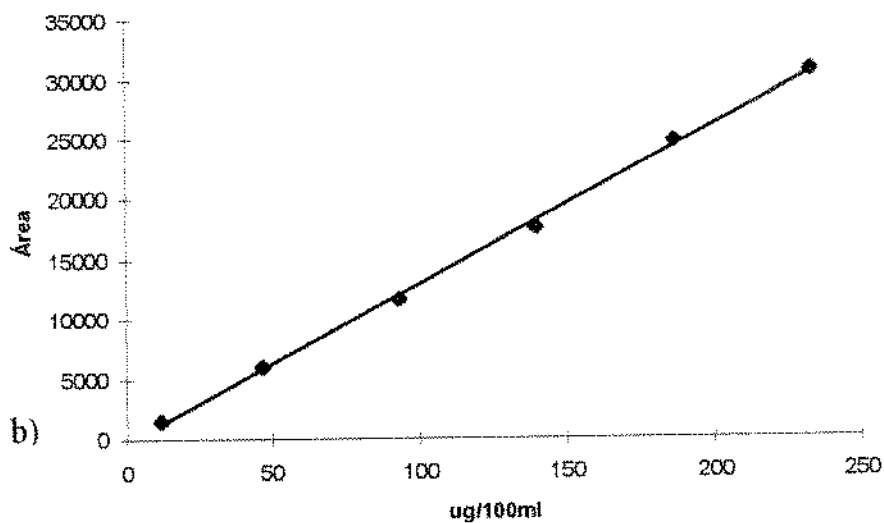
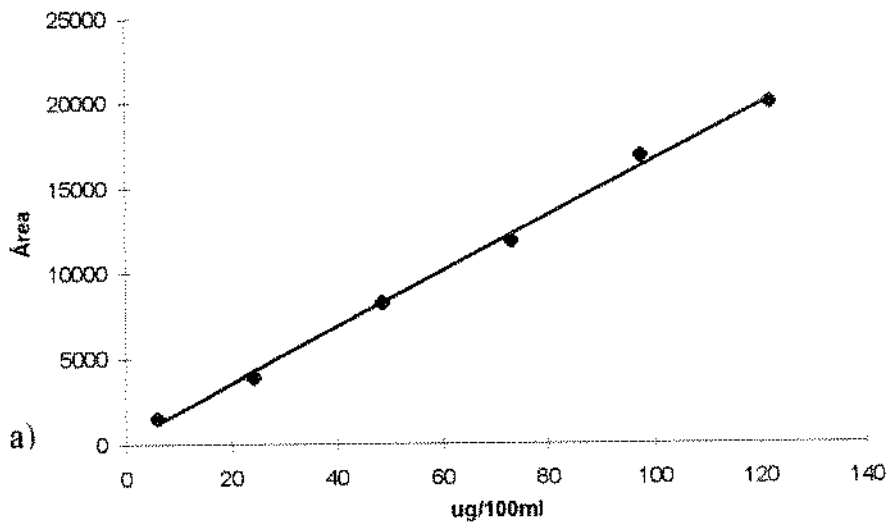
Anexo 2- Espectros, obtidos através de detector de arranjo de diodos, da niacinamida (a) em solução padrão, (b) em biscoitos de maisena, (c) em biscoitos de leite e (d) em creme de arroz e da niacina (e) em solução padrão, (f) em macarrão e (g) em leite em pó acidificado (g).



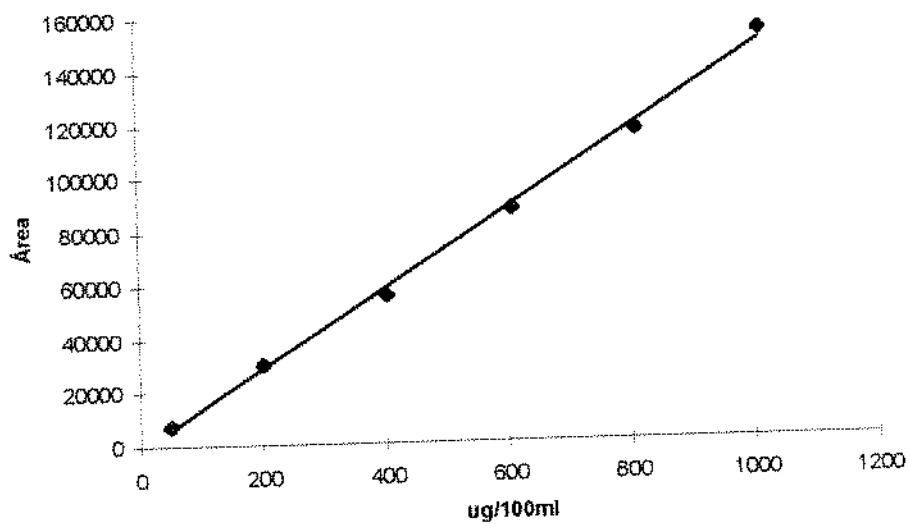
Anexo 3- Espectros, obtidos através de detector de arranjo de diodos, da vitamina B₆ presente em: (a) solução padrão, (b) biscoitos de leite, (c) leite em pó e (d) flocos de milho.



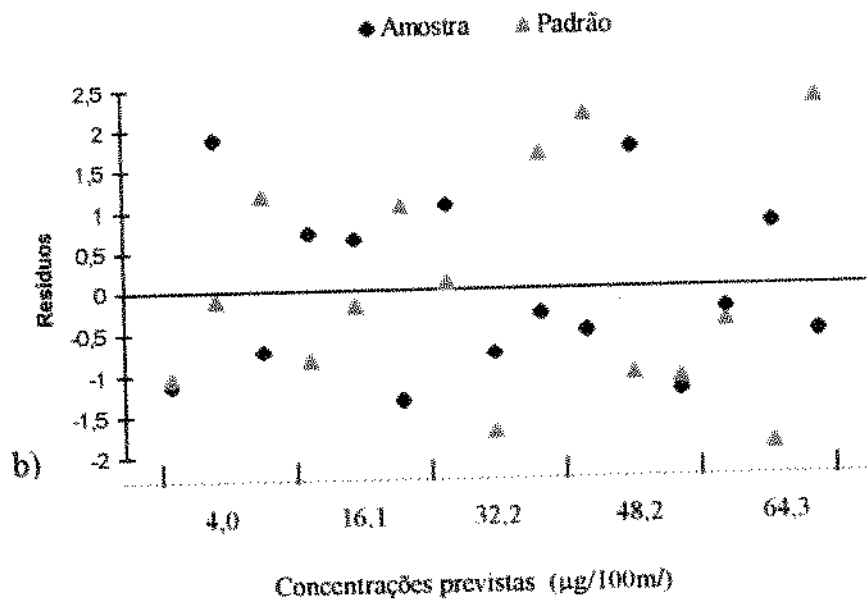
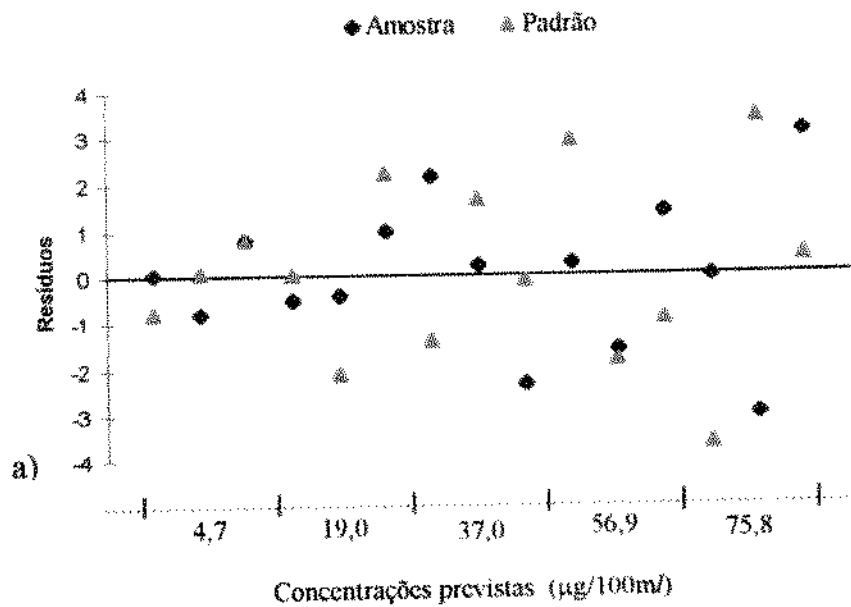
ANEXO 4- Curvas de padronização das vitamina B₁ (a) e B₂ (b), traçadas com médias de duplicatas.



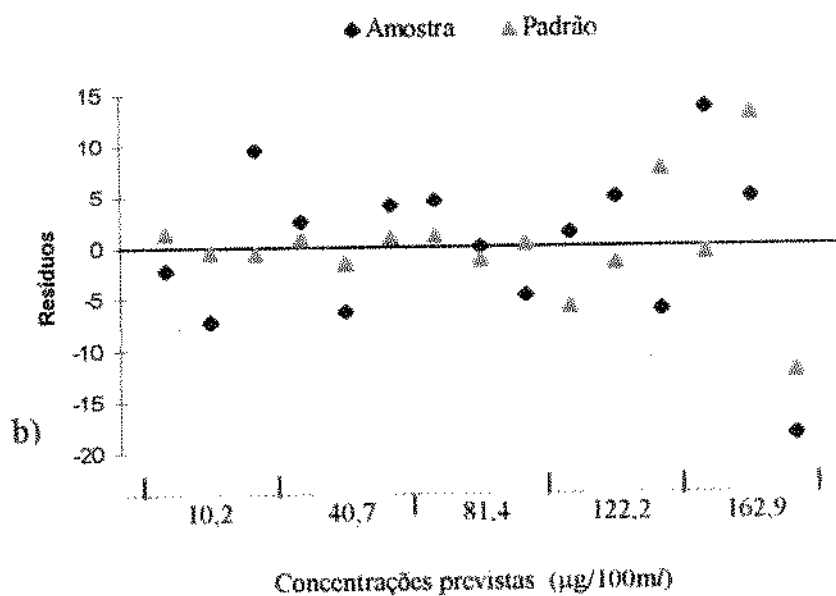
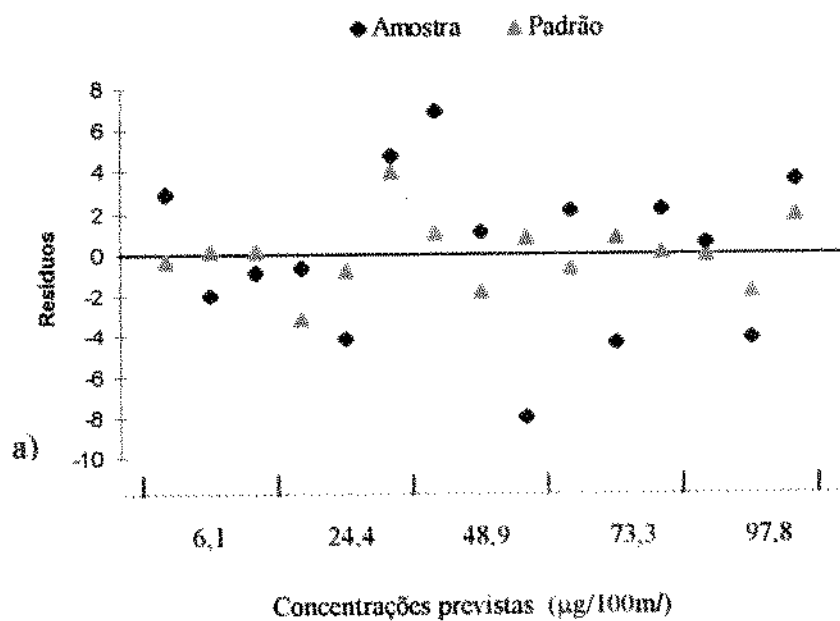
ANEXO 5- Curvas de padronização da vitamina B₆ (a) e do ácido nicotínico (b), traçadas com médias de duplicatas.



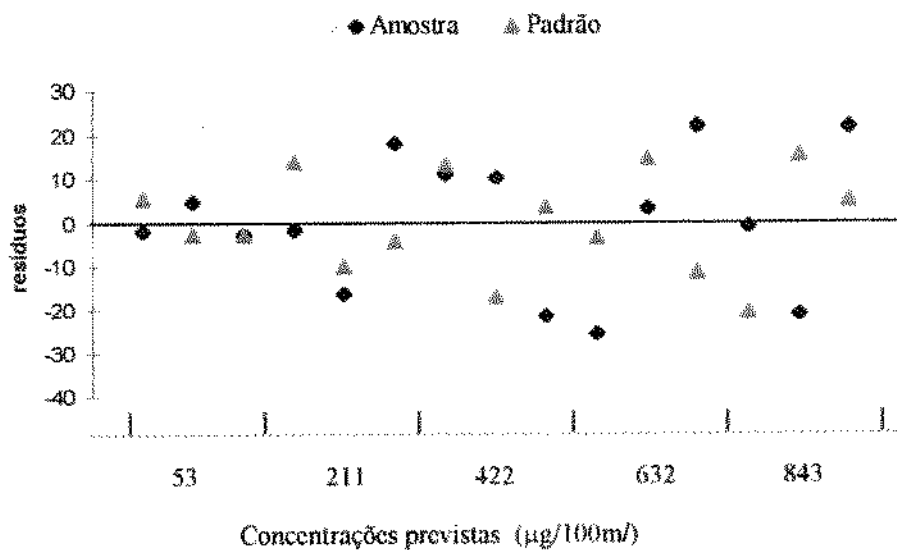
ANEXO 6- Curva de padronização da nicotinamida, traçada com médias de duplicatas.



ANEXO 7- Resíduos deixados por determinações, em triplicata, das vitaminas B₁ (a) e B₂ (b) adicionadas em biscoitos de maisena não vitaminados e em solução padrão, contra as concentrações previstas.



ANEXO 8- Resíduos deixados por determinações, em triplicata, da vitamina B₆ (a) e do ácido nicotínico (b) adicionados em biscoitos de maisena não vitaminados e em solução padrão, contra as concentrações previstas.



ANEXO 9- Resíduos deixados por determinações, em triplicata, da nicotinamida adicionada em biscoitos de maisena não vitaminados e em solução padrão, contra as concentrações previstas.

Biscoitos de leite

Farinha de trigo, amido de milho, leite em pó, soro de leite, gordura vegetal hidrogenada, açúcar, sal, lecitina, aromas e vitaminas. Extrato de malte na marca TR. Margarina e gema de ovos na marca RC'.

Biscoitos de maisena

Farinha de trigo, amido de milho, soro de leite, açúcar, gordura vegetal hidrogenada, sal, lecitina, aromas e vitaminas

Biscoitos maria

Farinha de trigo, amido de milho, soro de leite, açúcar, gordura vegetal hidrogenada, sal, lecitina de soja, aromas e vitaminas. Leite em pó na marca TR.

Biscoitos de coco

Farinha de trigo, açúcar, gordura vegetal hidrogenada, coco, sal, lecitina, aromas e vitaminas. Amido, leite em pó e extrato de malte na marca BD.

Biscoitos de chocolate recheados - massa

Farinha de trigo, amido de milho, cacau em pó, açúcar, açúcar invertido, gordura vegetal hidrogenada, sal, lecitina, aromas e vitaminas. Leite em pó nas marcas RC e RC'.

Biscoitos recheados de morango - massa

Farinha de trigo, amido de milho, gordura vegetal hidrogenada, açúcar, sal, lecitina, aromas e vitaminas. Maltodextrina na marca IL. Leite em pó e açúcar invertido na marca TR. Soro de leite e extrato de malte na marca BD.

ANEXO 10- Ingredientes descritos nas embalagens dos biscoitos analisados

Macarrões

Farinha de trigo, semolina, água, sal e vitaminas. Espinafre, cenoura e tomate em pó nas marcas RC e SL. Ovos na marca RC. Sêmola de trigo duro importado na marca SL.

Farinhas lácteas

Farinha de trigo torrada, leite em pó integral, açúcar, sal, vanilina, sais minerais e vitaminas.

Farinha NS'- trigo, cevada, aveia, malto-dextrinas, sacarose, sal, sais minerais e vitaminas.

Farinhas de cereais

Farinha de arroz CL- arroz.

Farinha de arroz e milho RF- amido de milho, farinha de arroz (9%) e vitaminas.

Farinha de milho RF- amido de milho , açúcar, aroma, corante, minerais e vitaminas

Farinha de cereais RF- amido de milho, farinhas de milho, de aveia, de arroz e de centeio, minerais e vitaminas

Flocos de milho

Milho, açúcar, sal extrato de malte e vitaminas. Glicose de milho e mel na marca CF.

Bebida dietética

Extratos vegetais aromáticos, mel de abelha, açúcar, vinho, ácidos orgânicos, sorbitol e vitaminas

Complemento alimentar para desenvolvimento de massa muscular

Soro de leite, leite desnatado, caseína, clara de ovos desidratada, maltodextrina, glicose, frutose, flocos naturais de morango, aromas, sais minerais e vitaminas.

ANEXO 11- Ingredientes descritos nas embalagens dos alimentos analisados

Leites

Leite esterilizado IL- leite integral e vitaminas.

Leite em pó NS- leite, açúcar, mel, óleo de milho, lecitina, minerais e vitaminas.

Leite em pó BR- leite em pó desnatado, leite em pó integral, maltodextrina, aromas e vitaminas.

Bebidas lácteas aromatizadas

Leite, açúcar, cacau em pó, sal, espessante carragena, aromas e vitaminas. Gordura vegetal e extrato de malte nas marcas QQ e RS.

ANEXO 12- Ingredientes descritos nas embalagens dos leites analisados