

## METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FOLATOS E ÁCIDO FÓLICO EM ALIMENTOS

**Rodrigo Ramos Catharino e Helena Teixeira Godoy**

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-970 Campinas - SP, Brasil

**Juliana Azevedo Lima-Pallone\***

Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologias, Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Rod. D. Pedro I, km 136, 13086-900 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 11/8/05; aceito em 1/2/06; publicado na web em 6/6/06

ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF FOLATES AND FOLIC ACID IN FOODS The aim of this work was to develop and to validate a methodology using HPLC for the simultaneous determination of folates and folic acid in foods. The limits of detection and the recovery rates for the vitamins in the certified reference materials were respectively 5 pg/mL and 94-108% for 5-MTHF, 7 pg/mL and 97-102% for THF, 30 pg/mL and 97.9-104% for 5-FTHF, 30 pg/mL and 95-107 for 10-FFA, 5 ng/mL and 97-102% for FA and 5 ng/mL and 98-103% for 10-MFA. Repeatability showed a coefficient of variation below 3.9% for all the vitamins. The proposed methodology was shown to be efficient when applied to different certified reference materials, namely pig's liver (BCR487), powdered milk (BCR421) and a vegetable mixture (BCR485).

Keywords: HPLC methodology; folates; food.

## INTRODUÇÃO

Os folatos fazem parte das vitaminas do grupo B e são importantes para processos bioquímicos, como síntese e reparo de DNA. A deficiência de folatos, que devem ser obtidos através da dieta, está associada à anemia megaloblástica, malformações congênitas, doença de Alzheimer, síndrome de Down, distúrbios cerebrais, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer<sup>1</sup>.

A análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que se encontram, da presença de inúmeros interferentes, da complexidade da matriz e da exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes. Os maiores desafios para determinação de vitaminas em alimentos incluem, além do melhoramento dos processos de extração e limpeza, o desenvolvimento e a validação de métodos simultâneos que reduziriam, sensivelmente, o tempo gasto para a análise e os custos, ainda possibilitando menor geração de resíduos<sup>2-4</sup>.

A literatura vem apresentando avanços nos métodos para a determinação de folatos, através de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>5-15</sup>, em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão<sup>2,16</sup>. Pesquisas com CLAE têm sido realizadas para determinação simultânea de folatos, em preparações farmacêuticas multivitamínicas e em alimentos<sup>17-19</sup>. Entretanto, a maior parte das determinações de folatos em alimentos envolve a utilização de enzimas (conjugases) no processo de extração, o que dificulta muito a aplicação do método e aumenta o tempo de análise, além de promover a perda de folatos<sup>5-10</sup>.

Outro fator importante para o conhecimento do potencial nutricional dos alimentos e a garantia do sucesso no desenvolvimento de novos produtos é a qualidade dos dados analíticos. Planejamentos e análises estatísticas variadas, programas de com-

paração de métodos analíticos e emprego de materiais de referência são as ferramentas utilizadas hoje pelos pesquisadores no controle de qualidade analítica para determinação de folatos<sup>10,20,21</sup>.

Dentro desse panorama, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de metodologia, utilizando a técnica de CLAE, para a determinação simultânea de seis formas naturalmente e mais comumente presentes de folatos em alimentos, além da forma sintética, ácido fólico, comumente adicionada a alimentos enriquecidos.

## PARTE EXPERIMENTAL

## Amostras

Três diferentes materiais de referência certificados, fígado de porco (BCR487), leite em pó (BCR421) e misturas de vegetais (BCR485), foram adquiridos do Instituto de Material de Referência e Padrões - Bélgica. Cada material foi totalmente homogeneizado antes da análise. Após a homogeneização, porções de 1,0 g foram tomadas para análise. Todas as determinações foram realizadas em duplicatas, sendo cada uma delas utilizada para 3 diferentes injeções.

## Reagentes

Os padrões de folatos, 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-MTHF), tetraidrofolato (THF), 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-FTHF), 10-formil-ácido-fólico (10-FAF), 10-metil-ácido-fólico (10-MAF), foram adquiridos do laboratório Schircks - Suíça, e o ácido fólico (F-7876) foi adquirido da Sigma (USA). A acetoneitrila, grau cromatográfico, o ácido acético e o ácido tricloroacético, bem como acetato de amônio, todos com grau de pureza analítico, foram adquiridos da Merck, Brasil. A água utilizada no preparo da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). A fase móvel foi filtrada em filtros Millipore, com poros de 0,45 µm de diâmetro.

\*e-mail: julianalima@puc-campinas.edu.br

## Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (Helwett Packard) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 µL e detectores de arranjo de diodos (DAD) (UV-Visível) e de fluorescência dispostos em série. Ambos permitem a detecção simultânea em vários comprimentos de onda. Todo o sistema foi controlado pelo programa Chemstation-HP, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

Para separação das diferentes formas de folatos foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb ODS-2, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i. (Raimin, USA) protegida por uma coluna de guarda Bondesil C<sub>18</sub>, 5 µm, 10 x 4,6 mm d.i. (Varian).

## Determinação de folatos e ácido fólico

Para a extração foi tomado 1,0 g de material de referência certificado (CRM) previamente homogeneizado, que foi triturado com 9,0 mL de solução de acetato de amônio (0,05 mol/L) em homogeneizador e colocado em banho ultra-sônico por 10 min. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL. Para a purificação do extrato, adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) e completou-se o volume com solução de acetato de amônio. Após homogeneização, a amostra foi filtrada, primeiro em papel de filtro comum e depois em membrana Durapore (HVLP 01300 Millipore), com poros de 0,45 µm, e o extrato injetado no cromatógrafo (100 µL).

A separação dos folatos foi feita através de um sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5 mL/min, desenvolvido com 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com hidróxido de potássio) no início, chegando em 25 min a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se essas condições até o final da corrida em 31 min. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 15 min, antes da próxima injeção. Quatro formas de folatos foram detectadas utilizando-se a fluorescência natural desses compostos ( $\lambda_{exc}$ . 290 nm e  $\lambda_{emis}$  360 nm para 5-MTHF, 5-FTHF e THF e  $\lambda_{exc}$  360 nm e  $\lambda_{emis}$  445 nm para 10FAF). O 10-MAF e o AF foram detectados na região do ultravioleta, a 290 nm.

A identificação dos folatos foi feita por comparação entre os tempos de retenção, obtidos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros obtidos com a utilização do detector de arranjo de diodos e fluorescência. O grau de pureza dos picos foi avaliado pelo sistema disponível no software Chemstation-HP. A quantificação foi realizada por padronização externa e construiu-se a curva analítica com 5 níveis de concentração, sendo cada ponto representado pela média de três determinações. As concentrações foram de 0,01 a 100 ng/mL para 5-MTHF e THF; de 0,06 a 120,0 ng/mL para 5-FTHF; de 0,06 a 60,0 ng/mL para 10-FAF e de 10 a 1000 ng/mL para AF e 10-MAF.

## Validação do método

### Limites de detecção e quantificação

A avaliação do limite de detecção (LD) foi feita por diluições sucessivas dos padrões de 5-MTHF, THF, 5-FTHF, 10-FAF e, posteriormente, por diluição da matriz, de forma a se confirmar o limite de detecção do método. Já para AF e 10-MAF foi realizada a adição de padrão às matrizes isentas dessas formas da vitamina, seguida da determinação da menor quantidade detectável, como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ( $S/R \geq 3$ )<sup>21</sup>. O limite de quantificação foi considerado como sendo 10 vezes o LD<sup>22</sup>.

### Testes de recuperação

Para avaliação da exatidão do método foram realizados testes de recuperação de padrões adicionados à matriz, em dois diferentes níveis de concentração. Para 5-MTHF e THF os níveis foram de 0,85 e 8,5 µg/100 g, para 5-FTHF e 10-FAF de 0,65 e 6,5 µg/100 g, e para AF e 10-MAF de 50 e 100 µg/100 g. A recuperação foi calculada segundo Jastrebova *et al.*<sup>11</sup> e Iwatani *et al.*<sup>15</sup>,

$$R = (C_{\text{encontrado}} - C_{\text{amostra}}) / C_{\text{adicionado}}$$

onde R - representa o valor de recuperação encontrado;  $C_{\text{encontrado}}$  - concentração total da amostra já adicionada de padrões;  $C_{\text{amostra}}$  - concentração de folatos encontrada na amostra sem adição de padrões e,  $C_{\text{adicionado}}$  - concentração adicionada de padrões.

### Repetibilidade

Esse parâmetro foi avaliado segundo o método proposto por Caulcutt e Boddy<sup>21</sup>. Foram feitas cinco determinações, em duplicatas, do 5-MTHF, THF, 5-FTHF, 10-FAF, 10-MAF e AF, em soluções padrões e em amostras de 3 diferentes materiais de referência certificados, avaliado segundo a Equação

$$r = t \cdot \sqrt{sr}$$

onde r = repetibilidade, com significância de 95%; sr = estimativa do desvio padrão e, t = t de Student

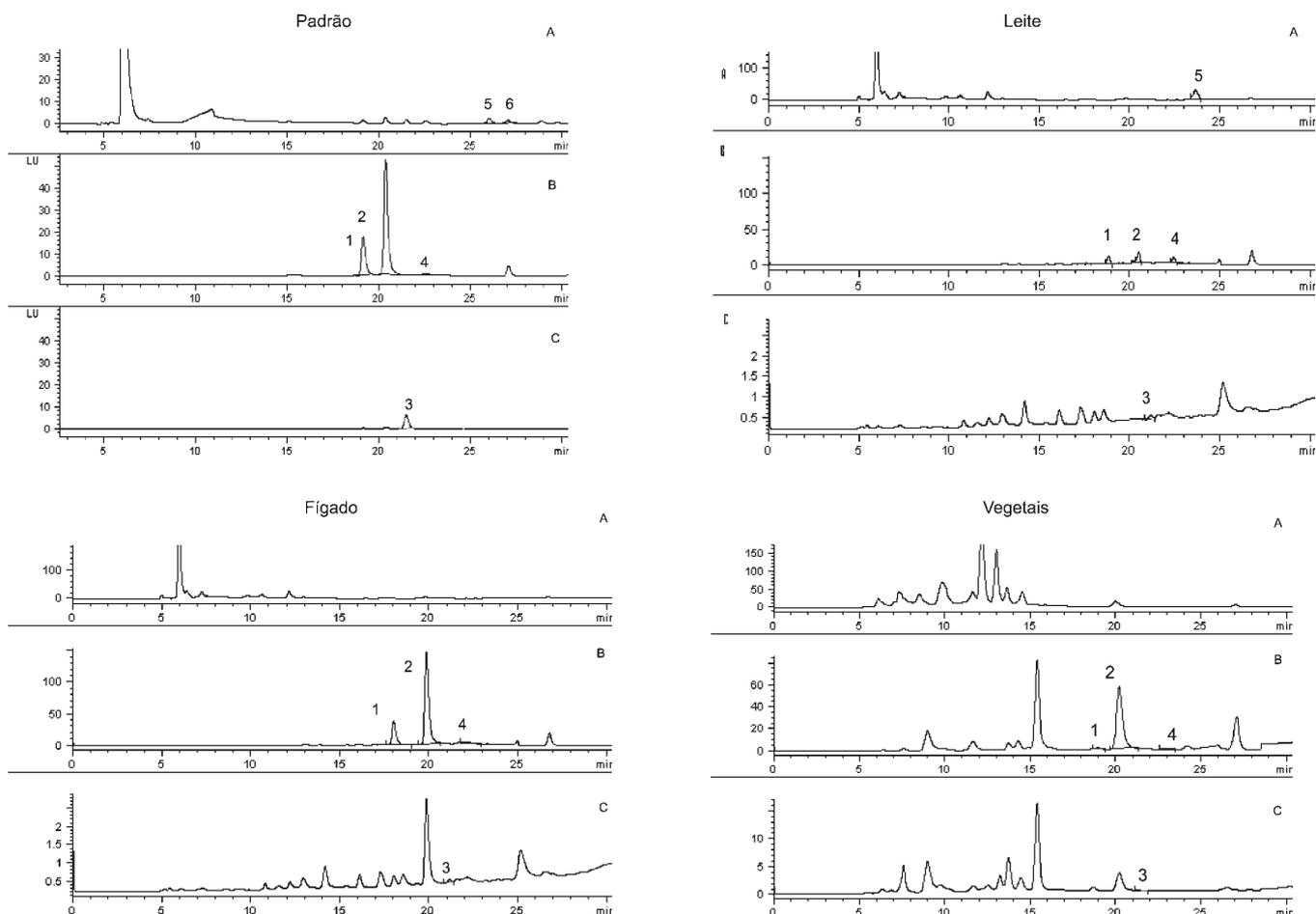
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os cromatogramas referentes à separação simultânea das diferentes formas de folatos em solução padrão e nos materiais de referência certificados avaliados. O emprego da coluna C<sub>18</sub> e a utilização do sistema de eluição por gradiente possibilitaram a eluição do THF pico nº 1, 5-MTHF pico nº 2, 10-FAF pico nº 3, 5-FTHF pico nº 4, AF pico nº 5 e 10-MAF pico nº 6 em 19,12; 20,50; 21,52; 22,5; 26,14 e 27,72 min, respectivamente, com um tempo de análise total de 31 min. Em função da utilização do sistema de eluição por gradiente, o tempo de re-equilíbrio da coluna foi fixado em 15 min após o final da corrida e foi fundamental para reprodutibilidade e repetibilidade do método. Observa-se a versatilidade da metodologia quando aplicada à separação das diferentes formas de folatos, nos tipos de alimentos avaliados (leite, fígado de porco e mistura de vegetais).

As curvas analíticas traçadas por padronização externa apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas, de 0,01 a 100 ng/mL para 5MTHF e THF; de 0,06 a 120,0ng/mL para 5FTHF; de 0,06 a 60,0 ng/mL para 10FAF; de 10 a 1000ng/mL para AF e 10MAF. Os coeficientes de correlação obtidos foram de 0,9878 e 0,9998 para o THF e o 5MTHF, e para os demais folatos o valor foi igual a 1,0000.

Os teores de folatos determinados nas amostras do material de referência certificado analisadas estão apresentados na Tabela 1. O AF foi a forma predominante no leite em pó, enquanto que nas demais amostras, a predominância foi de 5-MTHF. O 10-MAF não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

O teor de folatos totais obtidos no presente trabalho para o leite em pó (BCR421) de 102,9 µg/100 g é similar ao teor encontrado por Konings<sup>10</sup> (107 µg/100 g), que também utilizou o mesmo tipo de material de referência certificado. Entretanto, o valor está abaixo da faixa esperada para o material de referência, que era de 142 ± 14 µg/100 g. Para o fígado de porco (BCR487) o valor encontrado por Konings<sup>10</sup> foi de 1750 µg/100 g, enquanto que neste trabalho foi de 1633 µg/100 g. Ambos estão acima do estipulado



**Figura 1.** Perfis cromatográficos da separação dos folatos em solução padrão, dos extratos dos materiais de referência certificados BCR421 (leite), BCR485 (mistura de vegetais) e BCR487 (fígado de porco) utilizando detector de fluorescência  $\lambda_{exc}$  290 nm e  $\lambda_{emis}$  360 nm (A) para folatos e  $\lambda_{exc}$  360 nm e  $\lambda_{emis}$  445 nm (B) para 10-FAF e AF e 10-MAF usando um detector de arranjo de diodos (UV-VIS) a 290 nm (C). Coluna Microsorb, ODS-2, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm. Fase móvel: 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH), chegando em 25 min a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v), mantendo-se nessas condições até 31 min. Vazão de 0,5 mL/min. Identificação dos picos: (1) THF; (2) 5-MTHF; (3) 10-FAF; (4) 5-FAF; (5) AF e (6) 10-MAF

**Tabela 1.** Teores dos folatos nas amostras de materiais de referência certificados ( $\mu$ g/100 g)

Folatos	BCR 421		BCR 487		BCR 485	
	M $\pm$ D	CV %	M $\pm$ D	CV%	M $\pm$ D	CV%
THF	4,6 $\pm$ 0,2	3,3	35,2 $\pm$ 1,4	3,9	1,75 $\pm$ 0,03	1,7
5-MTHF	19,6 $\pm$ 0,3	1,7	1588,4 $\pm$ 3,4	0,2	282,6 $\pm$ 0,6	0,2
5-FTHF	1,8 $\pm$ 0,1	3,4	8,2 $\pm$ 0,1	1,6	7,5 $\pm$ 0,1	1,2
10-FAF	1,33 $\pm$ 0,01	0,8	1,71 $\pm$ 0,01	0,6	1,77 $\pm$ 0,04	2,2
AF	71,7 $\pm$ 1,2	1,6	Nd		nd	
10-MAF	Nd		Nd		nd	
Folatos Totais	102,9 $\pm$ 0,6	0,6	1633,5 $\pm$ 1,5	0,5	295,4 $\pm$ 1,5	0,5

THF – tetraidrofolato; 5-MTHF – 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato; 5-FTHF – 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato; 10-FAF-10-formil-ácido-fólico; AF – ácido fólico; 10-MAF-10-metil-ácido-fólico; BCR421 – leite em pó; BCR487 – fígado de porco; BCR485 – mistura de vegetais; M  $\pm$  D média e estimativa do desvio padrão de determinações em duplicata; CV coeficiente de variação; nd - não detectado.

no material de referência certificado (1340  $\pm$  140  $\mu$ g/100 g). Já para a mistura de vegetais (BCR485) o valor encontrado no trabalho foi de 295  $\mu$ g/100 g para folatos totais e foi superior ao encontrado no trabalho de Konings<sup>10</sup> (195  $\mu$ g/100 g), porém, se apresentou dentro da faixa esperada para o material de referência certificado, que é de 315  $\pm$  28  $\mu$ g/100 g. Portanto, os resultados obtidos com a metodologia desenvolvida estão muito próximos aos encon-

trados por Konings<sup>10</sup>, no entanto, diferem dos valores apresentados para os materiais de referência certificados, exceto para a mistura de vegetais, onde os dados foram concordantes. Cabe salientar que os teores de folatos totais nos materiais de referência foram estabelecidos utilizando-se o método microbiológico.

Os limites de detecção obtidos neste trabalho foram de 5 pg/mL para 5-MTHF, 7 pg/mL para THF, 30 pg/mL para 5-FTHF e 10-

FAF, e 5 ng/mL para AF e 10-MAF (Tabela 2). Jastrebova *et al.*<sup>11</sup> determinaram limites de detecção para THF, 5-MTHF e 5-FTHF, que foram superiores aos determinados para esses mesmos folatos. Chladek *et al.*<sup>13</sup> e Ndaw *et al.*<sup>14</sup> detectaram, apenas, 5-MTHF e os limites de detecção foram superiores aos obtidos no presente estudo. Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura<sup>5-7,10,12</sup>, onde foram determinados os limites de detecção para os folatos, com exceção do ácido fólico, os valores foram sempre superiores. Vahteristo *et al.*<sup>8</sup> foram os únicos a encontrar para 5-MTHF e THF limites de detecção inferiores aos estabelecidos nesse trabalho (Tabela 2). O limite de quantificação foi considerado, neste estudo, como dez vezes o limite de detecção, ficando para 5-MTHF 0,05 ng/mL, para THF 0,07 ng/mL, para 5-FTHF e 10-FAF 0,3 ng/mL e para AF e 10-MAF de 50 ng/mL.

**Tabela 2.** Comparação entre valores dos limites de detecção determinados para THF, 5-MTHF, 10-FAF, 5-FTHF, AF e 10-MAF

Ref.	Limite de Detecção (ng/mL)					
	THF	5-MTHF	10-FAF	5-FTHF	AF	10-MAF
5	5	3	40	10	3	-
6	2	2	2,5	1,5	1,5	-
10	0,007	0,007	0,059	1,0	1,0	-
7	5,7	0,3	7,3	5,1	1,7	-
8	0,003	0,002	0,04	0,05	1,4	-
11	0,25	0,15	-	2,0	-	-
12	-	1,0	-	-	1,0	-
13	-	0,07	-	-	-	-
14	-	0,099	-	-	-	-
Este trabalho	0,007	0,005	0,03	0,03	5	5

As taxas de recuperação, nos três diferentes produtos, em dois níveis de adição, para cada forma de folato, estão apresentadas na Tabela 3. Os valores das taxas de recuperação, nos três materiais certificados, para os dois níveis de enriquecimento, variaram para 5-MTHF de 94-108%; para THF de 96-102%, para 5-FTHF de 97-104%; para 10-FTHF de 95-104%; para AF de 97-102% e para 10-MTHF de 98-103%. As taxas de recuperação determinadas foram superiores às relatadas por Vahteristo *et al.*<sup>9</sup>. Esses autores encontraram para 5-MTHF uma taxa de recuperação de 88% em leite em pó, 76% em carne bovina, 96% em fígado de porco liofilizado e 67% em gema de ovo. Para THF, os mesmos autores relatam níveis de recuperação de 64% em carne bovina e 61% em gema de ovo. O 10-MAF e 10-FAF tiveram recuperações ainda menores no trabalho de Vahteristo *et al.*<sup>9</sup>, com níveis de 90% para 5-FTHF e 70% para 10-FAF em carne bovina, e em gema de ovo 49% de recuperação para os mesmos folatos, sendo que os níveis de enriquecimento foram de 18 até 42 µg/100 g. Para o ácido fólico, nos quatro produtos analisados por Vahteristo *et al.*<sup>9</sup>, os valores encontrados para a recuperação variaram de 49 a 77%, com níveis de enriquecimento de 22 e 220 µg/100 g. Konings<sup>10</sup> avaliou os mesmos materiais de referência certificados, embora em um único nível de enriquecimento, e determinou que para a mistura de vegetais, na qual se detectou apenas 5-MTHF, a recuperação foi de 90% em um nível de enriquecimento de 172 µg/100 g, valor este menor que o obtido neste trabalho. No fígado de porco, Konings<sup>10</sup> determinou apenas 5-MTHF e THF e os valores de recuperação, nos respectivos níveis de enriquecimento de 641 e 2161 µg/100 g, foram de 109 e 88%, respectivamente. Mesmo com elevados níveis de enriquecimento, a taxa de recuperação para THF foi menor quando comparada com a apresentada neste estudo. O mesmo ocorreu com a recuperação no leite em pó, que foi mais baixa quando comparada com as taxas obtidas neste trabalho. Konings<sup>10</sup> encontrou em leite em pó apenas 5-MTHF e AF e seus valores de recuperação

**Tabela 3.** Valores de recuperação encontrados para THF, 5-MTHF, 10-FAF, 5-FTHF, AF e 10-MAF

Folatos	Vam (ug/100 g)	Va (ug/100 g)		VE (ug/100 g)		Recuperação (%)	
		I	II	I	II	I	II
Leite em pó (BCR421)*							
5-MTHF	19,82	0,85	8,5	20,62	28,11	94	98
THF	4,71	0,85	8,5	5,53	13,09	97	99
5-FTHF	1,81	0,65	6,5	2,44	8,16	97	98
10-FAF	1,33	0,65	6,5	2,01	7,77	105	99
AF	73,01	50	100	122,01	173,52	98	101
**10-MAF	nd	50	100	49,2	99,4	98	99
Fígado de porco (BCR485)*							
5-MTHF	1595,84	0,85	8,5	1596,76	1604,71	108	104
THF	365,89	0,85	8,5	366,75	374,42	101	100
5-FTHF	8,25	0,65	6,5	8,89	15,01	99	104
10-FAF	1,72	0,65	6,5	2,34	8,16	95	99
**AF	nd	50	100	48,5	102,3	97	102
**10-MAF	nd	50	100	51,4	101,5	103	102
Mistura de Vegetais (BCR487)*							
5-MTHF	282,46	0,85	8,5	283,45	291,06	99	101
THF	1,86	0,85	8,5	2,73	10,52	102	102
5-FTHF	7,89	0,65	6,5	8,56	14,31	103	99
10-FAF	1,82	0,65	6,5	2,46	8,35	99	100
**AF	nd	50	100	49,6	101,5	99	102
**10-MAF	nd	50	100	48,9	99,7	98	100

\*Valores são médias de determinações em duplicata; \*\*vitaminas adicionadas, não presentes nos materiais de referência certificados; Vam - valor encontrado na amostra; Va - valor de vitamina adicionada; VE - valor encontrado depois do enriquecimento; I e II representam os dois níveis de enriquecimento; nd, não detectado.

**Tabela 4.** Valores de repetibilidade determinados para THF, 5-MTHF, 10-FAF, 5-FTHF, AF e 10-MAF em padrões e em materiais de referência certificados

Padões de Folatos			Leite em pó (BCR421)			Fígado de porco (BCR485)			Mistura de vegetais (BCR487)		
V	C (µg/100 g)	R	V	C (µg/100 g)	r	V	C (µg/100 g)	r	V	C (µg/100 g)	r
THF	10,0076	0,163	THF	4,3647	0,55	THF	343,3612	54,25	THF	1,7259	0,1336
	10,0831			4,4667			362,5709			1,7064	
	10,1041			4,5686			364,9377			1,7802	
	10,1009			4,7350			370,4137			1,7547	
	10,1048			4,4344			339,33440			1,7038	
5-MTHF	100,7654	1,145	5-MTHF	18,8212	1,41	5-MTHF	1584,4072	10,81	5-MTHF	284,1455	2,987
	100,2439			19,4937			1589,3562			282,4288	
	100,9072			19,8059			1592,0693			282,1865	
	100,8632			19,2501			1587,8201			282,7564	
	100,9681			19,4653			1587,9908			282,6250	
5-FTHF	5,7896	0,307	5-FTHF	1,6904	0,18	5-FTHF	8,2453	0,629	5-FTHF	7,5492	0,3541
	5,9876			1,6834			8,4450			7,4698	
	5,8541			1,6927			8,1226			7,4631	
	5,9437			1,6981			8,0343			7,5800	
	5,92546			1,7975			8,1470			7,6826	
10-FAF	10,0267	0,09	10-FAF	1,3321	0,07	10-FAF	1,6820	0,07	10-FAF	1,7809	0,07
	10,0728			1,3307			1,7244			1,7523	
	10,0891			1,3345			1,7230			1,7377	
	10,0542			1,3295			1,7223			1,7368	
	10,0611			1,3307			1,7228			1,7440	
AF	101,2456	2,01	AF	73,5122	5,12	*AF	100,7852	1,672	*AF	100,3511	3,419
	100,8991			72,0124			100,5345			101,7205	
	101,0325			72,0132			101,002			100,9672	
	100,7655			71,0243			99,869			100,0023	
	102,0632			70,0132			100,5624			102,0442	
*10-MAF	50,3012	0,575	*10-MAF	50,9341	0,343	*10-MAF	50,0772	0,276	*10-MAF	50,0084	2,015
	50,0079			50,9022			50,2014			51,0671	
	50,0238			50,9204			50,0755			49,8872	
	50,3095			50,9531			50,0621			50,8342	
	50,2074			50,7364			50,1978			50,5672	

\*Vitaminas adicionadas aos materiais de referência certificados; valores são médias de determinações em duplicata.

foram, respectivamente, 85 e 90%, quando adicionados 25,5 do 5-MTHF e 70 µg/100 g de AF.

A repetibilidade apresentada pelo método pode ser considerada adequada, pois, as variações existentes entre as medições obtidas no estudo foram menores que os valores do fator "r" calculado, conforme a Tabela 4.

## CONCLUSÕES

A simplicidade e a rapidez da preparação de amostra, principalmente pela não utilização da hidrólise enzimática, aliada aos dados obtidos na validação, indicam a eficiência da aplicação da metodologia na determinação simultânea, por CLAE, de folatos e ácido fólico em alimentos.

A metodologia desenvolvida e validada para os materiais de referência certificados pode ser aplicada à análise de folatos em alimentos e, dessa forma, contribuir para a avaliação do teor dessa importante vitamina nas mais diversas matrizes alimentícias.

## REFERÊNCIAS

- Off, M. K.; Steindal, A. E.; Porojnicu, A. C.; Juzeniene, A.; Vorobey, A.; Johnsson, A.; Moan, J.; *J. Photochem. Photobiol.* **2005**, *80*, 47.
- Scott, J.; Rébeillé, F.; Fletcher, J.; *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 795.
- Ruggeri, S.; Vahteristo, L. T.; Aguzzi, A.; Finglas, P.; Carnovale, E.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *855*, 237.
- Stokes, P.; Webb, K.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *864*, 59.
- Day, B. P.; Gregory, J. F.; *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 374.
- Duch, D. S.; Bowers, S. W.; Nichol, C. A.; *Anal. Biochem.* **1983**, *130*, 385.
- Holt, D. L.; Wehling, R. L.; Zeece, M. G.; *J. Chromatogr., A* **1988**, *449*, 271.
- Vahteristo, L.; Lehtikainen, K.; Ollilainen, V.; Varo, P.; *Food Chem.* **1997**, *59*, 589.
- Vahteristo, L.; Ollilainen, V.; Varo, P.; *J. Assn. Offic. Anal. Chem. Int.* **1997**, *80*, 373.
- Konings, E. J. M.; *J. Assn. Offic. Anal. Chem. Int.* **1999**, *82*, 119.
- Jastrebova, J.; Witthöft, C.; Grahn, A.; Svensson, U.; Jagerstad, M.; *Food Chem.* **2003**, *80*, 579.
- Doherty, R. F.; Beecher, G. R.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 354.
- Chládek, J.; Sispara, L.; Martinková, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, *744*, 307.
- Ndaw, S.; Bergaentzle, M.; Aoudé-Werner, D.; Lahély, S.; Hasselmann, C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *928*, 77.
- Iwatani, Y.; Arcot, J.; Shrestha, A. K.; *J. Food Comp. Anal.* **2003**, *16*, 37.
- Konings, E. J. M.; Roomans, H. H. S.; Dorat, E.; Goldbohm, R. A.; Saris, W. H. M.; Brandt, P. A.; *Am. J. Nutr.* **2001**, *73*, 765.
- Dong, M. W.; Lepore, J.; Taurumoto, T.; *J. Chromatogr.* **1988**, *442*, 81.
- Finglas, P. M.; Faure, U.; Wagstaffe, P. J.; *J. Anal. Chem.* **1993**, *345*, 180.
- Hollman, P. C.; Slange, J. H.; Wagstaffe, J. P.; Faure, U.; Southgate, D. A. T.; Finglas, P. M.; *Analyst* **1993**, *118*, 481.
- Finglas, P. M.; Wigertz, K.; Vahteristo, L.; Witthöft, C.; Southon, S.; Froidmont-Görtz, L.; *Food Chem.* **1999**, *64*, 245.
- Caulcutt, R.; Boddy, R.; *Statistic for analytical chemists*, 1<sup>st</sup> ed.; Londres, 1983.
- Ribani, R.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.