

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**ÁCIDO FÓLICO: VALIDAÇÃO DO MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Walisson Junio Martins da Silva

Araraquara-SP 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**ÁCIDO FÓLICO: VALIDAÇÃO DO MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ PASCHOAL BATISTUTI

Araraquara-SP 2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586a Silva, Walisson Junio Martins da
Ácido fólico: validação do método espectrofotométrico / Walisson Junio
Martins da Silva. – Araraquara, 2012
67 f.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: José Paschoal Batistuti

. 1. Validação. 2. Ácido fólico. 3 Espectrofotometria. I. Batistuti, José
Paschoal, orient.. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paschoal Batistuti

Prof. Dr. João Bosco Faria

Prof. Dr. Ossamu Hojo

DEDICATÓRIA

A Deus, razão do meu viver. Obrigado por tudo, por me conceder o dom da vida, os livramentos e por me abençoar e me iluminar em todos os momentos.

À grande mulher que tanto amo e admiro; a quem serei eternamente grato por toda a dedicação e por todos os ensinamentos de vida. Por ser o meu grande exemplo a seguir, esta vitória é dedicada à senhora, minha amada mãe.

POUCO ANTES DE INICIAR O MESTRADO: *Disseram pra você não vai dar certo Passam perto de você e falam é só mais um Mais um sonhador pelo caminho É mais um que vai andar sozinho derrotado.*

Mas não te viram pela madrugada a clamar Não te viram adorando a Deus no seu lugar Duvidaram das promessas do senhor na sua vida Mas Deus marcou o dia minha história vai mudar! Quem te viu passar na prova Quem te viu vai ver agora o senhor te exaltar.

Chega de andar provado, hoje chegou o dia Pare de chorar chegou a alegria Saiba que o fracasso nunca é eterno Deus esta por perto ele tudo vê Nesta caminhada Ele vai à frente Seu pranto, seu gemido ele compreende seu pensamento Deus consegue descrever É só Jesus pra te entender se a porta pra você não se abriu por tanto tempo você insistiu lutou contra as dificuldades Foi escolhido por Deus (Sonhador- André e Felipe).

CONFIANÇA NA APROVAÇÃO DO MESTRADO: *Meu futuro é do tamanho que eu crer. Minha casa é fruto do amor de Deus Minha força está em alegrar Teu coração, Senhor O sonho vai além de onde alcançam minhas mãos.*

A esperança só morrerá Se eu decidir não mais lutar Só me basta confiar Em quem jamais mudará: Jesus!

Minha grande sorte foi conhecer desfrutar do Teu amor Sua grande aposta foi me amar acreditou em mim (Apascentar- Meu Futuro).

MOMENTOS MAIS DIFÍCEIS DO MESTRADO: *Não posso deixar meus sonhos se perderem me esquecer das promessas desistir sem lutar, deixar de ser um vencedor vou acreditar, Deus tem o melhor pra mim, eu sei vou lutar*

pra vencer, não olhar para trás transpor barreiras, eu vou conquistar o impossível.

*Nasci pra vencer, vou acreditar que os sonhos jamais podem se apagar
Lutar pra vencer pela Fé conquistar sou filho de Deus, nasci pra vencer.
(Nasci pra Vencer- Além do Véu).*

Deus vai te ajudar Ele vai te levantar e curar as feridas do teu coração.

***Você se lembra de quando chorava clamando por mim dizendo bem alto
que não aguentava ficar sempre assim Mas eu estava lá Vi você chorar dizendo
Te amo Senhor, Te amo Senhor***

***Você é o meu filho que eu amo tanto e pra ti eu tenho planos Eu vou ti
abençoar onde que você pisar Atravessarei esse deserto sempre estarei por
perto Precisando é só chamar vou te ajudar passar (Hora de vencer- André e
Felipe).***

FINALZINHO DO MESTRADO: O meu coração é teu, minha força, meu amor
És tudo para mim

Que me vale ter o mundo e ser farto de ouro ou prata se eu não tiver a Ti

Tua voz sempre acalma a minh'alma me enche de esperança, me faz respirar

Mesmo sendo limitado e fraco Tu me fazes subir ao podium da vida e me dá
vitória

Tu és Fiel pra mim mesmo quando todos vão Tu não me deixarás jamais Tu és
Fiel Senhor (Tu És Fiel-Trazendo a Arca).

“O SEGREDO É LOUVAR EM MEIO A LUTA, É CANTAR ENQUANTO
ESPERA EXALTAR QUEM PROVA TUA FÉ” LAURIETE.

AGRADECIMENTOS

A Deus seja dada a honra a glória o louvor e a adoração.

A minha família, especialmente a minha mãe que acompanhou toda minha trajetória, muitas lutas e vitórias neste curso.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade de realizar este curso.

Ao meu orientador José Paschoal Batistuti pela orientação, ensinamentos, pelo apoio, pela compreensão em todos os momentos.

Ao professor Dr. Antônio José Goulart pelas preciosas sugestões e considerações na qualificação. Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participarem da defesa e pelas ricas contribuições ao trabalho.

A professora Dr^a. Maria da Penha Longo Mortatti Catanozi pelo estágio docência, Safe e Unati e principalmente pela atenciosidade, ensinamentos e incentivos.

A professora Dr^a. Maria Rita Marques de Oliveira por trabalhar demonstrando extrema afetividade pela docência e pesquisa sendo um exemplo que procurarei me espelhar.

À Flávia Santos pela inestimável ajuda nas análises, convivência e por ser exemplo de concentração competência, eficiência e dedicação.

A minha irmã de coração Delfina pelo incentivo, apoio nas horas difíceis, atenciosidade, conselhos preciosos, enorme simpatia e carisma. Sou seu fã.

À Cristina pelo modo tranquilo e muito lúcido de explicar e por transmitir bondade. Val, Robson, Luciana e Evelise por demonstrarem extrema

competência, cordialidade e profissionalismo e assim tornarem o ambiente muito agradável de trabalhar.

A Fabiana Maciel, Larissa, Daniele Maffei, Matheus, Grace, Talita, Maria Tereza, Lara, Cibelly, Cláudia Lima, Lívia Basile, Jaqueline, Paula Jorge, Ederlan, Hitty, Fabiana Florian, Laura, Lívia Lima, Crislaine, Paula Ferreira e Marlene, foi uma honra conhecer vocês.

Ao Breno, Ricardo e a Nala pela convivência pacífica e ajuda num momento muito difícil da minha vida, valeu.

A Ana Lúcia Nasser e a Adriana pela simpatia sempre demonstrada.

À Seção de Pós-Graduação e aos funcionários da Biblioteca da FCFAr pelo apoio e disponibilidade oferecida.

A Tiana, ao Bispo e ao Orival, enorme satisfação tê-los conhecido.

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos ex meus alunos do Pedrão, Vitão e Marcelino Braga.

Ao pessoal da República Inocentes especialmente Antônio, exemplo vivo de muita agilidade e simpatia, Mário Venere coração grande e justo, Rodrigo dedicado e batalhador, Rudy eficiência e dedicação em pessoa e Virgínia, exemplo de afetividade e determinação nos estudos. Ludmila, Guilherme, Clarides, Carmem e Jardel pessoas que tive a honra de conhecer na república.

A todos que tentaram me ofender seja devido a sua própria insegurança, infelicidade ou incompetência, pois assim me proporcionaram muita reflexão para tornar um cidadão melhor e crescer e ter ainda mais a consciência de que julgar o próximo é muito mesquinho e de baixo escalão.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1-Introdução	13
2 - Revisão Bibliográfica	15
2.1 - O Ácido Fólico	19
2.2 Quantificação de ácido fólico	27
2.3 Teores de ácido fólico em farinhas fortificadas	27
2.4-Validação de Métodos Analíticos	30
2.4.1 - Parametros de validação	33
2.4.1.2 – Linearidade	33
2.4.1.3 - Faixa Linear de Trabalho	34
2.4.1.4. – Sensibilidade	35
2.4.1.5 - Limite de Detecção	35
2.4.1.6 - Limite de Quantificação	36
2.4.1.7 - Exatidão	36
2.4.1.8 – Precisão	37
2.4.1.9 Robustez	38
2.5 A Espectrofotometria no UV-Visível	38
3-Referências Bibliográficas	42

Capítulo II

Resumo-----	51
Abstract-----	51
1-Introdução -----	52
2 - Material e Métodos.....	55
2.1 – Material.....	55
2.2 – Métodos.....	55
2.2.1.- Determinação de ácido fólico por espectrofotometria em UV -----	55
3-Resultados e Discussão	57
6-Conclusão	65
7-Referências Bibliográficas	66

Resumo

Alimentos enriquecidos e medicamentos são importantes meios para o fornecimento de vitaminas para o nosso organismo. É fundamental desenvolver métodos de validação de quantificação dos nutrientes para assegurar a qualidade dos resultados analíticos. O ácido fólico é a vitamina B₉. Os folatos são as formas da vitamina naturalmente encontradas nos alimentos e correspondem aos compostos que têm atividade vitamínica similar a do ácido fólico, a forma sintética dos folatos que corresponde a forma encontrada em suplementos vitamínicos, medicamentos e alimentos fortificados, por ser mais bem absorvido pelo organismo. Há evidências da relação entre a deficiência de folatos e o risco de defeitos no desenvolvimento de fetos, durante a gestação, doenças cardíacas, de alguns tumores e mal de Alzheimer's, entre outras patologias. A validação é o estabelecimento de uma evidência documentada que fornece alto grau de segurança de que um processo específico levará consistentemente a um resultado confiável, ou seja, é o ato de provar que o procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva a resultados confiáveis. A espectroscopia UV-Vis trata-se de uma técnica consolidada, de baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades que surgem no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e alimentícios. Foi desenvolvido e validado um método espectrofotométrico de quantificação do ácido fólico.

Palavras-chave: Validação, Ácido Fólico, Espectrofotometria UV-Vis.

Abstract

Enriched foods and drugs are important means for supplying vitamins for our organism. It is essential to develop of methods for validation to ensure product quality. Folic acid is vitamin B₉. Folates are forms of vitamin naturally found in foods and correspond to compounds that have activity similar to vitamin folic acid that is the synthetic form of folates found in vitamin supplements, fortified foods and drugs, to be better absorbed by the body. There is evidence of the relationship between folate deficiency and risk of defects in developing fetuses during pregnancy, cardiac disease, Alzheimer's disease, and certain types of tumors, among others diseases. Validation is establishing documented evidence that provides a high degree of assurance that a specific process will consistently a reliable result, or is the act of proving that the procedure, process, equipment, material, activity or system leads to reliable results. The spectroscopy UV-Vis is a consolidated technique, with low cost and sensitivity compatible with many of the needs that arise in quality control of pharmaceutical products and food. In this work, it was developed and validated a method for spectrophotometric quantification of folic acid.

Keywords: Validation, Folic Acid, Spectrophotometry UV-Vis.

CAPÍTULO 01

1-Introdução

Atualmente, alimentos enriquecidos e medicamentos estão se tornando importantes meios para o fornecimento de vitaminas para o nosso organismo. Dessa forma, é fundamental desenvolver métodos de validação dos nutrientes para assegurar a qualidade dos produtos.

O interesse pela quantificação do ácido fólico e dos folatos tem crescido nos últimos anos com as descobertas relacionadas às suas funções nos diversos processos metabólicos no organismo humano. Os folatos são essenciais na prevenção e redução significativa do risco de má formação do tubo neural na gestação (FACCO et al., 2007).

Há com bastante frequência na química analítica o desafio de desenvolver metodologias analíticas mais sensíveis, confiáveis, seletivas e de menor custo. Esta procura por novas metodologias tem propiciado o desenvolvimento de muitas técnicas analíticas instrumentais, grande parte das quais, além de representar avanço analítico, tem sido fundamental para o crescimento de muitas outras áreas da ciência.

O desenvolvimento de novos métodos de análise de vitaminas se deve ao fato da crescente incorporação delas nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. É de extrema importância o desenvolvimento de procedimentos rápidos, mais baratos, precisos e mais seletivos para a determinação destas vitaminas nesses produtos. (ANICETO et al., 2000).

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas é cada vez mais reconhecida e exigida pela norma ISO 17025 do INMETRO. Para garantir que um novo método analítico gere resultados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido à validação (RIBANI et al., 2004). Um processo de validação bem definido e documentado fornece às agências reguladoras evidências de que os métodos de análise são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003).

As técnicas analíticas, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE) se destacam na química analítica pela confiança das análises qualitativas e quantitativas em amostras

ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos. Por serem técnicas de alto custo, técnicas menos onerosas são constantemente pesquisadas.

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos (LIMA; REIS; MELO, 2012; BARI et al., 2011; POURMAND, AZAR e AGHAVALIJAMAAT, 2011; FERREIRA e COLOMBO, 2011; KARNJANAWIPAGUL et al., 2010; FAVORETTO et al., 2010; SREEKANTH et al., 2010) e definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento. Dentre esses, muitos são das áreas farmacêutica (BHATTI et al., 2012; THATTE et al., 2011; POLONINI et al., 2011; FAVORETTO et al., 2010; RECH et al., 2010; MISHRA et al., 2010; PROENÇA et al., 2007) e biológica (SEBBEN et al., 2011; MORO et al., 2007). Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação.

Os conceitos e aplicações de validação de metodologia analítica estão expandindo e não se restringindo somente a medicamentos, devendo num futuro próximo serem mais utilizadas em cosméticos, produtos veterinários e alimentos.

A análise por espectroscopia UV-Vis apresenta um conjunto de características favoráveis, as quais deveriam garantir a sua condição de ferramenta analítica de primeira escolha. Trata-se de uma técnica consolidada, de baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades que surgem no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e alimentícios.

Por ser a espectrofotometria UV-Vis um método de análise reconhecido pelas vantagens relacionadas ao seu uso, como baixo custo operacional, confiabilidade nos resultados, fácil utilização e produzir resultados de interpretação bastante simples, ela é uma técnica utilizada principalmente no controle de qualidade laboratorial. Diante disto, este projeto propõe a validação espectrofotométrica do ácido fólico, utilizando menos solventes e sendo mais rápida comparando a outras metodologias de quantificação desta vitamina.

2 - Revisão Bibliográfica

Vitaminas são substâncias orgânicas indispensáveis à manutenção das funções metabólicas do organismo. Algumas vitaminas atuam como coenzimas; isto explica seus papéis essenciais nos processos biológicos. Essas substâncias apesar de essenciais ao metabolismo, não são sintetizadas pelo organismo e, em virtude disso, necessitam ser adquiridas por meio da dieta. Em dias atuais, alimentos enriquecidos e medicamentos estão se tornando importantes meios para a obtenção de vitaminas para o nosso organismo. Dessa forma, métodos de quantificação que sirvam como controle de qualidade destes produtos são essenciais.

Vitaminas são substâncias requeridas em pequenas quantidades. Dependendo da solubilidade, as vitaminas são classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis são aquelas que se dissolvem em água, mas não em lipídios; algumas delas, porém, são levemente solúveis em alguns solventes orgânicos. Dentre as vitaminas hidrossolúveis tem-se o ácido ascórbico (vitamina C), niacina (vitamina B₃), riboflavina (vitamina B₂), tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆), ácido pantotênico (B₅), biotina, ácido fólico (vitamina B₉) e cianocobalamina (vitamina B₁₂). As Vitaminas lipossolúveis são solúveis em óleos, gorduras e solventes orgânicos com pouca polaridade ou apolares. São lipossolúveis as vitaminas A, D, E e K (ANICETO et al., 2000).

A vitamina B₉ é uma coenzima fundamental para o metabolismo. O folato é a forma da vitamina encontrada nos alimentos, enquanto o ácido fólico é a forma sintética da vitamina que é usado extensivamente para a fortificação de alimentos, bem como suplementos e proporciona uma melhor biodisponibilidade do que folato. O ácido fólico é insípido, inodoro e exibe uma aparência amarelo-laranja cristalina. É uma vitamina instável ao calor, facilmente oxidado e instável na presença de ácidos fortes (HAU., 2008).

Nos últimos 30 anos, o avanço nos conhecimentos tornou evidente que os folatos apresentam importância vital para a saúde humana. Os folatos fazem parte das

vitaminas do grupo B e são importantes para processos bioquímicos, como síntese e reparo de DNA, formação e maturação das hemácias e leucócitos na medula óssea e transformação da homocisteína em metionina. A ingestão de níveis adequados de folatos é requerida para a normalidade do metabolismo, divisão celular, funções neurais e crescimento. Gestantes devem aumentar o consumo de folatos a fim de prevenir malformações congênitas como espinha bífida e outros defeitos no tubo neural de fetos. A ingestão de quantidade abaixo de 240 µg folato/dia também está associada ao aumento de risco de partos prematuros e recém-nascidos com baixo peso. A deficiência dessa vitamina também está relacionada ao risco de câncer de cólon, anemia megaloblástica, doenças cardiovasculares ocasionadas por elevados níveis de homocisteína e desordens cerebrais como depressão e mal de Alzheimer (LIMA et al, 2003; LIMA-PALLONE et al., 2008).

Dentre as principais fontes de folatos encontram-se os vegetais, porém, os dados sobre os teores nesses alimentos são bastante conflitantes, isto, devido principalmente a diferentes climas e tipos de solo, além de diferentes técnicas analíticas empregadas (LIMA et al., 2003).

A fortificação de alimentos corresponde ao acréscimo de vitaminas e minerais a alimentos amplamente consumidos, visando garantir a ingestão diária recomendada. É um procedimento eficiente na prevenção da carência de vários micronutrientes (SOEIRO et al., 2008).

A biodisponibilidade pode ser definida como acessibilidade do nutriente ingerido aos processos metabólicos e fisiológicos normais. Ou seja, a eficiência com que um componente da dieta é utilizado sistematicamente através das vias metabólicas. A biodisponibilidade do folato no alimento é geralmente cerca da metade do ácido fólico. Devido a esse fato é aconselhável que as mulheres que pretendem engravidar tenham alimentação rica em folato e principalmente façam a suplementação com ácido fólico (AVANCINI, DELANI e MARCOLINO, 2010).

Muitas pesquisas têm apresentado dados que apontam uma ingestão insuficiente de vários nutrientes por parte da população mundial. Para tentar diminuir esse quadro e

atender as recomendações em relação aos nutrientes, é que tem sido feito o enriquecimento de produtos alimentícios. Produtos lácteos, leite, farinhas, cereais, biscoitos, enfim, produtos com expressivo consumo pela população em geral têm sido os mais utilizados para esse fim. O ácido fólico é a forma mais estável dentre os folatos, sendo a escolhida para o enriquecimento de alimentos (LIMA et al., 2004).

Visando a garantir a ampla cobertura da estratégia de suplementação de ácido fólico à população de gestantes, vários países instituíram a medida da fortificação de alimentos consumidos em larga escala com ácido fólico para a prevenção da ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural. Pesquisa realizada em 45 estados dos Estados Unidos e Washington DC constatou redução de 19% na ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural após a implantação da medida. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA), tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e de milho com 150 mcg/100g de ácido fólico a partir de junho de 2004 (PACHECO et al., 2009).

A análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que geralmente elas se encontram, da presença de inúmeros interferentes, da complexidade da matriz e da exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes. (SANCHO et al, 2010). Dentre os maiores desafios para determinação de vitaminas em alimentos temos, além do melhoramento dos processos de extração, temos o desenvolvimento e a validação de métodos que reduzam, sensivelmente, o tempo gasto para a análise e os custos, e que também possibilitem menor geração de resíduos (ARCOT e SHRESTHA, 2005). A espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis é um método que preenche estes requisitos.

As aplicações da metrologia no controle de qualidade de alimentos são consideráveis para as necessidades humanas de ingerir alimentos que devem ter suas características nutricionais em conformidade com as legislações regulamentadas e livres de componentes indesejáveis. Assim os exames laboratoriais devem ser

conduzidos por métodos que permitam obter resultados confiáveis (GONÇALVES, 2010).

A importância de métodos analíticos apropriados que garantam controle de qualidade em relação aos níveis de enriquecimento de ácido fólico nos produtos é uma preocupação, que deve ser encarada como fator essencial para oferecer a população valores corretos das quantidades desta vitamina nos rótulos dos produtos para benefício da população.

O bom desempenho de uma análise quantitativa depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu desenvolvimento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e a eficiência de determinada análise é estabelecendo os limites destes parâmetros através da validação da técnica analítica quantitativa a ser desenvolvida para o analito de interesse. É importantíssimo que os laboratórios disponham de critérios objetivos demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio praticados conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (RIBEIRO et al., 2008).

A validação de um método se inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao decorrer do seu desenvolvimento. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (VALDERRAMA et al., 2009; Codex Alimentarius, 1995; ICH 1995; BRASIL, 2003; EC, 2000; EURACHEM 1998; THOMPSON, et al, 2002; SHABIR, 2003; USP, 1999; INMETRO 2011).

A validação de um método analítico é definida como o processo pelo qual é estabelecida, por estudos laboratoriais, que as características de eficiência do método correspondem aos requerimentos necessários à aplicação analítica desejada (SIQUEIRA-MOURA et al., 2008).

Tendo em vista o grande número de métodos espectrofotométricos utilizados na rotina de laboratórios de controle de qualidade devido à facilidade, economia e rapidez

dessa técnica, o presente trabalho tem por objetivo validar um método analítico por espectrofotometria no UV para quantificação de ácido fólico.

2.1 - O Ácido Fólico

O ácido fólico é a vitamina B₉ do complexo B, abundante nas folhas verdes (daí o nome *fólico*). Folatos são os compostos que têm atividade vitamínica similar a do ácido pteroilglutâmico (fólico) e é a forma da vitamina naturalmente encontrada nos alimentos. Ácido fólico é a forma sintética do folato, encontrada em suplementos vitamínicos e alimentos fortificados (NASSER et al., 2005).

Lucy Wills, em 1931, encontrou o Ácido Fólico em extrato de leveduras e demonstrou ser eficiente no tratamento da anemia macrocítica tropical em mulheres indianas em fase final da gestação. Mais tarde, essa vitamina passou a ser chamada de ácido fólico pelo fato de ter sido isolada das folhas de espinafre (UEHARA, ROSA, 2010).

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₉ ou vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de L-glutamato ligados ao grupo *p*-aminobenzoico por ligações peptídicas, conhecidos como folatos. Folato é um termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico (FACCO et al., 2007).

Folatos são geralmente consideradas como vitaminas solúveis em água, pertencente ao grupo de vitaminas do complexo B. Como os folatos são sintetizados apenas por microorganismos e plantas, os seres humanos dependem de uma variedade de fontes alimentares para a vitamina, que incluem fígado, verduras verdes escuras, legumes, feijão e germen de trigo. Naturalmente os folatos da dieta consistem de um anel pteridina bem como uma cadeia do polipeptídeo poliglutamato que é

hidrolisado no lúmen intestinal por enzimas poliglutamato hidrolases antes do seu transporte através da mucosa intestinal. Os folatos facilitam a transferência de uma unidade de um carbono a partir de moléculas de doadores em importantes vias biossintéticas. Tais reações são essenciais para a síntese das purinas, adenina e guanina, bem como pirimidina a timina, que estão presentes nos ácidos nucleicos. Além disso, o folato está diretamente envolvido no metabolismo de certos aminoácidos, incluindo a biossíntese de metionina, e interconversão de serina a glicina (HAU, 2008).

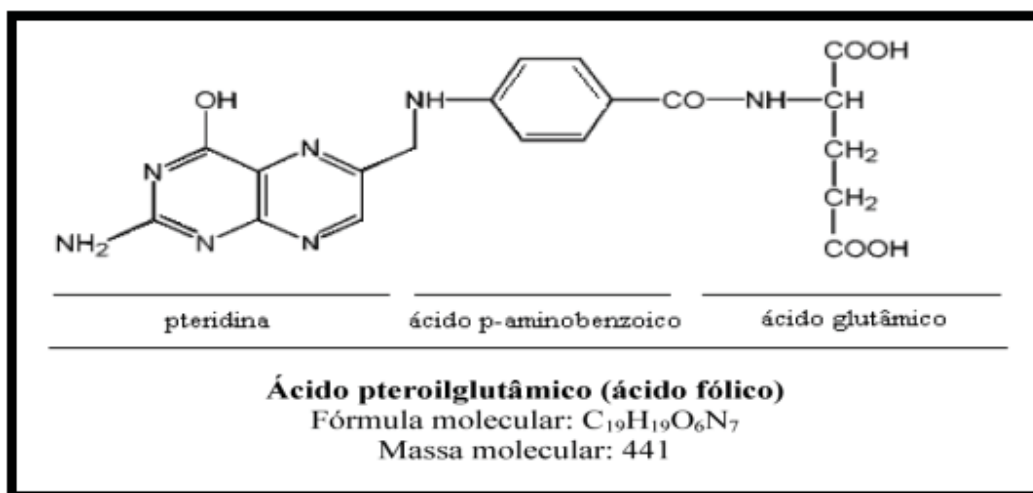


Figura 1. Estrutura do ácido fólico.

Os folatos atuam como coenzima no metabolismo de aminoácidos (glicina) e síntese de purinas e pirimidinas, síntese de ácidos nucleicos, DNA e RNA e são vitais para a divisão celular e síntese proteica. Conseqüentemente sua carência pode ocasionar alterações na síntese de DNA e alterações cromossômicas. A síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas é aumentada durante a embriogênese e no rápido crescimento fetal, diante disto, as necessidades de folatos maternos aumentam dramaticamente durante a gravidez, ou seja, esta vitamina tem um papel fundamental na multiplicação celular, sendo, portanto, imprescindível durante a gestação. Os folatos influenciam no aumento dos eritrócitos, no alargamento do útero e no crescimento da placenta e do feto. Os folatos são também requisitos para o crescimento normal, na

fase reprodutiva (gestação e lactação) e na formação de anticorpos (SANTOS et al., 2007, HAU, 2008).

O ácido fólico, a exemplo de todas as outras vitaminas, é necessário em pequenas quantidades. Porém, parte da população apresenta deficiência desse nutriente. Há muitas causas que levam a esse quadro em seres humanos, incluindo ingestão inadequada, absorção e metabolismo deficientes e demanda aumentada, principalmente nos períodos de gestação, lactação e crescimento. A principal causa tem sido apontada como sendo a ingestão insuficiente. Para tentar amenizar esse quadro, é recomendável a ingestão de alimentos ricos nessa vitamina (PACHECO et al., 2009).

O folato é sintetizado por microorganismos e plantas superiores, mas não por mamíferos, para os quais é um nutriente essencial, necessitando ser ingerido por meio da dieta. A recomendação dietética diária de folato para homens adultos é de 200 µg, mulheres adultas de 180 µg, gestantes de 400 µg e nutrízes de 280 µg (MELO, 2004).

As principais fontes alimentares de folatos são espinafre, feijão branco, aspargos, verduras de folhas escuras, couve de bruxelas, soja e derivados, laranja, melão, maçã, brócolis, vísceras, gema de ovo, fígado, peixes, gérmen de trigo, salsinha, beterraba crua, amendoim, mas em quantidades insuficientes para suprir as necessidades da mulher que deseja engravidar ou que esteja grávida (NASSER, et al 2005). Outros exemplos de alimentos fontes de folatos são: abacate, abóbora, batata, carne bovina, carne suína, levedo de cerveja, cenoura, milho e queijo. A vitamina B₉ não é estável ao calor e por isso o processamento de alimentos a temperaturas elevadas resulta em perdas consideráveis de folatos; a cocção dos alimentos reduz bastante o seu teor (SANTOS et al., 2007). Enquanto o ácido fólico sintético é altamente estável, sabe-se que vegetais verde-escuros e legumes perdem de 50-89% de folato após o cozimento (SHELKE, KEITH, 2011).

A quantidade média de folato encontrada em alguns alimentos está destacada na tabela abaixo, destacando as folhas verdes escuras e a laranja como fontes de folato.

Tabela 1 : Quantidade média de folato.

Quantidade de folato em µg/100g	
Fígado de galinha cru	590
Farelo de trigo	260
Espinafre cozido	140
Brócolis cozido	110
Farinha de aveia	60
Laranja	37

Fonte: (RGNutri, 2008-2010).

O alcance dos requerimentos de folatos por meio da dieta balanceada, sem a inclusão de alimentos fortificados e suplementos, é muito difícil. A dificuldade aumenta devido à menor biodisponibilidade do ácido fólico nos alimentos e à baixa ingestão dietética de fontes desta vitamina por alguns indivíduos. A dieta dos brasileiros no geral tende a ser rica em açúcares e pobre em frutas e hortaliças (NASSER et al., 2005).

Num estudo com 89 adolescentes brasileiros, sendo n= 53 (59,6%) do sexo feminino e n= 36 (40,4%) do sexo masculino e média de idade $17,6 \pm 0,9$ anos foi estimada a prevalência de inadequação da ingestão de folatos e das vitaminas B6 e B12, através de análises das concentrações séricas destas vitaminas, além de descrever quais alimentos contribuem mais para a ingestão dessas vitaminas em uma amostra de adolescentes saudáveis após a fortificação mandatória de farinhas com ácido fólico. A prevalência de inadequação da ingestão de folatos, B6 e B12 foi de 15,2, 10,2 e < 1%, respectivamente. Os alimentos que mais contribuíram para a ingestão do folatos foram o pão francês, macarrão e feijões (STELUTI et al., 2011).

O ácido fólico presente nos alimentos está sob a forma de poliglutamato, que deve ser convertido em monoglutamato antes de ser absorvido. Por sua vez, ele na forma de suplemento medicamentoso, é mais estável e se encontra na forma de monoglutamato, rapidamente absorvida. A absorção intestinal do ácido fólico da dieta é

de 60%, enquanto nos suplementos ou alimentos enriquecidos é de 98% (UEHARA, ROSA, 2010).

O ácido fólico para ser biologicamente ativo necessita sofrer redução “in vivo” passando pelas formas intermediárias de dihidrofolato e tetrahidrofolato, pela adição de átomos de hidrogênio nas posições 7,8 e 5,6,7,8, respectivamente. Pode ainda ligar unidades de carbono, que inclui grupos metil (CH₃), metileno (CH₂), formil (-CHO-) ou formimino (-CHNH-) nas posições N5, N10 ou N5, 10 conferindo ao folato a função de coenzima, em diferentes sistemas enzimáticos, como carreador dessas unidades de carbono em diferentes graus de oxidação. Os folatos não somente são modificados por redução, mas também pela ligação de resíduos de ácido glutâmico (glutamatos) por ligação carboxil, podendo o folato apresentar até 12 resíduos de glutamatos. Porém, a maioria dos folatos intracelulares é predominante o penta ou hexaglutamato, enquanto que o folato extracelular se encontra na forma de monoglutamato (MELO, 2004).

A metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) está relacionada com o controle da expressão gênica e manutenção da conformação e integridade dos cromossomos. As reações de metilação também previnem o aumento das concentrações plasmáticas da homocisteína, considerada um marcador das doenças cardiovasculares (UEHARA, ROSA, 2010).

Na molécula de DNA a metilação consiste na adição de um grupamento metil na citosina que geralmente precede a base nitrogenada guanina (dinucleotídeo CpG), e que está presente principalmente em regiões promotoras dos genes. A metilação de DNA participa da estabilização e manutenção da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma, recombinação durante a meiose, controle da replicação, controle de DNAs exógenos que podem se inserir no genoma humano (ex.: DNA viral), regulação da diferenciação celular e inativação do cromossomo X, entre outras funções (OLIVEIRA et al., 2010).

Nos últimos anos têm aumentado as evidências da relação entre a deficiência de folatos e o risco de defeitos no desenvolvimento de fetos, durante a gestação, doenças cardíacas, certas formas de tumores e mal de Alzheimer's, entre outras. A fim de se

prevenir essas doenças, as dietas recomendadas estão baseadas também em estudos referentes às quantidades de folatos em alimentos (LIMA et al., 2003).

O folato atua como coenzima em várias reações celulares fundamentais e é necessário na divisão celular devido ao seu papel na biossíntese de purinas e pirimidinas, e, conseqüentemente, na formação do RNA e do DNA. Em geral, o crescimento rápido e as multiplicações celulares decorrentes do desenvolvimento fetal, requerem um suprimento maior de folato. Além disso, o folato é essencial para formação das hemácias e leucócitos na medula óssea e para sua maturação. Serve como carreador de carbono isolado na formação do grupo heme (BUENO, CZEPIELEWSKI, 2007; OBICAN et al., 2010).

Em 1991, um grupo de pesquisa sobre vitaminas, formado por 33 centros médicos em sete países (Grã-Bretanha, Hungria, Israel, Austrália, Canadá, Rússia e França) demonstrou que a ingestão de ácido fólico previne o aparecimento de defeitos neurais em mulheres grávidas (MARTINS, 2011).

A carência de folatos causa a anemia megaloblástica estimulando as hemácias a aumentarem de tamanho devido à diminuição na síntese de DNA e aumenta a ocorrência de deficiências na formação do tubo neural, que são defeitos congênitos decorrentes do desenvolvimento incompleto da medula espinhal ou do cérebro. Ensaios clínicos randomizados e outros estudos científicos apontam para a importância do uso desta vitamina nos períodos anterior e posterior à concepção na prevenção de doenças do tubo neural, como a espinha bífida e a anencefalia. Deste modo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) orienta que todas as mulheres em idade reprodutiva aumentem o consumo desta vitamina (SANCHO et al., 2010).

Em 2005, a Associação Brasileira de Epilepsia (ABE) realizou pesquisa com o objetivo de avaliar o grau de conhecimento das mulheres gestantes e não gestantes sobre o ácido fólico. Os resultados da pesquisa que contemplou 90 mulheres não gestantes revelaram que 42% (n=38) já tinham ouvido falar sobre o ácido fólico; 21% (n=19) sabiam da importância do ácido fólico, mas apenas 10% (n=9) receberam essa informação pelo médico. Entre as 32 gestantes entrevistadas 34% (n=11) comentaram

com o médico que pretendiam engravidar; não se preocupavam com sua alimentação; 17 (53%) não obtiveram informação pelo médico sobre os benefícios desta vitamina às gestantes e 37,5% (n=12) não tomaram ácido fólico, sendo que uma estava gerando um bebê com malformação no tubo neural (NASSER et al, 2005).

A estratégia de estimular o consumo de ácido fólico no período periconcepcional tem objetivo de prevenção da má formação congênita é devido ao fato que 50% das gestações não são planejadas e ao consumo insuficiente de fontes ricas em folato. Isto justifica a necessidade de atividades voltadas para a conscientização da população sobre a necessidade de ingerir folato e quando for preciso, ácido fólico. Preconiza-se uma divulgação sobre a relevância da fortificação alimentar, a orientação dietética adequada e o fornecimento suplementos com ácido fólico. (AVANCINI, DELANI e MARCOLINO, 2010).

A OMS também recomenda a ingestão diária de 0,4 mg de ácido fólico para todas as mulheres em idade fértil devido ao grande número de gestações não-planejadas. Isso pode ser obtido por utilização de suplementos de ácido fólico, seleção de alimentos ricos em folato ou consumo de alimentos fortificados, sendo que este último mostrou ser a maneira mais efetiva. Alimentos como farinha de trigo e de milho, leite, pão, centeio e suco de laranja demonstraram boa biodisponibilidade e estimularam aumento dos níveis desta vitamina em plasma e eritrócitos, conseguindo chegar aos níveis preconizados pela OMS (LIMA, 2009).

Países como Canadá, China, Estados Unidos, Costa Rica, Chile e Argentina, que adotaram a política de fortificação alimentar com ácido fólico identificaram queda acentuada na incidência de defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN). A fortificação com ácido fólico para reduzir o DFTN é considerada uma das mais bem sucedidas iniciativas de saúde pública nos últimos 50-75 anos. Estudos realizados nos Estados Unidos, mostraram reduções de 19% a 32% na prevalência de DFTN desde a implementação da fortificação com ácido fólico em 1998. (CRIDER, BAILEY, BERRY, 2011). No Brasil, por meio de uma resolução do Ministério da Saúde, tornou-se

obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com 1,5 mg/kg de ácido fólico a partir de 1º de julho de 2004 (LIMA, 2009).

Nenhuma outra intervenção nutricional realizada com o objetivo de prevenir doenças teve o impacto positivo como a suplementação de ácido fólico no período gestacional (CABRAL, CABRAL e BRANDÃO, 2011).

Na prática profissional, para diminuir a prevalência de DFTN é importante incentivar o uso do ácido fólico entre as mulheres em idade fértil, porém para tanto, o suplemento precisa estar disponível na rede pública de saúde (O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza ácido fólico às gestantes). Ademais, os profissionais da atenção primária precisam ter consciência sobre o efeito protetor do ácido fólico e sobre a necessidade de suplementação diária com ácido fólico antes da gravidez e no primeiro trimestre da gestação. Nesse sentido, em todos os contatos com mulheres em idade fértil, há a oportunidade para informa-las sobre os efeitos protetores da dieta rica em folatos, oferecendo-lhes informação sobre alimentos ricos nesta vitamina e também a importância da suplementação medicamentosa preventiva, pelo menos um mês antes da concepção e nos três meses após a concepção (BALDINO, 2011).

O tetraidrofolato juntamente com a vitamina B₁₂ é necessário para a conversão de homocisteína a metionina. Esta reação é de extrema importância para o sistema cardiovascular, dado que a hiperhomocisteinemia pode causar lesões nos vasos sanguíneos, pois o alto nível desta no sangue pode aumentar a agregação de plaquetas, podendo levar à trombose e também a aterosclerose (LIMA et al, 2003; FACCO et al., 2007).

Devido à importância dos folatos, existe a necessidade do desenvolvimento e otimização de métodos mais confiáveis de suas quantificações. A análise de folatos não é fácil devido as suas múltiplas formas, baixa estabilidade, presença em pequenas concentrações nos sistemas biológicos, e complexas técnicas de extração e de detecção. O desenvolvimento de mais métodos precisos de análise do folato em alimentos é necessário para avaliar a composição nutricional e também para o controle

de qualidade dos alimentos, no intuito de confirmar que as informações prestadas na rotulagem nutricional estão corretas (ARCOT, SHRESTHA, 2005).

2.2 Quantificação de ácido fólico

Na literatura, os folatos/ácido fólico são quantificados por ensaios bioespecíficos microbiológicos, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectrofotometria UV-Vis (CATHARINO et al., 2006; ARCOT ;SHRESTHA, 2005).

O ensaio microbiológico é reconhecido como método de determinação de ácido fólico/folatos pela Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) e pela Associação Americana dos Analistas de Cereais (AACC). Este ensaio é baseado no fato do folato estimular o crescimento de microorganismos lácticos, especialmente o *Lactobacillus casei* (*L. casei*) subsp. *Rhamnosus*. Esta bactéria tem sido a mais utilizada na determinação de ácido fólico nos alimentos, devido à sua resposta a formas de folato mono, di e triglutamato. A análise microbiológica de folato é aplicável a maioria dos alimentos e a suplementos vitaminínicos como se estima que 75% de ocorrência natural de folatos são poliglutamatos, os quais requerem hidrólise enzimática para detecção de folatos (HAU, 2008)

2.3 Teores de ácido fólico em farinhas fortificadas

A nutrição inadequada é um problema que gera sérias implicações econômicas e à saúde. A fortificação é uma das principais estratégias empregadas para minimizar inadequações nutricionais. É uma prática feita desde a metade do século XX e tem como objetivo reforçar o valor nutritivo e prevenir ou corrigir deficiências de um ou vários nutrientes (SOEIRO et al, 2010; ALABURDA, SHUNDO, 2007).

As políticas governamentais em saúde devem ser direcionadas para as medidas preventivas, como por exemplo, o enriquecimento (fortificação) das farinhas de trigo e milho com ácido fólico (NETO, 2011). A fortificação de alimentos corresponde à adição de vitaminas e minerais a alimentos amplamente consumidos, visando garantir a ingestão diária recomendada. (SOEIRO et al., 2010).

Em março de 1996, a FDA (Agência Norte Americana de Alimentos e Medicamentos) determinou que até 01 de janeiro de 1998, todos os produtos feitos a partir de farinhas de grãos de cereais enriquecidos deveriam ser enriquecidos com 140 µg de ácido fólico em 100 gramas de farinha para evitar a DFNT. Até 2009, 59 países haviam documentado regulamentos nacionais para a fortificação obrigatória de farinha de trigo, 51 dos quais fortificam com ácido fólico. Uma proporção de folato é perdida durante a preparação de alimentos, como resultado de uma combinação de degradação térmica e lixiviação da vitamina na água. A retenção de ácido fólico em cereais tem sido examinada, e ocorre pouca ou nenhuma perda ocorre durante o armazenamento de até seis meses na temperatura ambiente. Da mesma forma, a estabilidade do ácido fólico durante o assar do pão e no armazenamento da farinha fortificada tende a ser elevada (BERRY et al., 2010).

O enriquecimento dos alimentos com ácido fólico é uma estratégia para aumentar os níveis de folatos, tendo a vantagem de alcançar uma ampla parte da população, sem a necessidade de mudar os hábitos alimentares. Alguns estudos têm demonstrado que o enriquecimento dos alimentos pode ser a forma mais eficaz devido ao seu baixíssimo custo, menos que 0,1 % do custo da farinha, quando comparado às mudanças nas dietas (ALABURDA, SHUNDO, 2007).

O objetivo da pesquisa desenvolvida por Neto (2011) foi avaliar o teor de ácido fólico presente na farinha de trigo enriquecida. Foi adquirido 30 pacotes de farinha de trigo de 10 marcas, sendo 3 lotes diferentes por marca e as quantificações feitas em duplicata, ou seja, seis medições de cada marca.

As médias do teor de ácido fólico de oito marcas ficaram entre $376,06 \pm 61,00$ e $1074,58 \pm 102,56$ µg/kg). Duas marcas testadas apresentaram o teor de ácido fólico

acima do valor recomendável 1500 µg/kg ($2212,20 \pm 671,38$ e $2549,00 \pm 588,27$ µg/kg). Portanto houve grande variabilidade nos resultados, o que indica possivelmente baixa eficiência de seus métodos de enriquecimento e um sistema precário de monitoramento ou controle do processo na produção de farinha de trigo. Pode-se perceber uma grande variabilidade no teor de ácido fólico entre os diferentes lotes analisados de mesma marca. Apenas duas marcas não apresentam diferenças estatísticas entre os lotes testados. Nas demais marcas todos os lotes diferem estatisticamente entre si, por exemplo, as concentrações de ácido fólico encontradas nos lotes de uma dada marca foram em µg/kg $524,05 \pm 23,26$, $385,30 \pm 12,16$ e $1027,50 \pm 48,6$ µg/kg. Isto demonstra uma ineficiência do processo de fortificação na fabricação da farinha de trigo (NETO, 2011).

Diante da grande variabilidade entre os diferentes lotes, pode-se inferir que o sistema de homogeneização do mix na farinha está inadequado. Um bom processo de produção de alimentos deve apresentar menor variabilidade possível nas quantias dos ingredientes entre os lotes e as quantias devem estar em níveis adequados aos padronizados, como é o caso da fortificação com ácido fólico, e somente desta forma atinge os níveis exigidos de qualidade nos resultados da produção (NETO, 2011).

O objetivo do trabalho desenvolvido por Boen et al., (2009) foi avaliar os níveis de ácido fólico e ferro em oito marcas de farinha de trigo e seis de milho enriquecidas, escolhidas de forma arbitrária e divididas em cinco lotes, totalizando 70 amostras. A quantificação indicou que a concentração de ácido fólico variou entre 96 a 558 µg *per* 100 g (na farinha de milho) e 73 a 233 µg *per* 100g (na farinha de trigo). Portanto, a população brasileira parece estar exposta a concentrações inadequadas de ácido fólico quando consomem produtos contendo farinhas de trigo e milho.

Essas observações podem contribuir negativamente na estimativa da confiabilidade do programa de fortificação. A diferença observada no teor de ácido fólico nestas farinhas pode ser explicada devido a problemas durante a adição e homogeneização da vitamina, além de degradação do ácido fólico que pode ocorrer durante o período de armazenagem (BOEN et al., 2009).

Foram avaliadas por Soeiro et al., (2010) 3 diferentes marcas e 5 lotes de farinhas de trigo tipo especial e a mesma quantidade de análises para as farinhas de milho em flocos enriquecidas com ferro e ácido fólico.

O teor da vitamina variou de 75 a 223 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (em média 158 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) para as farinhas de trigo e de 258 a 488 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (em média 324 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) para as farinhas de milho. Esses valores indicam que no caso das farinhas de trigo, a concentração da vitamina foi em média, próxima ao valor estipulado ($150 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \pm 20\%$). Porém no caso das farinhas de milho, o conteúdo de ácido fólico estava em média bem acima (superior ao dobro) do valor estabelecido por lei. Entre as farinhas de trigo avaliadas, constatou-se diferença significativa tanto entre marcas quanto entre lotes. Para as farinhas de milho não se observou diferença significativa entre as marcas, entretanto, entre lotes da mesma marca, constatou-se diferença significativa (SOEIRO et al, 2010).

Outra constatação importante está relacionada ao tipo de embalagem. Foi possível notar que farinhas acondicionadas em embalagens de plástico apresentaram menor quantidade de ácido fólico, quando comparadas às amostras armazenadas em embalagens de papel. Essa constatação se deve, provavelmente, à incidência de luz durante o período de estocagem (SOEIRO et al, 2010).

2.4-Validação de Métodos Analíticos

O controle de qualidade é uma ferramenta imprescindível para a indústria, pois a partir dele pode-se garantir um produto de qualidade. A confiabilidade dos resultados do controle de qualidade de medicamentos, alimentos e contaminantes é alcançada através da validação dos métodos analíticos (BARBOZA et al., 2010).

Na área de análises de alimentos, a validação de métodos está principalmente associada com a segurança alimentar e o comércio internacional. Os resultados provenientes dos métodos de ensaio muitas vezes subsidiam a elaboração de políticas de saúde pública visando o melhoramento da qualidade dos alimentos disponibilizados à população e adequação a legislação de cada país, principalmente do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional (SOUZA, 2007).

É fundamental a comprovação da qualidade de medições químicas, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a prejuízos financeiros. O desenvolvimento de um novo método analítico deve garantir informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra e este deve ser submetido à avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

Milhões de medições analíticas são efetuadas a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo, fornecendo suporte a decisões nos mais diversos segmentos da sociedade. Diante da necessidade de confiabilidade e comparabilidade necessárias nestas medições, uma forte infraestrutura metrológica deve ser implementada, constatando-se a necessidade de dados analíticos mais comparáveis e consistentes, para a eliminação de barreiras técnicas entre os países (LA ROCA et al., 2007; SOUZA, 2007).

Para conseguir esse processo de validação da análise a nível internacional, em que uma vez efetuada a medição esta ser aceita em qualquer país, requisitos legais de certificação e de credenciamento, devem ser elaborados. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade enfatizam a relevância da validação de métodos analíticos e a documentação da validação para a obtenção de resultados confiáveis e adequados das análises (LA ROCA et al., 2007).

A validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método investigado tem capacidade de desempenho consistente. Ela é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de metodologias analíticas. A validação deve garantir, por intermédio de estudos experimentais, que o método analítico atenda às

exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI et al., 2004).

Para registro de novos produtos ou de novas metodologias de análise, os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, estabelecem documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, o órgão que regulamenta a validação de métodos é o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO).

A validação é o estabelecimento de uma evidência documentada que fornece um alto grau de segurança de que um processo específico levará consistentemente a um resultado confiável, ou seja, é o ato de provar, de acordo com princípios das Boas Práticas de Laboratório, que o procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva a resultados próximos ao de referência (INMETRO, 2003).

Segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação de um método deve assegurar, por meio de estudos experimentais, que este atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequadas à análise. (BRASIL, 2003; DUARTE et al., 2009).

De acordo com o INMETRO, as características de desempenho do método de ensaio químico devem estar claramente declaradas no procedimento documentado e incluir: faixa linear de trabalho; linearidade; sensibilidade; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão; precisão e robustez (INMETRO, 2011).

A validação deve ser efetuada após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos de ensaios químicos. É fundamental que os laboratórios disponham de critérios para demonstrar que as metodologias que utilizam conduzem a resultados

confiáveis, com garantia de qualidade, idoneidade e credibilidade de seus produtos e/ou serviços. É importante enfatizar que qualquer alteração de métodos normalizados implica em nova validação do método (SILVA, ALVES, 2010).

Na área de alimentos, como exemplos de validações espectrofotométricas tem-se a análise do teor de beta-caroteno na cenoura (KARNJANAWIPAGUL et al, 2010); carotenoides totais em cereais (LUTEROTTI, KLJAK., 2010) e na margarina (LUTEROTTI et al., 2006); teor de nitritos e nitratos em produtos cárneos (GUERREIRO et al., 2012); quantificação de amido em produtos cárneos (RODRIGUES et al., 2012).

2.4.1 - Parametros de validação

Para validar um método faz-se necessária a aplicação de vários parâmetros. Os parâmetros aplicados neste trabalho foram: Faixa linear de trabalho; Linearidade; Sensibilidade; Limite de detecção; Limite de quantificação; Exatidão; Precisão e Robustez (ICH., 1995; ANVISA, 2003; FDA, 2001).

2.4.1.2 – Linearidade

A linearidade é a habilidade que o método tem de produzir resultados que são diretamente, ou através de transformações matemáticas, proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma faixa de concentração determinada. Este atributo da validação pode ser estabelecido pela avaliação visual de um diagrama de sinais em função da concentração ou conteúdo analisado. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (VALENTINI et al., 2004).

A linearidade de um método pode ser observada através do gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e ser verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de

concentração e a homocedasticidade dos dados, antes de fazer a regressão linear (INMETRO 2011).

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO 2011).

Para obtenção da linearidade foi feita a medida de absorbância em concentrações diferentes de 6 massas pesadas em diferentes momentos para construção da curva de calibração. (INMETRO 2003; NATA, 2012).

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2003). Na construção da curva analítica, para cada massa pesada foi realizada dez leituras em triplicata. Este procedimento foi feito dez vezes, totalizando 300 repetições para cada massa.

2.4.1.3 - Faixa Linear de Trabalho

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigida, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2011; BERNARDES, SOUZA, 2011).

Em qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. Para a determinação dos valores da faixa de trabalho, são utilizados os resultados obtidos dos testes de limites de detecção e de quantificação. A partir dessa faixa é que se determina qual a concentração que pode ser utilizada no método com segurança nas análises quantitativas. Para a faixa linear, considera-se a faixa adequada aquela onde a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto específico, independentemente da matriz da amostra (TENÓRIO, 2007).

Para escolher a faixa de trabalho procede-se da seguinte maneira: quando se tem uma amostra específica, a concentração esperada deve se situar no meio da faixa de trabalho e quando a concentração do analito é desconhecida utiliza-se a faixa de trabalho estudada para amostras diversificadas. Os valores medidos, na repetição para formação das 10 curvas obtidas por massas diferentes, têm que estar dentro da faixa de trabalho, e os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho ter que ser diferente dos brancos dos métodos (ICH, 1995).

2.4.1.4. – Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração (coeficiente angular), e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (ICH., 1995).

2.4.1.5 - Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc) (ICH., 1995).

2.4.1.6 - Limite de Quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Onde o limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRITO et al., 2003).

2.4.1.7 - Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por ele obtido comparado ao valor verdadeiro. Estes resultados são calculados pela diferença entre o valor da concentração considerado como verdadeiro e o valor experimental, obedecendo a intervalos de segurança. A exatidão é verificada quando são obtidos resultados muito próximos em relação ao valor verdadeiro, ela é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (VALENTINI et al, 2004; BRITO et al, 2002 RIBANI et al, 2004).

A exatidão pressupõe que não existem erros sistemáticos inerentes ao processo, enquanto que a precisão reflete a dispersão dos vários resultados individuais do doseamento em relação ao valor médio estando ou não próximo do valor verdadeiro. Porém, os analistas devem ser muito cuidadosos em suas análises, pois existem inúmeros fatores que podem comprometê-las causando erros ocasionais, por exemplo, falhas na calibração de equipamentos, na habilidade e capacitação do analista,

temperatura irregular do laboratório, umidade, componentes da amostra (VALENTINI et al., 2004).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, dentre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais, fortificação e realização de ensaios de recuperação (ICH., 1995).

A exatidão foi determinada por meio da fortificação utilizando comprimidos de ácido fólico. Preparam-se duas soluções: uma solução padrão contendo ácido fólico (A) e solução contendo ácido fólico a partir de comprimidos (B). Alíquotas de ambas soluções foram homogeneizadas para análise da fortificação, contendo o padrão e os comprimidos (C). A fórmula de exatidão utilizada foi a: (concentração experimental obtida/concentração teórica) x 100.

2.4.1.8 – Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados das repetições dos ensaios de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2003).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltipla de uma mesma amostra, onde as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio de repetitividade e reprodutividade expressa pelo desvio padrão. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (KUMAR et al., 2012; ZAGATO, 2009).

Repetitividade é a precisão intra-corrida, ou seja, o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Todas as medições com o mesmo procedimento; mesmo analista; mesma instrumentação, dentro de um curto período de tempo. Reprodutibilidade é a precisão interlaboratorial, ou seja, o grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos (ZAGATO, 2009).

Precisão intermediária é a precisão intercorrida, ou seja, refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes.

2.4.1.9 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações das condições analíticas. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. O método será considerado robusto para tais variações quando a faixa de teor obtido estiver entre 95% a 105% comparando com os resultados obtidos a partir do método sem alteração. A robustez está relacionada com a precisão, e quanto maior for a robustez maior será a confiabilidade do método. (PASCHOAL et al, 2008; TENÓRIO, 2007).

A robustez foi avaliada através da variação na concentração do hidróxido de sódio (0,08, 0,10 e 0,12 N) e foram feitas 20 triplicatas de cada concentração.

2.5 A Espectrofotometria no UV-Visível

Esta técnica é baseada no fenômeno produzido pelas medidas de absorção moleculares em solução. Alguns compostos sofrem transições eletrônicas por ocasião de absorção de energia na região UV-VIS. Uma relação quantitativa entre o fenômeno de absorção e o número de espécies moleculares que sofrem absorção é dada pela lei de Lambert-Beer (FREITAS, 2006).

Quando o feixe de luz num dado comprimento de onda, ou seja, monocromático atravessa uma solução contendo átomos e moléculas, parte desta radiação é absorvida e o restante é transmitida, como demonstrado na figura 3. A radiação absorvida depende da concentração do analito e de sua estrutura absorver energia na forma de luz em maior quantidade no comprimento de onda selecionado. O estudo da interação

entre substâncias e a quantidade de radiação absorvida por elas, denomina-se espectrofotometria de absorção molecular. Esta técnica é utilizada na identificação e quantificação de substâncias (SILVA et al., 2010).

A espectrofotometria visa determinar a concentração de uma substância, em condições bem definidas, pela medida da absorção de luz, tomando como referência a absorção da substância numa concentração conhecida. A principal vantagem desse método é de proporcionar um meio simples para determinar pequenas quantidades de substâncias (SAGIO et al., 2007).

A espectroscopia de absorção no UV-VIS é amplamente utilizada em laboratórios de análises físicas, químicas, bioquímicas, farmacológicas, etc. Inúmeras vantagens contribuem para sua utilização; a principal é o fato de ser uma técnica espectrofotométrica quantitativa. Aliado a isto, a técnica tem baixo custo operacional, é de fácil utilização e produz resultados de interpretação geralmente bastante simples. Em laboratórios analíticos, esta técnica é muito utilizada na quantificação direta de várias moléculas orgânicas e inorgânicas, de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos ou na quantificação indireta de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas, por exemplo, através da interação com indicadores cromogênicos. A espectrofotometria UV-VIS é utilizada na caracterização físico-química de reações químicas e bioquímicas, na elucidação de mecanismos e cinéticas de reações biológicas complexas, na pesquisa de novos agentes farmacológicos e também na investigação de propriedades óptico-eletrônicas de novos materiais (GALO, COLOMBO., 2009; SAGIO et al., 2007).

A radiação numa faixa de comprimento de onda de 200-800 nm é passada através de uma solução contendo o analito de interesse. Os elétrons das ligações são excitados e ocupam um estado quântico superior, absorvendo um pouco de energia que passa pela solução. A absorção depende da estrutura eletrônica da molécula e do comprimento de onda da radiação. As transições dos elétrons podem ocorrer a partir de estados de vibração e de rotação de um nível de energia eletrônica para um entre diversos estados de vibração ou de rotação de níveis mais elevados. A transição de um elétron entre diferentes níveis energéticos é chamada de —transição eletrônica e o

processo de absorção é denominado —absorção eletrônica. O termo cromóforo é usado para descrever qualquer estrutura característica que absorve radiação na região do UV-Vis e inclui grupos nos quais são possíveis as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$. A absorção da radiação na região do ultravioleta é atribuída a transições dos elétrons π de orbitais ligantes para antiligantes, ou seja, transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (PIANTAVINI, 2010). A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, e a região do visível entre 400 a 800 nm.

O espectro de absorção pode ser definido como a curva obtida quando a absorbância de uma espécie absorvente é traçada em função do comprimento de onda da espécie absorvente. Nas quantificações os solutos são quantificados baseados geralmente no comprimento de onda de máxima absorção (FREITAS, 2006).

A partir da leitura dos valores de absorbância, de soluções padrões de concentrações conhecidas, obtém-se a curva padrão ou curva de calibração (diagrama de calibração). Com esta curva, pode-se determinar a concentração de uma determinada substância presente em uma dada amostra (SAGIO et al., 2007).

Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução que contém uma espécie absorvente, uma parte da energia radiante é absorvida. A partir disto estabelece-se uma relação entre a absorbância ou transmitância com a concentração do analito (FREITAS, 2006).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde A é a absorbância ou absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absortividade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a

distância percorrida pelo feixe através da amostra (ALVES et al., 2010; ROCHA, TEIXEIRA, 2004).

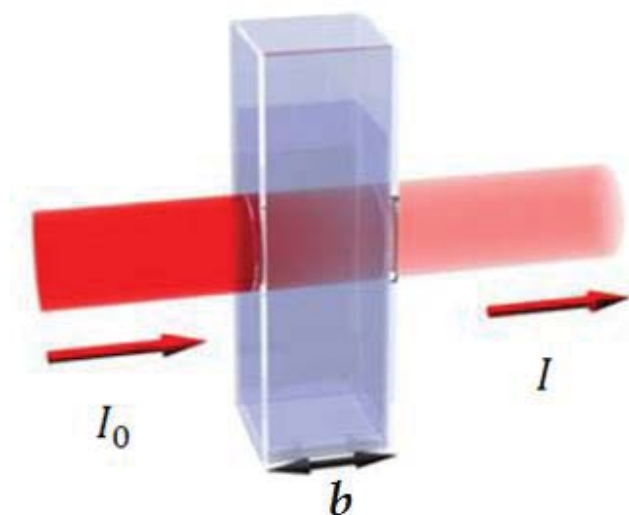


Figura 2: Esquema representativo da absorção de um feixe de luz monocromática a atravessar a cubeta.

Fonte: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/20639/1/Valida%C3%A7%C3%A3o%20de%20um%20M%C3%A9todo%20Anal%C3%ADtico.pdf>

Para a determinação espectrofotométrica de analitos na região UV-VIS, é necessário o uso de reagentes para a conversão da espécie de interesse em uma forma mais estável que permita a medida de absorção de radiação com maior sensibilidade e/ou seletividade. Sendo assim, solutos que absorvem fracamente podem ser convertidos em compostos com maior absorvidade molar, visando à determinação de menores quantidades do analito. (ROCHA, TEIXEIRA, 2004). O emprego de reagentes específicos para uma completa caracterização de uma amostra, ou seja, a determinação qualitativa e quantitativa de cada constituinte de uma amostra é uma tarefa muito laboriosa ao se usar a espectrometria UV-VIS (FREITAS, 2006).

A maioria dos métodos descritos na literatura envolve separações químicas e físicas. Dentre esses métodos, inclui-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar

As principais desvantagens destes métodos consistem em um relativo alto custo, emprego de reagentes tóxicos e, em muitos casos, um grande consumo de tempo para a execução das análises (BARTHUS et al., 2007).

A espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABURDA J, SHUNDO L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, n. 662, p. 95-102, 2007.

ALVES, L. D.S. ; ROLIM, L. A. ; FONTES, D. A. F. ; ROLIM-NETO, P.J. ; SOARES, M. F. L. R. ; SOARES-SOBRINHO, J. L. . Desenvolvimento de método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Quím Nova**, v. 33, p. 1967-1972, 2010.

ARCOT J, SHRESTHA A. Folate: methods of analysis.Trends. **Food Sci. Technol.** 16: 3, p.253–266, 2005.

ARCOT J, S. A. Folate: methods of analysis.Trends. **Food Sci. Technol.** v.16, p.253–266, 2005.

AVANCINI, C.A.; DELANI, T.C.O.; APARECIDA,V. A importância do ácido fólico na prevenção da malformação congênita. **UNINGÁ Review**, v.4, n. 02, p. 37-45, 2010.

BALDINO, C.F. **Prevalência de defeitos do tubo neural no estado de São Paulo antes e após a fortificação das farinhas com ácido fólico**. 65f, 2011. Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências, 2011.

BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; PEREIRA, A. V.; STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Quím. Nova**, v.33, n.3, p. 747-749, 2010.

BARI, S.B; JAIN, P. S.; SATHE, S. R; BAKHSHI, A.R. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of atenolol and hydrochlorothiazide in bulk and tablets. **J Global Pharma Tech**,v. 3, n.5, p.11-15, 2011.

BARTHUS, R.C.; MAZO, L.H.; POPPI, R. J. Aplicação de métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP). **Quím. Nova**, v. 30, n. 7, p. 1638-1643, 2007.

BHATTI, M.K.; HAYAT ,M.M.; NASIR,R.; NASIM, FAIZ-UL-HASSAN.; ASHRAF,M.; HUSSAIN,B.; AHMAD, I. Development and Validation of Spectrophotometric Method for the Determination of Nimesulide in Bulk and Tablet Dosage Forms by Biuret Reagent Method. **J.Chem.Soc.Pak**, v.34, n.3, p.713-716, 2012.

BERNARDES, A.C.M; SOUZA, S.V.C. Análise comparativa do guia para validação de Métodos analíticos proposto pela ANVISA (re nº 899 De 2003) com o documento orientativo do inmetro e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC internacional, ISO e IUPAC. **Revista Analytica**. n 51, p 66-76, 2011.

BERRY R.J.; BAILEY L.; MULINARE J.; BOWER C. Fortification of flour with folic acid. **Food Nutr Bull** ,v.31, supplement, p.22-35, 2010.

BOEN T.R.; SOEIRO B.T.; PEREIRA FILHO E.R.; LIMA-PALLONE J.A. Folic acid and iron evaluation in Brazilian enriched corn and wheat flours. **J Braz Chem Soc**; v.19 n.1, p.53-59, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de Junho de 2003.

BRITO N.M., AMARANTE JÚNIOR O.P., POLESE L., RIBEIRO ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**, v.13, p.129-146, 2003.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P.; POLESE, L.; SANTOS, T.C.R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p. 155-166, 2002.

BUENO A.L., CZEPIELEWSKI, M.A. Micronutrientes envolvidos no crescimento. **Rev HCPA**, v.27, n.2, p. 47-56, 2007.

CABRAL, A. C. V. ; CABRAL, M. A. ; BRANDÃO A . Prevenção dos defeitos de tubo neural com o uso periconcepcional do ácido fólico. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n.2, p. 58-61, 2011.

CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T.; LIMA-PALLONE, J.A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Quím. Nova**, v. 29, n.5, p. 972-976, 2006.

Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling; *Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes*, CX/MAS 95/3, 1995.

CRIDER, K.S.; BAILEY, L.B.;BERRY, R.J. Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions. **Nutrients**, v.3, p.370-384, 2011.

DUARTE, L.T.; SILVA, E.M.; SOUZA,A.; LOPES, E.F.; MORAIS, H.F.; BARA, M.T.F. Desenvolvimento e validação de metodologia espectrofotométrica para doseamento de furosemida matéria-prima. **Rev Eletr Farm**, v.4, n.2, p. 78-81, 2007.

Eurachem Working Group; The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.

FACCO, E.M.P.; FOGAÇA, A.O.; DAUDT, C.E.; GODOY, H.T. Quantificação de 5-metil-tetrahydrofolato no processamento e conservação de vinhos de uvas viníferas e híbridas. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v.27, n.4, p. 787-792, 2007.

FAVORETTO, L.B., SOUZA, J.M.O.; BONFILIO, R.; AZEVEDO, R.C.P.; ARAÚJO, M.B. Validação de método espectrofotométrico na região do UV para quantificação de famotidina em cápsulas. **Quím. Nova**, v.33, n.7, p. 1585-1589, 2010.

FERREIRA, C.H.A. ; COLOMBO, R. Validação de Método e Determinação Espectrométrica dos flavonoides das folhas e do vinhoto da cana-de-açúcar e comparação com método CLAE-UV. **Quím Nova**. v. 34, p. 1651-1655, 2011.

FREITAS, S.K.B. **Uma Metodologia para Screening Analysis de Sucos Cítricos Utilizando um Analisador Automático Fluxo-Batelada, Espectrometria UV-VIS e Técnicas Quimiométricas**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, 2006.

GALO, A. L. ; COLOMBO, M. F. . Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Quím Nova**, v. 32, p. 488-492, 2009.

GONÇALVES, G.S. **Atributos da validação do método analítico para quantificação da biotina empregando a técnica potenciométrica**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2010.

GUERREIRO, R.S; SÁ, M.S; RODRIGUES, L. A. P. Avaliação do teor de nitrito e nitrato em alimentos cárneos comercializados em Salvador. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 5, n. 1, p. 77-91, fev. 2012.

HAU, R. The analysis and stability of microencapsulated folic acid during the processing and preparation of instant Asian noodles. PhD thesis, RMIT University: Melbourne. 204 p, 2008.

International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology*, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 36p, 2003.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04, 20p, JUL/2011.

KARNJANAWIPAGUL, W.P.; NITTAYANUNTAWECH, P. ROJSANGA AND L. SUNTORNSUK . Analysis of beta-Carotene in Carrot by Spectrophotometry. Mahidol University **J of Pharm Sci**; v.37 n.1, p. 8-16, 2010.

KIRTANIA K.; AHMED, S.; SULTANA, N.; HOSSAIN, M.Z.; RAHMAN, M.M. Study on serum vitamin b12 and folic acid in patients of ischaemic stroke. **J Dhaka Med Coll**, v.19, n.2 , p.115-117, 2010.

KUMAR, A.; KISHORE,L.; KAUR,N.; NAIR, A. Method development and validation: Skills and tricks, v. 3 n. 1 , p.1-9, 2012.

LA ROCA, M.F.; SOARES SOBRINHO, J.L.; NUNES, L.C.C.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

LIMA, G.A.; GUTIERREZ, C.M.; YANAGUITA, M.Y.; RIBEIRO, C.M.N.; MACHADO, H.R.M; PERES, L.C. Sacarose como veículo de suplementação dietética de ácido fólico em camundongos prenhes. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.45, n.1, p. 25-30, 2009.

LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Folatos em vegetais: importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.14, n.1, p.123-129, 2003.

LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos – estudo da vida-de-prateleira. **Ciênc. Tecnol. Alim.**,Campinas, n. 24, v. 1, p.82-87, 2004.

LIMA, I. A.; REIS, R. R.; MELO, E. B. Desenvolvimento e validação de método seguro e ambientalmente adequado para quantificação de atenolol em matéria prima e comprimidos. **Biosci. J**, v. 28, n. 3, p. 484-493, 2012.

LIMA-PALLONE, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Quím. Nova**, v.31, n.3, p.530-535, 2008.

LOS WEINERT, P.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1112-1116, 2008.

LUTEROTTI S, BICANIC D, POŽGAJ R. New simple spectrophotometric assay of total carotenes in margarines. **Anal Chim Acta**, v.573–574, p.466–473, 2006.

MARTINS, J. M. Considerations on the food fortification policy in Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemote.**, v.33, n.2, p.158-163, 2011.

MELO, G.J.O. A importância do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário e seu papel protetor de ocorrência de gestações afetadas pelos defeitos do tubo neural fetal. **Cadernos Interdisciplinares: Saúde Tecnologia e Questão Social** v.1, p. 1-20, 2004.

MISHRA, A.K; KUMAR, M; MISHRA, A; VERMA, A; CHATTOPADHYAY P. Validated UV spectroscopic method for estimation of Salbutamol from tablet formulations. **Arch Appl Sci Res**, v.2, p.207-211, 2010.

MORO, A. M ; GROTO, D. ; BULCÃO, R. ; POMBLUM, V. ; NASCIMENTO, D. B. ; CARVALHO, L. O. ; CARVALHO, L. M. ; OLIVEIRA, S. M. R. ; GARCIA, S. C. . Quantificação laboratorial de cobre sérico por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, p. 251-256, 2007.

NASSER C., NOBRE C., MESQUITA S., RUIZ J.G., CARLOS H.R., PROUVOT, L. Semana da Conscientização Sobre a Importância do Ácido Fólico. **J Epilepsy Clin Neurophysiol** v.1, p.199-203, 2005.

NATA (National Association of Testing Authorities).**Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. 32f, 2012.

NETO, F.S.S. **Avaliação do processo de enriquecimento de farinha de trigo com apoio do controle de processos**. 2011. 58f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção)- Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011.

OBICAN S.G., FINNELL R.H., MILLS J.L., SHAW G.M., SCIALLI A.R. Folic acid in early pregnancy: a public health success story. **FASEB J**, v.24, p.4167–4174, 2010.

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A.C.; ANDIA, D. C.; SOUZA, A. P. Metilação de DNA e Câncer. **Rev Bras de Cancerol**, v. 56, n.4, p. 493-499, 2010.

PACHECO, S.S.; BRAGA, C; SOUZA, A.; FIGUEIROA, J.F. Efeito da fortificação alimentar com ácido fólico na prevalência de defeitos do tubo neural. **Rev. Saúde Pública**, v.43, n.4, p. 565-571, 2009.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos **Quim. Nova** v.31, n.5, p. 1190-1998, 2008.

PEREIRA, A; SCHESCHOWITSCH, K. ; SILVA, M. A. S; STULZER, H. K. . Validação de metodologia analítica para quantificação de piroxicam em cápsulas de gelatina por espectrofotometria ultravioleta (UV).. **Visão Acadêmica** , v. 8, p. 29-37, 2008.

PEREIRA, D. M. C.; ARCOS, M. A. S. V.; AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A. Comparação de métodos dicromatométricos para determinação de ferro total em minérios de ferro. **Anais Assoc. Bras. Quím.**, v. 49, n. 4, p. 198-203, 2000.

POLONINI, H.C et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de sinvastatina em cápsulas magistrais. **Quím. Nova**, v. 34, n.3, p. 516-519, 2011.

PROENÇA, K. S.; OLIVEIRA, R. V.; GONCALVES, M. M.; VILA, M. M. D. C. Desenvolvimento de método espectrofotométrico para análise quantitativa em xampus. **Rev Bras de Farm**, v. 88, p. 187-190, 2007.

RIBANI .; BOTTOLI C.B.G.; COLLINS C.H.; JARDIM I.C.S.F.; MELO L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F.A.L., FERREIRA, M.M.C., MORANO, S.C., SILVA, L.R., SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quím Nova**, v.31, n.1, p. 164-171, 2008.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G.. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quím. Nova** . vol.27, n.5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, L.A.P ; MONTEIRO, G.V.T.A ; GUERREIRO, R.S . Validação da Metodologia Analítica para Determinação de Amido em Salsicha. **Analytica**, v. 56, p. 36-36, 2012.

SAGIO, S. **Curvas padrões para determinação de açúcares redutores, açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2007. 37p. (Relatório de Aulas Práticas).

SANCHO, S.O.; MAIA, G.A.; FIGUEIREDO R.W.; RODRIGUES,S.; RABELO, M.C. Avaliação da metodologia microbiológica para determinação de 5-metiltetrahidrofolato em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.30, n.3, p. 635-640, 2010.

SANTOS L.M.P.; PEREIRA M.Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cad Saúde Pública.**; v.23, n.1, p.17-24. 2007

SEBBEN, V.C.; LUGOCH, R.W. ; SCHLINKER,C.S.; ARBO, M. ; VIANNA, R L. Validação da metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.46, n.2. p.143-148. 2010.

SHELKE, N.; KEITH, L. Folic Acid Supplementation for Women of Childbearing Age versus Supplementation for the General Population: A Review of the Known Advantages and Risks. **Int J Family Med**, v. 2011, p.1-4, 2011.

SILVA, G.L.A.; NEVES, L.A.; GONÇALVES, M.A.; BOTELHO, M.C.; PIRES, T.L. **Avaliação da qualidade físico-química de comprimidos industrializados de sertralina 50 mg e de cápsulas magistrais comercializadas na cidade de governador valadares – mg.** 77f, 2010. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE, 2010.

SILVA, A.P.; ALVES, M.C.C. **Como iniciar a validação de métodos analíticos.** São Paulo. ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de– REMESP. 30de maio a 01de junho de 2006, São Paulo, Brasil.

SOEIRO, B. T.; BOEN, T. R.; PEREIRA FILHO, E. R. ; LIMA- PALLONE , J. A. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando análise por componentes principais. **Ciênc Tecnol Alim**, v. 30, p. 618-624, 2010.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação Intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos.** 297f, 2007. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos, 2007.

SREEKANTH, N.; AWEN, B.Z.; RAO, C.H.; RAJU, N.J. A new spectrophotometric method development and validation of sparfloxacin in bulk and pharmaceutical dosage forms by sodium dichromate chromogen. **IJPT**, v.2, n.3, 465-471, 2010.

STELUTI, J.; MARTINI, L.A.; PETERS, B. S. E.; MARCHIONI, D.M. L.. Folato, B6 e B12 na adolescência: níveis séricos, prevalência de inadequação de ingestão e alimentos contribuintes. **J. Pediatr.** , v.87, n.1, p. 43-49, 2011.

TENÓRIO, R. **Documentação de Validação de Metodologia Analítica**. 2007. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2007.

THATTE, A.A.; KADAM, R.J. Development, Validation and Application of UV Spectrophotometric Method for the determination of Oseltamivir phosphate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. **Int.J. Chem Tech Res**, v.3, n.2, p.569-573, 2011.

THOMPSON, M.S.; ELLISON, L .R.; AND R WOOD. Harmonised guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem*, v.74, p.835-855, 2002.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Quím. Nova*. v.32, n.5, p. 1278-1287, 2009.

VALENTINI, S.R; SOMMER, W, MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Acta Scientiarum. Health Sciences**,v. 26, n. 2, p. 357-364, 2004

UEHARA, S.K; ROSA, G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. **Rev Nut**, v. 23, n.5, p. 881-894, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION; US PHARMACOPEIA 24, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, 1999.

ZAGATO, N.C.F. **Metrologia em Laboratórios de Universidades: Validação e Verificação de Métodos Analíticos para Análise de Nutrientes em Águas Estuarinas**. 2009. 45f. Monografia de Conclusão de Curso. Monografia apresentada ao Curso de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO DE DOSEAMENTO DO ÁCIDO FÓLICO

Resumo: A carência do ácido fólico é o mais importante fator de risco para os defeitos do tubo neural identificado até hoje. Esta vitamina é fundamental na síntese de ácidos nucleicos dentre outras ações. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar a quantificação do ácido fólico utilizando e espectrofotometria UV-Vis. Os parâmetros de validação avaliados neste trabalho foram: faixa linear de trabalho; linearidade; sensibilidade; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão; precisão e robustez. O método mostrou ser simples, rápido, linear, específico, exato, preciso e robusto podendo ser executado na rotina de um laboratório de controle de qualidade.

Palavras-chave: Ácido fólico, validação, vitaminas.

Abstract: A lack of folic acid is the most important risk factor for neural tube defects. This vitamin is essential for the synthesis of nucleic acids among other actions. The objective of this work was develop and

validate quantification of folic acid using molecular absorption spectrophotometry. The validation parameters evaluated in this study were linear response range, linearity, sensitivity, limit of detection, limit of quantification, exactness, precision and robustness. The method was simple, fast, linear, specific, accurate, precise and robust and can be performed in a routine laboratory quality control.

Keywords: Folic acid, validation, vitamins.

1-Introdução

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₉ ou vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de L-glutamato ligados ao grupo *p*-aminobenzoico por ligações peptídicas, conhecidos como folatos. (FACCO et al., 2007). O ácido fólico é a forma sintética da vitamina que é usado extensivamente para a fortificação de alimentos, bem como suplementos porque é mais estável e proporciona melhor biodisponibilidade do que folato (HAU., 2008).

Os folatos atuam como coenzima na síntese de purinas e pirimidinas, síntese de ácidos nucleicos, DNA e RNA e são vitais para a divisão celular. Consequentemente sua deficiência pode ocasionar alterações na síntese de DNA e também alterações cromossômicas. A síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas estão aumentadas durante a embriogênese e no rápido crescimento fetal, diante disto, as necessidades de folatos maternos aumentam dramaticamente durante a gravidez, ou seja, esta vitamina tem um papel fundamental no processo da multiplicação celular, sendo, portanto, imprescindível durante a gravidez. (SANTOS et al., 2007, HAU, 2008).

A carência de folatos causa a anemia megaloblástica estimulando as hemácias a aumentarem de tamanho devido à diminuição na síntese de DNA e também aumenta a

ocorrência de defeitos na formação do tubo neural, que são defeitos congênitos que se referem ao desenvolvimento incompleto da medula espinhal ou do cérebro. Ensaios clínicos randomizados e outros estudos científicos apontam para a importância do uso desta vitamina nos períodos anterior e posterior à concepção na prevenção de doenças do tubo neural, como a espinha bífida e a anencefalia. Deste modo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que todas as mulheres em idade reprodutiva aumentem o consumo desta vitamina (SANCHO et al., 2010).

Nos últimos anos têm aumentado as evidências da relação entre a deficiência de folatos e o risco de defeitos no desenvolvimento de fetos, durante a gestação, doenças cardíacas, certas formas de tumores e mal de Alzheimer's, entre outras. (LIMA et al., 2003). O alcance dos requerimentos de folatos por meio da dieta balanceada, sem a inclusão de alimentos fortificados e suplementos contendo ácido fólico, é muito difícil. A dificuldade aumenta devido à menor biodisponibilidade do ácido fólico na forma de folatos nos alimentos e à baixa ingestão dietética de fontes desta vitamina por alguns indivíduos. A dieta dos brasileiros no geral tende a ser rica em açúcares e pobre em alimentos fontes de folatos (NASSER et al., 2005).

O ácido fólico, a exemplo de todas as outras vitaminas, é necessário em pequenas quantidades. Porém, parte da população apresenta deficiência desse nutriente. Há muitas causas que levam a esse quadro em seres humanos, incluindo ingestão inadequada, absorção e metabolismo deficientes e demanda aumentada, principalmente nos períodos de gestação, lactação e crescimento. A principal causa tem sido apontada como sendo a ingestão insuficiente. Para tentar amenizar esse quadro, é recomendável a ingestão de alimentos ricos nessa vitamina (PACHECO et al., 2009).

Muitos trabalhos científicos têm apresentado dados que indicam uma ingestão insuficiente de vários nutrientes por parte da população mundial como um todo. Para tentar diminuir esse quadro e atender as recomendações em relação aos teores de compostos responsáveis pela manutenção da saúde, é que tem sido feito o enriquecimento de produtos alimentícios. Produtos lácteos, leite, farinhas, cereais,

biscoitos, enfim, produtos com expressivo consumo pela população em geral têm sido os mais utilizados para esse fim. O ácido fólico é a forma mais estável dentre os folatos, sendo a escolhida para o enriquecimento de alimentos (LIMA et al., 2004).

A análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que geralmente elas se encontram, da presença de inúmeros interferentes, da complexidade da matriz e da exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes. (SANCHO et al, 2010). Dentre os maiores desafios para determinação de vitaminas em alimentos temos, além do melhoramento dos processos de extração, temos o desenvolvimento e a validação de métodos que reduzam, sensivelmente, o tempo gasto para a análise e os custos, e que também possibilitem menor geração de resíduos (ARCOT e SHRESTHA, 2005). A espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis é um método que preenche estes requisitos.

Na literatura, o ácido fólico e os folatos são quantificados por principalmente por ensaios bioespecíficos microbiológicos e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CATHARINO et al., 2006; ARCOT ;SHRESTHA, 2005).

A validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método investigado tem capacidade de desempenho consistente. Ela é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de metodologias analíticas. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI et al., 2004).

Alimentos enriquecidos e medicamentos estão são importantes meios para o fornecimento de vitaminas para o nosso organismo. Dessa forma, é fundamental desenvolver métodos de validação dos nutrientes para assegurar a qualidade dos produtos.

Na área de análises de alimentos, a validação de métodos está principalmente associada com segurança alimentar e comércio internacional. Os resultados provenientes dos métodos de ensaio muitas vezes subsidiam a elaboração de políticas

de saúde pública para melhoramento da qualidade dos alimentos disponibilizados à população e adequação do país, principalmente do ponto de vista sanitário, às regras do comércio internacional (SOUZA, 2007).

Tendo em vista o grande número de métodos espectrofotométricos utilizados na rotina de laboratórios de controle de qualidade devido à facilidade, economia e rapidez dessa técnica, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver e validar a metodologia para determinação de ácido fólico, utilizando espectrofotômetro UV-Visível e seguindo parâmetros preconizados pelo INMETRO (INMETRO, 2003). Os parâmetros aplicados neste trabalho foram: faixa linear de trabalho; linearidade; sensibilidade; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão; precisão e robustez.

2 - Material e Métodos

2.1 – Material

O ácido fólico, utilizado como padrão, obtido da empresa Sigma-Aldrich.

2.2 – Métodos

2.2.1.- Determinação de ácido fólico por espectrofotometria em UV

Primeiramente foi pesquisado o solvente descobrindo que a solução de NaOH 0,1 N a melhor. Para tal, levou-se em consideração o poder de solubilização da vitamina, custo e toxicidade do solvente e a sensibilidade do fármaco frente ao comprimento de onda utilizado. Diante disto, realizou-se uma varredura na faixa de 200 a 400 nm, para a identificação do comprimento de onda que apresentaria o valor de absorbância mais adequado para o método. Conforme a figura 1, o comprimento de onda de máxima absorção foi 255 nanômetros. A calibração do equipamento

espectrofotômetro foi realizada por meio de padrões de referência rastreados pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

Concentrações crescentes de ácido fólico foram avaliadas em triplicatas de 10 vezes e sendo feitas 10 replicatas, para cada concentração. Foram preparadas as amostras diluindo-se o ácido fólico em solução de NaOH 0,1 N, e na segunda diluição, com água destilada, para obter uma concentração entre aproximadamente 3 a 20 µg/mL, para que a absorbância observada permanecesse entre 0,2 a 0,8. O coeficiente angular do material de referência certificado foi dividido pelo coeficiente angular da matéria-prima, para calcular a concentração da matéria-prima, e desta realizar todos os ensaios dos parâmetros para validação do método.

Os comprimidos de 5 mg utilizados no ensaio de exatidão foram da empresa FMQ, da marca mater folic. Os excipientes, os quais não interferiram no comprimento de onda de máxima absorção do ácido fólico (255 nm) foram: celulose microcristalina, lactose, povidona, estearato de magnésio e sacarose. Foram realizadas duas filtrações, a primeira em papel comum e a segunda em papel quantitativo.

Vale ressaltar que o ácido fólico apresenta maior estabilidade em meio alcalino do que em meio ácido, sendo que as soluções padrão devem ser preferencialmente preparadas em condições alcalinas. A sua estabilidade depende do tipo de tampão em que ele é armazenado, sendo que a presença de fosfato no tampão pode diminuir a estabilidade desta vitamina (ALABURDA, SHUNDO, 2007).

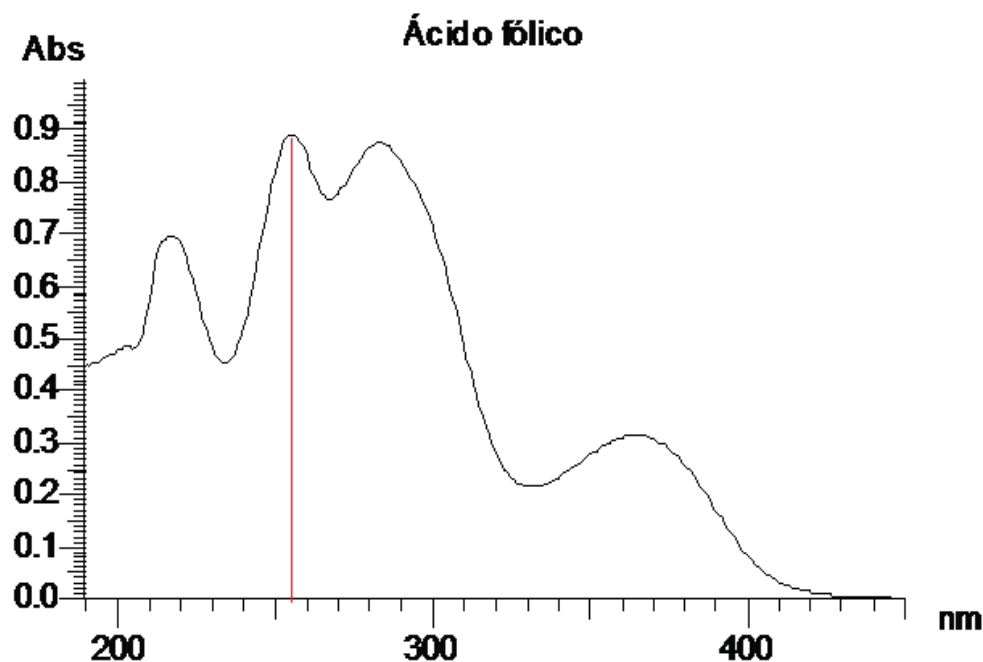


Figura 1-Espectro de varredura do ácido fólico destacando a máxima absorção em 255 nm.

3-Resultados e Discussão

O tamanho da amostra para a determinação dos parâmetros de validação pode variar entre diferentes testes, no entanto, tem de ser tal que seja suficientemente grande para produzir resultados estatisticamente válidos. Um mínimo de 7 análises replicadas conduzida a cada concentração é recomendado. De um modo geral, quanto maior o número de graus de liberdade, melhor a base estatística para o resultado da medição em questão (NATA, 2012). Neste trabalho, foram feitas dez análises em triplicata (uma ou mais vezes) para os parâmetros de validação avaliados.

O coeficiente de variação é uma medida de dispersão empregada para estimar a precisão dos experimentos e representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média (desvio padrão relativo). Observando os valores na tabela 1 e calculando o coeficiente de variação (Cv) percebe-se o valor de 5,9465 % para a média das massas adicionadas de menor valor (2,847152 μg), sendo que de acordo com Brito et al a precisão esperada nas condições de concentração trabalhadas deve ter um Cv menor

do que 5,6%, (BRITO et al, 2003). A precisão corresponde à proximidade de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos sob condições predeterminadas, no caso desta validação a condição escolhida foi o Cv ser menor do que 5,6%, isto porque a medida da precisão pode ser expressa em termos de desvio padrão relativo dos resultados do ensaio. Menor precisão significa um elevado desvio padrão relativo.

Geralmente a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação também pode diferir substancialmente em baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (RIBANI, 2004). A porcentagem de recuperação foi um pouco menor na concentração mais baixa avaliada (96,2880 %).

x (n=10)	±s(n=10)	±s/x	m ác fol adic	R %
2,847	0,00169	0,0594	2,957	96,29
5,877	0,00122	0,0207	5,914	99,38
8,882	0,00148	0,0166	8,871	100,12
11,861	0,00160	0,0135	11,828	100,28
14,785	0,00168	0,0114	14,784	100,00
17,742	0,00177	0,0100	17,741	100,00

Tabela 1: Valores médios de ácido fólico determinado (x médio), precisão por repetição(±s), desvio padrão relativo (±s/x), massas de ácido fólico adicionada, e recuperação do ácido fólico.

A fórmula do coeficiente de variação é:

$$Cv = 100 \cdot \frac{s}{\bar{X}}$$

A recuperação foi calculada segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada, C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada, C_3 = concentração adicionada.

Correlacionando as médias da massa determinada (Y) com a massa adicionada (Y_0) nota-se de acordo com a figura, que o resíduo foi maior na concentração menor avaliada. O resíduo corresponde à diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de massa.

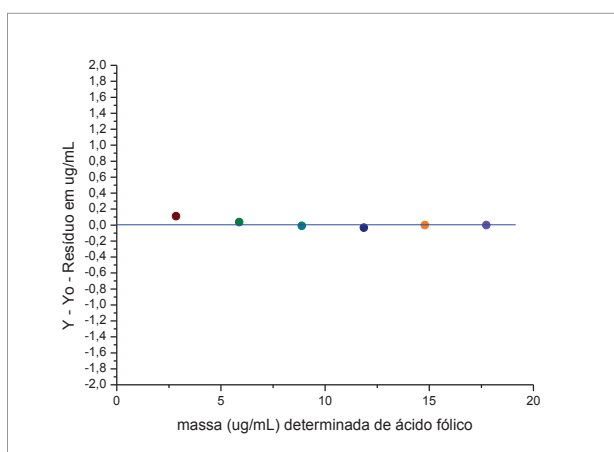
Uma forma de avaliar a linearidade é por meio da relação entre a concentração recuperada e a adicionada que deve ser linear. Assim, estima-se a capacidade do método em aproximar-se da recuperação ideal (100%) (BRITO, 2003).

Os intervalos aceitáveis de recuperação do analito devem ser entre 80 e 110%, quando a porcentagem da concentração do analito está na faixa entre $> 0,001$ - $> 0,00001$ e entre 90 e 107 % quando a concentração está $> 0,01$ (BRITO et al., 2003). Neste trabalho as concentrações menores que $10 \mu\text{g/mL}$ devem ter recuperação entre 80 e 110% e as maiores concentrações, a recuperação deve ser entre 90 e 107 %. Como mostrado na tabela 1, a recuperação ficou entre 96 e 100%, portanto estão condizentes com os intervalos aceitáveis de recuperação.

A curva analítica de linearidade informa-nos a correlação entre os valores adicionados do analito e a respectiva massa encontrada, entretanto é necessário investigar dentro da linearidade observada, qual é o intervalo do método em que a linearidade é obtida, considerando a incerteza da medição (GONÇALVES, 2010). Para isto calcula-se os valores de desvio-padrão para cada determinação de repetição, juntamente com sua média e a partir da relação entre o coeficiente do desvio e média, pela massa nominalmente adicionada, obtendo-se os resultados demonstrados na Figura 1-a . Os resultados indicam que a menor incerteza de medição na curva analítica situa-se entre 5,877168 e $17,74164 \mu\text{g/mL}$. Na menor concentração avaliada, a incerteza de medição (l genérica) foi bem maior, como pode ser observado na tabela 1.

Na Figura 1-b, encontramos um intervalo de trabalho, situado entre 2,8471 e 17,74164 $\mu\text{g/mL}$, entretanto, por assumirmos precisão esperada quando o Cv for menor do que 5,6%, a faixa linear de trabalho é entre 5,877168 e 17,74164 $\mu\text{g/mL}$, conforme pode ser notado na figura 1-c. Percebe-se que dentro da faixa linear existe uma faixa validada, ou seja, enquanto a calibração pode ser num intervalo mais amplo de concentração (mesmo com um altíssimo coeficiente de regressão linear), a validação pode ser caracterizada numa faixa mais restrita.

1a LINEARIDADE



1b FAIXA DE TRABALHO

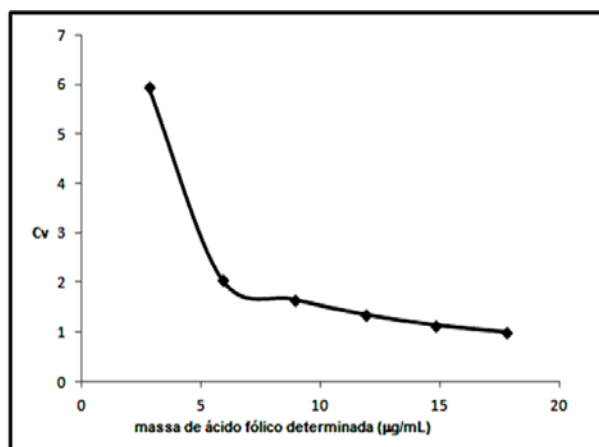


Figura 1a Linearidade e 1b Faixa de trabalho. Avaliação da linearidade a partir dos resíduos ($Y - Y_0$), obtidos da massa determinada (Y) e massa adicionada (Y_0) da equação da reta. Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho baseado na correlação $\pm s/x \times m$ ac. Fólico determinada. Assumiu-se a precisão esperada para o método de 5%.

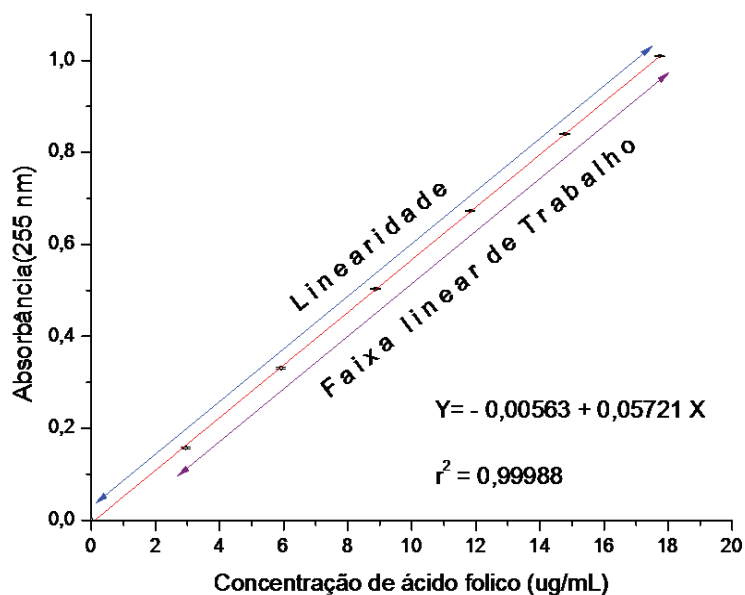
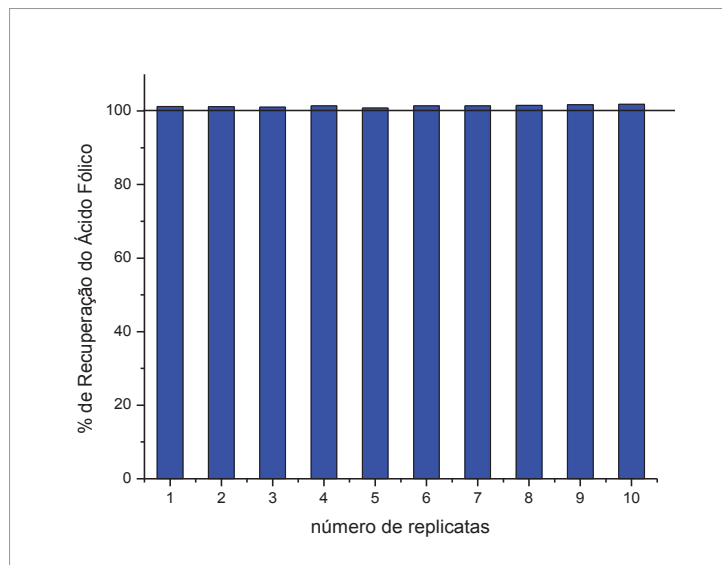


Figura 1c. Curva analítica do método espectrofométrico para determinação de ácido fólico. Diferenças entre concentrações associadas à linearidade e a faixa linear de trabalho.

As medições realizadas pelos laboratórios podem ter suas variações (incertezas) totais divididas em variação entre laboratórios, chamada de variação da reprodutibilidade, e variação dentro de laboratórios, como foi o feito neste trabalho, dita variação da repetitividade (GONÇALVES, ALVES, MARTINS, 2011). A repetibilidade revelou uma porcentagem de recuperação próxima a 100%.

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito adicionado em quantidades conhecidas (fortificação). A exatidão revelou média percentual de recuperação bem próxima a 100 % conforme mostrado na figura 3-b.

2-a PRECISÃO



2-b EXATIDÃO

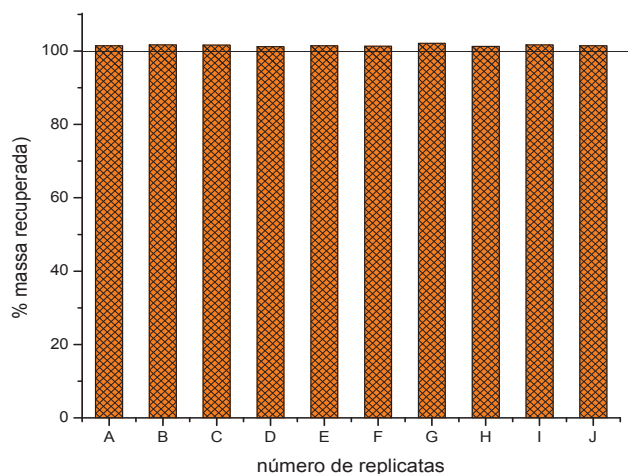


Figura 2a e 2b. Determinação da precisão por repetitividade $\pm s$, $n=10$, para massa de ácido fólico de, $s=0,029517$ ug/mL e determinação da exatidão por fortificação de comprimidos contendo 5 mg de ácido fólico.

Há em alguns trabalhos declarações de limites de detecção ou de quantificação que não são propriamente compreendidas, ou adequadamente comunicadas. Muitas vezes, são resultados de cálculos e não resultados de limites experimentalmente testados e validados (GONÇALVES, ALVES, MARTINS, 2011).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir do estudo de linearidade, sendo que $LD=3(\sigma/S)$, e $LQ=10(\sigma/S)$, onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e S (sensibilidade) é a inclinação da curva padrão (LIMA; REIS; MELO, 2012).

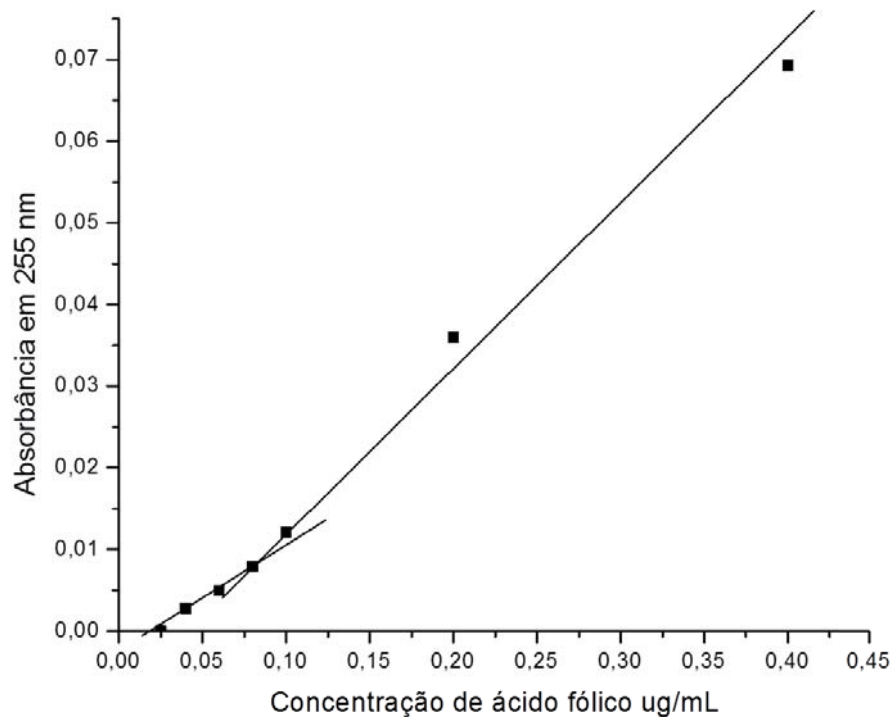


Figura 3. Determinação do limite de detecção por diluição. LD = 0,08 ug/mL; LQ=0,24 ug/mL

Quanto à robustez, ocorreu pouca diferença na concentração de ácido fólico encontrada em função da variação da concentração de hidróxido de sódio adicionada, como pode ser observado na figura 4.

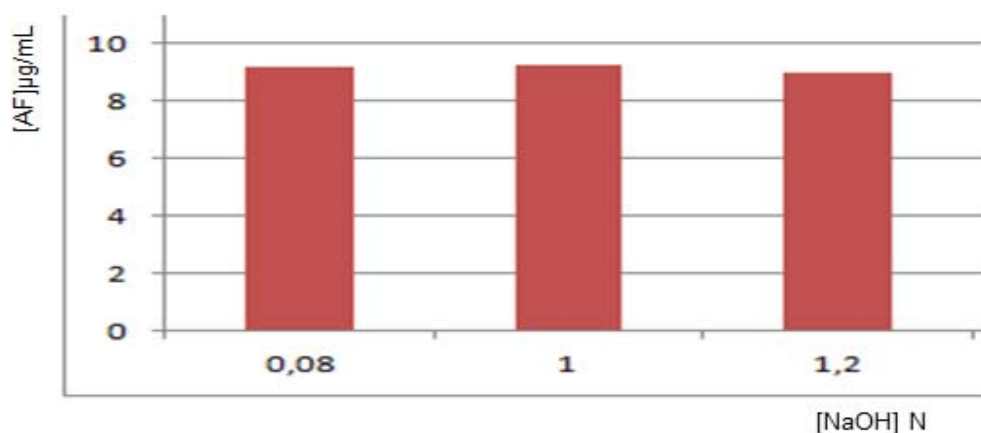


Figura 5. Robustez associada à variação da concentração do solvente.

Quando a solução de NaOH foi de 0,08 N, a concentração do ácido fólico encontrada foi 9,1974 µg/mL, 1,0 N : 9,2417 µg/mL e 1,2 N : 8,9880 µg/mL, diferenciando aproximadamente 2,75 %. Os valores aceitáveis são entre 95% a 105%, sendo, portanto robusta esta metodologia de análise proposta.

Os inconvenientes relacionados à solventes que apresentam toxicidade justificam o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos alternativos que utilizem reagentes de baixa toxicidade e de fácil tratamento e descarte, sendo mais que viáveis validações como esta que utilizou o NaOH como solvente. Tal procedimento é um dos objetos da química verde que tem como principal foco a redução ou eliminação dos impactos ambientais causados pelos processos, metodologias e procedimentos químicos que utilizam reagentes que podem causar danos aos seres vivos e ao ambiente ou são muito onerosos os tratamentos de resíduos (LIMA; REIS; MELO, 2012).

O processo de validação de um método não normalizado deve estar descrito em um procedimento e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e previamente validados. Da mesma forma, o operador que realiza os estudos deve ser competente para tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo (INMETRO, 2003)

6-Conclusão

Um laboratório, ao empregar qualquer método analítico, necessita demonstrar que o utiliza de maneira adequada; assim a validação de métodos busca aprimorar meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos de ensaio usados conduzem a resultados confiáveis e adequados à confiabilidade pretendida (GONÇALVES, ALVES, MARTINS, 2011).

Apesar da existência de diversos métodos analíticos publicados, a técnica de espectrofotometria de UV-Vis tem sido cada vez mais utilizada. O método mostrou ser simples, rápido, linear, específico, exato, preciso e robusto para ser executado na rotina de um laboratório de controle de qualidade, sendo uma alternativa aos métodos utilizados.

O método desenvolvido e validado descrito permite a quantificação do ácido fólico por meio de um comprimento de onda no ultravioleta, conferindo praticidade, confiabilidade e baixo custo para a utilização deste método na rotina laboratorial das indústrias farmacêutica e de alimentos.

7-Referências Bibliográficas

ALABURDA J, SHUNDO L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.66, n.2, p. 95-102, 2007.

ANICETO, C.; CANAES, L.S.; FATIBELLO-FILHO, O.; CAVALHEIRO, C.C.S. Determinação espectrofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p.637-640, 2000.

ARCOT J, SHRESTHA A. Folate: methods of analysis. **Trends. Food Sci. Technol.** 16: 3, p.253–266, 2005.

BRITO N.M., AMARANTE JÚNIOR O.P., POLESE L., RIBEIRO ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**, v.13, p.129-146, 2003.

CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T.; LIMA-PALLONE, J.A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Quím. Nova**, v. 29, n.5, p. 972-976, 2006.

FACCO, E.M.P.; FOGAÇA, A.O.; DAUDT, C.E.; GODOY, H.T. Quantificação de 5-metil-tetrahidrofolato no processamento e conservação de vinhos de uvas viníferas e híbridas. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, 27, n.4, p. 787-792, 2007.

GONÇALVES, E. B. ; ALVES, A.P.G. ; MARTINS, A.P. . Questões críticas em validação de métodos analíticos. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, v. 1. 69p, 2011.

GONÇALVES, G.S. **Atributos da validação do método analítico para quantificação da biotina empregando a técnica potenciométrica**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2010.

HAU, R. The analysis and stability of microencapsulated folic acid during the processing and preparation of instant Asian noodles. PhD thesis, RMIT University: Melbourne. 204 p, 2008.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 36p, 2003.

LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos – estudo da vida-de-prateleira. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, n. 24, v. 1, p.82-87, 2004.

LIMA, I. A.; REIS, R. R.; MELO, E. B. Desenvolvimento e validação de método seguro e ambientalmente adequado para quantificação de atenolol em matéria prima e comprimidos. **Biosci. J.**, v. 28, n. 3, p. 484-493, 2012.

NASSER C., NOBRE C., MESQUITA S., RUIZ J.G., CARLOS H.R., PROUVOT, L. Semana da Conscientização Sobre a Importância do Ácido Fólico. **J Epilepsy Clin Neurophysiol** v.1, p.199-203, 2005.

NATA (National Association of Testing Authorities). **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. 32f, 2012.

PACHECO, S.S.; BRAGA, C; SOUZA, A.; FIGUEIROA, J.F. Efeito da fortificação alimentar com ácido fólico na prevalência de defeitos do tubo neural. **Rev. Saúde Pública**, v.43, n.4, p. 565-571, 2009.

RIBANI .; BOTTOLI C.B.G.; COLLINS C.H.; JARDIM I.C.S.F.; MELO L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova** 27: 771-780, 2004.

SANCHO, S.O.; MAIA, G.A.; FIGUEIREDO R.W.; RODRIGUES,S.; RABELO, M.C. Avaliação da metodologia microbiológica para determinação de 5-metiltetrahidrofolato em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.30, n.3, p. 635-640, 2010.

SANTOS L.M.P.; PEREIRA M.Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cad Saúde Pública.**; v.23, n.1, p.17-24, 2007.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação Intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 297f, 2007. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos, 2007.