

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RAFAEL OTERO DOS SANTOS

**Validação de metodologia para análise de Vitamina B9 por cromatografia líquida de alta
eficiência para indústria alimentícia**

Lorena

2020

RAFAEL OTERO DOS SANTOS

**Validação de metodologia para análise de Vitamina B9 por cromatografia líquida de alta
eficiência para indústria alimentícia**

Monografia apresentada à Escola de Engenharia
Lorena da Universidade de São Paulo como requisito
parcial para obtenção do título de Engenheiro
Químico.

Orientadora: Profª. Drª. Jayne Carlos de Souza
Barboza

Lorena

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Rafael Otero
Validação de metodologia para análise de Vitamina B9 por cromatografia líquida de alta eficiência para indústria alimentícia / Rafael Otero Santos;
orientadora Jayne Carlos de Souza Barboza. -
Lorena, 2020.
40 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Química - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2020

1. Vitamina b9. 2. Cromatografia líquida de alta
eficiência. 3. Validação. 4. Alimentos. I. Título. II.
Barboza, Jayne Carlos de Souza , orient.

Dedicatória

Aos meus pais, pilares na minha formação como ser humano. Minha vida, meu suor e meu sangue em suas mãos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Mario e Victor, por me servirem de exemplo e fazer com que busque a cada dia da minha vida uma maneira de orgulhar vocês. Tudo que tenho nessa vida é a nossa família.

À pequena Manuela, que mesmo em tão pouco tempo de vida, me devolveu em um dos momentos mais difíceis, a vontade de sorrir.

À minha segunda família da República Acasalar pelas risadas, pelas discussões e pelas histórias. Que esse laço nunca se desfaça.

À minha orientadora, Professora Doutora Jayne Carlos de Souza Barboza. Por toda paciência e disponibilidade mostrada na elaboração desse trabalho. Obrigado por acreditar em mim.

Ao Professor Doutor Domingos Sávio Giordani, que me estendeu a mão no momento mais difícil da minha trajetória dentro da engenharia.

“Que todos os seres sejam felizes e livres, que meus pensamentos, palavras e atitudes contribuam para a felicidade de todos os seres.”

Autor desconhecido

RESUMO

SANTOS, Rafael Otero dos. **Validação de metodologia para análise de Vitamina B9 por cromatografia líquida de alta eficiência para indústria alimentícia.** 2020. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias no processamento de alimentos, surgiu a possibilidade de combater problemas nutricionais em populações. A fortificação de alimentos vem sendo empregada por indústrias em todo o ramo alimentício. Uma das vitaminas mais utilizadas em fortificações é a Vitamina B9, que possui o ácido fólico como forma sintética utilizada em fortificações, essa vitamina é de extrema importância nas funções biológicas, e prevenção de doenças como anemia megaloblástica. Com o aumento do uso destes aditivos em alimentos, gerou-se uma grande demanda de métodos analíticos rápidos e eficazes para suprir a necessidade da indústria em seu controle de qualidade. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão responsável pela fiscalização e controle de qualidade das indústrias no Brasil, estipulou através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 166 datada de 24 de julho de 2017, uma série de parâmetros que devem ser seguidos para a implementação de um método analítico que permita sua utilização em controles de qualidade. A premissa desse trabalho de conclusão de curso é demonstrar todas as etapas que devem ser seguidas na validação de um método analítico para quantificação de vitamina B9 por cromatografia líquida de alta eficiência. O método se baseia na digestão enzimática da amostra com papaína seguida de limpeza e separação do analito de interesse utilizando colunas de extração de fase sólida e quantificação por cromatografia líquida com detector UV-visível acoplado. A validação do método mostrou viabilidade uma vez que o equipamento pode ser utilizado para outras análises diminuindo o preço da análise, redução no tempo de análise e maior precisão para o fornecimento dos resultados.

Palavras-chave: Vitamina B9, Cromatografia líquida de alta eficiência, Validação, Alimentos

ABSTRACT

SANTOS, Rafael Otero dos. **Validation of methodology for the analysis of Vitamin B9 by high performance liquid chromatography for the food industry.** 2020. 38 f Monograph (Final Course Assignment) - Chemical Engineering Course, Lorena School of Engineering, University of São Paulo, Lorena, 2020.

With the development of new technologies in food processing, it arose the possibility to combat nutritional problems in populations. Food fortification has been used by industries across the industry. One of the most used vitamins in fortifications is Vitamin B9, which has folic acid as a synthetic form used in fortifications, this vitamin is of extreme importance in biological functions and prevention of diseases such as megaloblastic anemia. With the increase use of these food additives, there was a great demand for fast and effective analytical methods to deal with the industry's need for quality control. The "Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), the agency responsible for the inspection and quality control of industries in Brazil, stipulated through the Resolution of the Collegiate Board (RDC) number 166 dated July 24, 2017 a series of parameters that must be followed for the implementation of an analytical method that allows its use in quality controls. The premise of this monograph is to demonstrate all the steps that must be followed in the validation of an analytical method for quantification of vitamin B9 by high performance liquid chromatography. The method is based on enzymatic digestion of the sample with papain followed by cleaning and separation of the analyte of interest using solid phase extraction columns and quantification by liquid chromatography with a UV-visible detector attached. The validation of the method showed feasibility since the equipment can for other analyzes, decreasing the analysis price, reducing the analysis time and providing more precision for the results.

Key-words: Vitamin B9, High performance liquid chromatography, Validation, Food

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do Ácido Pteroilglutâmico.....	15
Figura 2: Sistema com alça de amostragem.....	18
Figura3: Cromatograma do ponto 6 da curva analítica.....	29
Figura 4: Cromatograma do ponto 3 da curva analítica.....	29
Figura 5: Cromatograma da injeção do branco.....	30
Figura 6: Cromatograma da amostra de validação.....	30
Figura 7: Gráfico de linearidade.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desempenho dos Detectores para CLAE.....	17
Tabela 2: Curva analítica de Ácido Fólico.....	24
Tabela 3: Gradiente da fase móvel.....	25
Tabela 4: Resultados do teste de linearidade.....	31
Tabela 5: Resultados do ensaio de exatidão.....	32
Tabela 6: Resultados para teste de exatidão.....	33
Tabela 7: Resultados obtidos no teste para precisão intermediária.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

CLAE- Cromatografia Líquida de alta eficiência

DNA- Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

Psi- Pound force per square inch (libra-força por polegada quadrada)

μl - Microlitro

μg - Micrograma

mL-Mililitro

pg- Picograma

ng-Nanograma

RDC- Resolução da Diretoria Colegiada

UV-Ultravioleta

LD-Limite de detecção

LQ-Limite de quantificação

pH-Potencial Hidrogeniônico

USP- Unitet States Pharmacopeia (Farmacopéia dos Estados Unidos)

CAS- Chemical Abstracts Service (Resumo de serviços químicos)

μm - Micrômetro

nm- Nanômetro

fg- Fentograma

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Vitaminas	16
2.1.1 Vitamina B9	16
2.1.2 Funções Bioquímicas da vitamina B9	17
2.2 Cromatografia	17
2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	18
2.3 Validação de Método Analítico.....	20
2.3.1 Seletividade.....	21
2.3.2. Linearidade	21
2.3.3 Precisão	21
2.3.4 Exatidão	22
2.3.5 Limites de Detecção e Quantificação	22
2.3.6 Robustez	23
3. Materiais e métodos	24
3.1 Materiais	24
3.1.1 Amostra de referência	24
3.1.2 Padrão de referência	24
3.1.3 Equipamentos	24
3.1.4 Reagentes	24
3.2 Método	25
3.2.1 Preparo das soluções utilizadas.....	25
3.2.2 Rota analítica	27
3.2.3 Condições cromatográficas.....	28
4. Resultados e discussões.....	29
4.1 Validação do método analítico por CLAE.....	29
4.1.1 Cálculo do teor de vitamina B9.....	29
4.1.3 Linearidade	32
4.1.4 Exatidão	34

4.1.5 Precisão	35
4.1.6 Precisão intermediária.....	36
4.1.7 Limites de Detecção e Quantificação	37
4.1.8 Análise de custos e impactos na rotina analítica.....	37
4.1.9 Robustez	37
5. Conclusão.....	38
Referências	39

1. INTRODUÇÃO

A fortificação de alimentos surge como um procedimento eficaz no combate à deficiência nutricional de micronutrientes em diversas populações ao redor do mundo, tornando possível o aumento da ingestão diária de micronutrientes.

A fortificação de alimentos industrializados é possível com todo o complexo de vitaminas e minerais. Esse tipo de procedimento, utilizado para corrigir carências nutricionais, deve estar ligado a um permanente rígido controle de qualidade, que não somente evite que o consumidor seja enganado por um déficit de algum aditivo no produto, mas que o proteja, por exemplo evitando cenários de hipervitaminose. No Brasil, a ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) possui uma legislação que regulamenta e fiscaliza a fortificação de alimentos, gerando diretrizes que devem ser seguidas pela indústria alimentícia. A política de fortificação de alimentos é de fundamental importância para o combate de diversos problemas nutricionais principalmente em países em desenvolvimento (Zancul et al., 2004).

Vitaminas estão entre os principais aditivos usados em fortificações, pois são substâncias indispensáveis para o metabolismo orgânico, obtidas, em sua grande maioria, através de alimentos, bebidas ou suplementos. Existem exceções como a vitamina D que é sintetizada pelo próprio organismo, mas pode ser adicionada em fortificações.

A vitamina B9, analito de interesse deste trabalho de conclusão de curso, é uma coenzima fundamental para o metabolismo. O ácido fólico, forma sintética da vitamina B9, é utilizado de forma extensa na fortificação de alimentos pela indústria atual. É uma vitamina instável ao calor, facilmente oxidada e pouco resistente a pH ácidos.

Existem vários métodos analíticos disponíveis no mercado para detecção e quantificação de vitaminas, os mais comumente usados são fluorimétricos e espectrofotométricos, porém esses métodos não discriminam compostos com isomeria conformacional diferente, que possuem atividades características de determinadas vitaminas, como a vitamina A, por exemplo. Com o aumento da demanda de métodos analíticos imposta pelo mercado e a necessidade de uma maior precisão e velocidade na análise, a CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), começou a ser empregada em laboratórios de qualidade da indústria alimentícia. A CLAE surgiu como uma técnica de separação, mas devido à sua versatilidade passou a ser uma técnica de suma importância

quantitativamente e qualitativamente, possuindo vantagens como rapidez, precisão, reproduibilidade e sensibilidade (GIACOMINI et al., 2006).

A necessidade de demonstrar a veracidade e confiabilidade dos resultados analíticos obtidos recebe, cada vez mais, reconhecimento e se tornou obrigatória para dados analíticos, para tomadas de decisão dentro da indústria. Dados incorretos podem levar a decisões desastrosas, prejuízos financeiros e complicações legais com órgãos regulatórios. Para garantir a confiabilidade de um novo método analítico existe uma série de critérios que devem ser seguidos e documentados, toda essa metodologia se denomina validação.

De acordo com a ANVISA (2017), 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).

No decorrer deste trabalho de conclusão de curso, são mostradas todas as etapas necessárias para realizar a validação de um método analítico para quantificação da vitamina B9 por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por UV-visível. Todos os critérios empregados durante essa validação são descritos e regulamentados pela ANVISA de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº166, de 24 de julho de 2017.

1.1 OBJETIVOS

Este trabalho visa mostrar a validação de um método analítico quantitativo e qualitativo por cromatografia líquida de alta eficiência para vitamina B9 presente em produtos terminados, produtos semielaborados e premixes vitamínicos oriundos da indústria alimentícia.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Vitaminas

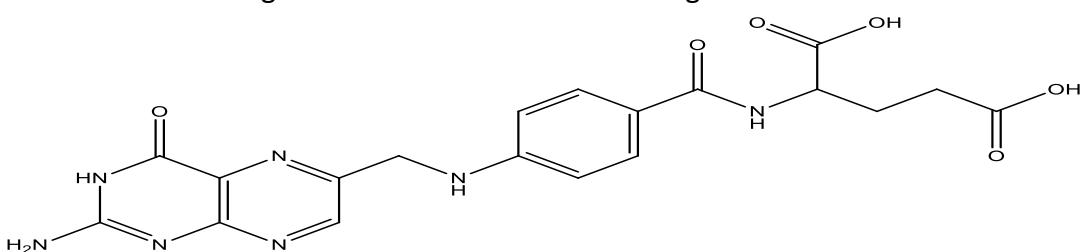
Vitaminas são compostos orgânicos de grande necessidade para o metabolismo animal e vegetal, porém são encontradas em pequenas quantidades nos alimentos. Estes compostos foram agrupados por se assemelharem quimicamente e por terem funções fisiológicas semelhantes (LATHAM et al., 1997).

Receberam essa denominação por acreditar primeiramente que se tratavam de aminas, mas sabe-se hoje que possuem estruturas químicas variadas. Estabeleceu-se uma divisão desse grupo de vitaminas, as quais foram separadas com relação a sua solubilidade. As vitaminas lipossolúveis são facilmente oxidáveis, solúveis em solventes orgânicos e não possuem nitrogênio em sua composição. Esse grupo é composto pelas vitaminas A, D, E e K. Vitaminas hidrossolúveis são solúveis em água gerando assim uma grande dificuldade de armazenar nos organismos animais e atuam geralmente como coenzimas. Nesse grupo estão presentes as vitaminas do complexo B e a vitamina C. (CATHARINO et al., 2000)

2.1.1 Vitamina B9

Conhecida como Ácido Fólico(2-amino-4-hidroxi-6-metilenobenzol-L-glutâmico), ácido pteroilglutâmico ou vitamina M, a vitamina B9 possui fórmula estrutural apresentada na figura 1. Utiliza-se o termo Folato para descrever de forma geral os compostos que possuem estruturas e atividades semelhantes ao ácido fólico, compostos estes que são as formas geralmente encontradas da vitamina B9 em alimentos não processados (CATHARINO et al., 2000).

Figura 1 Estrutura do Ácido Pteroilglutâmico



Fonte: CATHARINO et al., 2000

Presente no grupo das vitaminas hidrossolúveis, os folatos são sintetizados apenas por plantas e microrganismos gerando assim a necessidade da ingestão de variados alimentos como verduras verdes escuras, feijão e legumes para evitar sua carência na nutrição humana. A ingestão recomendada de folatos para homens adultos é de 200 µg e mulheres adultas 180 µg, para gestantes o valor pode chegar a 400 µg. O que mais dificulta a ingestão da carga diária de B9 é o fato das vitaminas do complexo B serem termo sensíveis, fazendo com que grande parte seja perdida durante o cozimento dos alimentos (MELO et al., 2004).

A deficiência da ingestão de folatos pode causar a anemia megaloblástica, que acarreta o crescimento do tamanho das hemárias devido à diminuição na síntese de DNA aumentando a probabilidade de ocorrência de deficiências na formação do tubo neural, também pode causar alterações no trato intestinal, doenças no coração, alguns tipos de câncer e leucemia e doenças neurológicas. Além disso folatos são essenciais na formação de leucócitos na medula óssea e da síntese de purinas e pirimidinas, compostos esses utilizados na síntese de material genético (SILVA et al., 2012).

2.1.2 Funções Bioquímicas da vitamina B9

Os folatos possuem papéis importantes em dois ciclos para vegetais e mamíferos, o ciclo de metilação e biossíntese de DNA. São necessários para formação de produtos intermediários do metabolismo, desses pode-se destacar sua participação na síntese da purina e timidilato por se tratar de duas substâncias fundamentais na síntese do DNA. Os folatos também participam da síntese de mielina, proteína que participa da biossíntese de lipídios que separam os nervos axônios, cuja função é transmitir para as outras células os impulsos nervosos provenientes do corpo celular (LIMA; CATHARINO; GODOY, 2003).

2.2 Cromatografia

Cromatografia é um método muito empregado por sua versatilidade, esse método de análise permite a separação, identificação e quantificação de componentes em misturas complexas. A técnica se baseia na separação dos compostos de uma mistura pela diferença de velocidade em que estes são transportados através da fase estacionária, por uma fase

líquida ou gasosa. Na cromatografia, a coluna consiste de um sólido inerte finamente dividido que retém a fase estacionária na sua superfície e a fase móvel é fluído pelo sistema. Devido às diferentes interações dos componentes com o recheio da coluna, suas velocidades médias são alteradas no percurso, facilitando a separação e sua identificação por um detector acoplado ao conjunto (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).

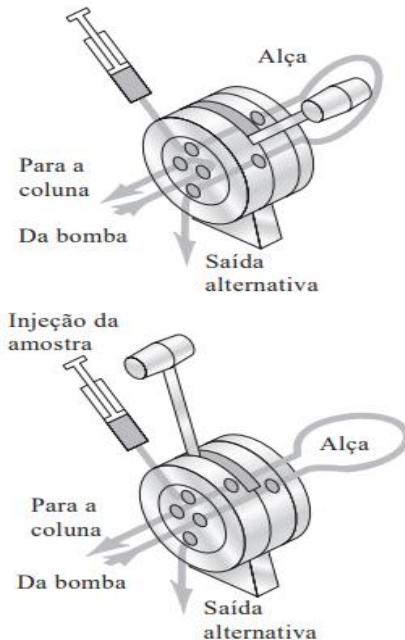
2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o tipo mais empregado de cromatografia por eluição. Devido à sua versatilidade, é muito utilizada para separar e determinar compostos orgânicos, inorgânicos e biológicos. Os principais tipos de CLAE são definidos pelo mecanismo de separação e estes são:

- . Partição ou cromatografia líquido-líquido;
- . Adsorção ou cromatografia líquido-sólido;
- . Troca iônica ou cromatografia de íons;
- . Cromatografia por exclusão;
- . Cromatografia por afinidade;
- . Cromatografia quiral.

Existem três tipos de bombas que são mais utilizadas na CLAE, bomba de seringa acionada por rosca, bomba recíproca e bomba pneumática de pressão constante. Os principais requisitos para bombas instaladas em cromatógrafos incluem habilidade de criar pressões de até 6000 psi, saída livre de pulsação, vazões na faixa de 0,1 a 10 mL/min, reproduzibilidade relativa da vazão de 0,5% e resistência à corrosão a diversos tipos de solventes. O método mais empregado para injeção da amostra é o sistema com alça de amostragem, mostrado na figura 2. As alças são intercambiáveis permitindo uma escolha do volume de injeção da amostra de 5 a 500 µL. Muitos sistemas incorporam amostradores automáticos, podendo assim injetar volumes variáveis (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).

Figura 2 Sistema com alça de amostragem



Fonte: SKOOG et al., 2006

A coluna cromatográfica é parte responsável pela separação dos componentes presentes na amostra injetada, permitindo que esses sejam identificados e quantificados. O alto número de colunas disponíveis, atualmente, está diretamente ligado à versatilidade da CLAE. A evolução dos recheios das colunas, principalmente no tamanho e na especificidade da fase estacionária, acarretou em mudanças na técnica de cromatografia líquida. Atualmente, as colunas cromatográficas são compostas de um tubo de aço inoxidável, fechadas por filtros nas extremidades preservando assim a fase estacionária.

Devido ao avanço na técnica, a detecção deixou de ser visual para ser realizada por detectores de diversos tipos e cada vez mais sensíveis, gerando dados mais precisos em relação às substâncias de interesse e suas concentrações (OLIVEIRA, 2016).

O sistema de detecção, a ser empregado na CLAE, vai depender da natureza da amostra e deve apresentar um volume morto pequeno visando diminuir a banda extra da coluna e ser compatível com a vazão aplicada pelas bombas. A tabela 1 lista os sistemas de detecção mais utilizados e suas principais propriedades.

Tabela 1 - Desempenho dos Detectores para CLAE

Detector para CLAE	Disponível Comercialmente	LD em Massa (típico)	Faixa Linear (décadas)
Absorbância	Sim	10 pg	3-4
Fluorescência	Sim	10 fg	5
Eletroquímico	Sim	100 pg	4-5
Índice de Refração	Sim	1 ng	3
Condutividade	Sim	100 pg – 1 ng	5
Espectrometria de massa	Sim	<1 pg	5
FTIR	Sim	1 µg	3
Espalhamento de luz	Sim	1 µg	5
Atividade ótica	Não	1 ng	4
Seletivo de elementos	Não	1 ng	4-5
Fotoionização	Não	<1 pg	4

Fonte: SETTLE; et al., 1997

A combinação de CLAE com detectores de espectrometria de massas vem ganhando espaço em laboratórios analíticos, podendo ser visto como a fusão ideal entre separação e detecção, proporcionando uma alta seletividade.

2.3 Validação de Método Analítico

Para garantir a segurança, eficácia, qualidade e credibilidade de resultados de análises realizadas em laboratórios, autoridades reguladoras desenvolveram uma série de requisitos que, se cumpridos, atestam que o método analítico é adequado ao fim que se destina. Essa verificação dos requisitos e toda sua documentação chama-se validação. Para obter sucesso em uma validação é necessária a presença de profissionais qualificados, padrões e reagentes certificados e no prazo de validade, equipamentos calibrados e verificados e ambiente laboratorial adequado (DIAS, 2019).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão que determina quais requisitos devem ser seguidos durante a validação de um método analítico aplicado na indústria alimentícia. Todos os requisitos estão descritos na Resolução da

Diretoria Colegiada (RDC) número 166 datada de 24 de julho de 2017. De acordo com a ANVISA, os parâmetros de validação a serem seguidos são: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez (ANVISA, 2017).

2.3.1 Seletividade

A seletividade de um método deve ser demonstrada pela capacidade de identificar o composto de interesse, inequivocamente, na presença de outros componentes presentes na amostra, como impurezas e diluentes (ANVISA, 2017).

Pelo estudo da seletividade pode-se visualizar possíveis interferências que podem levar a uma diminuição ou amplificação do sinal do analito de interesse ou resposta instrumental do analito. A seletividade pode ser estabelecida realizando comparação com uma amostra sem o analito de interesse, com outra amostra com sua presença e concentração conhecida ou realizando a adição de padrão na amostra branca (DIAS, 2019)

2.3.2. Linearidade

A linearidade tem o objetivo de demonstrar a capacidade de resposta do método analítico em obter resultados diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para estabelecer a linearidade deve-se utilizar pelo menos 5 (cinco) amostras com concentrações diferentes, devendo seguir o intervalo da concentração teórica de cada solução, este ensaio deve ser realizado em triplicata. O coeficiente de correlação de linearidade deve estar acima de 0,990 demonstrando que existe uma baixa dispersão entre os valores obtidos (ANVISA, 2017).

2.3.3 Precisão

A precisão deve demonstrar a proximidade entre resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método em validação. Deve ser expressa por meio de repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. Dizer que um método é preciso significa dizer que por meio de ensaios independentes repetidos com a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas vão obter resultados muito próximos, a um valor central (ANVISA, 2017).

A repetibilidade considera várias medições realizadas nas mesmas condições, mesmo técnico, mesmo laboratório e mesmo equipamento, devendo-se obter uma proximidade entre os valores encontrados e sendo realizada em triplicata em amostras com diferentes concentrações: baixas, médias e altas. A precisão também pode ser determinada com 6 ensaios de uma amostra em triplicata, em uma determinada faixa de concentração. A precisão intermediária estabelece a precisão dos resultados dos ensaios realizados nas mesmas condições descritas, contudo os ensaios devem ser realizados em dias diferentes. A reprodutibilidade é validada quando aplica-se o método com técnicos, laboratórios e equipamentos diferentes, mas mantendo todas as condições estipuladas pelo método (DIAS, 2019).

2.3.4 Exatidão

A exatidão de um método deve ser demonstrada pela concordância entre os resultados obtidos pelo método em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo 9 (nove) determinações, contemplando concentrações baixas, médias e altas com 3 (três) triplicadas em cada nível. Podendo realizar comparações de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão.

Exatidão é expressa pela equação 1 pela relação entre concentração média, obtida experimentalmente, com a concentração teórica, acrescidos dos valores de confiança.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (1)$$

Quando a exatidão é determinada a partir de um método anteriormente validado deve-se considerar, em substituição ao termo “concentração teórica” a concentração do analito determinado por meio desse método (ANVISA, 2017).

2.3.5 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção é a menor concentração de um analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não pode ser quantificado. Sua determinação por ser demonstrada pelo método visual da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração. Para métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela razão do sinal-ruído que deve ser maior ou igual a 2:1.

Para determinação, considerando valores da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado pela equação 2:

$$LD = 3,3 \cdot \frac{\sigma}{IC} \quad (2)$$

Em que: IC é a inclinação da reta da curva de calibração, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo 3 (três) curvas de calibração com concentrações próximas ao suposto limite de detecção, a partir do desvio padrão residual da linha de regressão ou da estimativa do ruído proveniente da análise do branco. (ANVISA, 2017)

O limite de quantificação é a menor quantidade que um analito, em uma determinada amostra. Pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. Para determinação, baseada nos parâmetros da curva analítica, o limite de quantificação pode ser calculado pela equação 3:

$$LQ = 10 \cdot \frac{\sigma}{IC} \quad (3)$$

2.3.6 Robustez

Um método pode ser considerado robusto quando mantém seu nível de confiabilidade mesmo quando sofre pequenas e estudadas variações nos parâmetros. Nos testes de robustez, ensaios estatísticos são aplicados que examinam os efeitos das alterações em diferentes variáveis do método. Na CLAE, essas variações referem-se a diferentes tipos de coluna, temperatura e fluxos. De modo geral, os testes de robustez servem para indicar fatores que podem influenciar a resposta do método no resultado.

3. Materiais e métodos

A validação dessa metodologia possui caráter quantitativo, pois o método é aplicado para controle de qualidade aplicado na indústria alimentícia. Foi utilizada metodologia de pesquisa experimental *Ex-post Facto*, pois os ensaios analíticos foram realizados antes da escrita desse trabalho de conclusão de curso (VAN DALEN, 1971).

3.1 Materiais

3.1.1 Amostra de referência

Para a validação utilizou-se uma amostra como referência interna, fornecida para realização de testes de proficiência.

3.1.2 Padrão de referência

Para a validação utilizou-se um padrão de Vitamina B9 com certificado ISO GUIDE 34 possuindo 98,0% de pureza.

3.1.3 Equipamentos

- Balança, sensibilidade analítica de precisão 0,1 mg
- Balança, carga superior, sensibilidade de precisão 0,01 g
- Vortex
- Banho ultrassônico
- Micropipetas 500 µl a 5000 µl
- Medidor de pH
- Cromatógrafo líquido com detector UV-visível acoplado
- Coluna RP8, 250 mm x 4,6 mm, 5µ com pré-coluna compatível

3.1.4 Reagentes

- Ácido fólico, USP ou equivalente CAS # 59-30-3
- Acetonitrila, grau UV
- Metanol, grau UV
- Ácido acético glacial
- Trietilamina
- Ácido fosfórico, 85%
- Hidróxido de sódio, 50%
- Fosfato de hidrogênio dissódico
- Citrato trissódico
- Papaína
- Água destilada

3.2 Método

O método se baseia na digestão enzimática da amostra com papaína seguida de limpeza e separação do analito de interesse utilizando colunas de extração de fase solida e quantificação por cromatografia líquida com detector UV-visível acoplado. O método utilizado foi desenvolvido pelo centro de pesquisa e desenvolvimento da empresa, sendo esta a detentora dos seus direitos.

3.2.1 Preparo das soluções utilizadas

- **Solução tampão citrato**

Em um béquer, deve-se pesar 150 g de citrato trissódico. Dissolver com 1000 mL de água destilada e ajustar o pH para 7,0 com algumas gotas de ácido acético glacial.

- **Solução tampão fosfato**

Em um béquer, deve-se pesar 6,3g de hidrogenofosfato dissódico. Dissolver com 900 mL de água destilada e ajustar o pH a 7,0 com ácido orto-fosfórico 85%.

- **Solução de Papaína**

Em um bêquer, pesar 4 g de papaína de dissolver com 100 ml água destilada.

- **Fase Móvel A**

Em um bêquer, adicionar 15 mL de ácido acético glacial com 3000 mL de água destilada. Com auxilio de uma pipeta de vidro, adicionar 3 mL de trietilamina e ajustar o pH para 5 com hidróxido de sódio 50%. Filtrar sob vácuo e colocar no banho ultrassônico por 30 minutos.

- **Fase Móvel B**

Em um bêquer, misturar 600 mL da Fase móvel A com 400 mL de acetonitrila. Colocar em ultrassom por 30 minutos.

- **Preparo da solução Padrão (solução estoque)**

Em um balão volumétrico de 50 mL, deve-se pesar com precisão de 0,1 mg, 45 mg do padrão de vitamina B9 anidro. Dissolver e avolumar o balão com uma solução de tampão preparada com o fosfato de hidrogênio dissódico.

- **Preparo da solução padrão intermediária I**

Em um balão volumétrico de 100 mL, pipetar 2 mL da solução padrão estoque. Diluir e avolumar o balão com água destilada.

- **Preparo da solução intermediária II**

Em um balão volumétrico de 100 mL, pipetar 4 mL da solução intermediaria. Diluir e avolumar o balão com água destilada.

- **Preparo da curva analítica**

A curva analítica deve ser preparada conforme a tabela 2, utilizando a solução intermediaria II e os balões devem ser avolumados com a solução tampão de citrato trissódico.

Tabela 2 - Curva analítica de Ácido Fólico

Padrão	Volume pipetado da Solução intermediária II em mL	Volume do Balão Volumétrico em mL	Concentração em µg / mL de vitamina B9
P1	0,125	25	0,0035
P2	0,5	25	0,0141
P3	1	25	0,0282
P4	2	25	0,0564
P5	4	25	0,1129
P6	5	25	0,1411

Fonte: Arquivo pessoal

3.2.2 Rota analítica

Em um balão volumétrico de 100 mL, pesar uma quantidade específica da amostra previamente homogeneizada e dissolvê-la com 60 mL de água destilada. Adicionar 5 mL da solução de papaína e incubar em banho térmico a 65°C durante 15 minutos. Após ambientação avolumar o balão para 100 mL. Filtrar a amostra em papel filtro.

Com auxílio de um coletor conectado a uma bomba a vácuo, limpar e ativar a coluna de extração de fase solida (SPE). Filtrar uma determinada alíquota da amostra pela coluna SPE, alterar a posição do coletor para coleta e eluir a amostra com a solução tampão fosfato. Transferir toda a coleta para um balão de 25 mL e avolumar com a solução de tampão fosfato. Filtrar em um filtro de 0,45 µm com auxílio de uma seringa para um vial específico para CLAE.

Injetar em CLAE previamente estabilizado. Essa amostra tem estabilidade de 24 horas.

3.2.3 Condições cromatográficas

Fluxo: 1.0 mL/min

Comprimento de onda: 350 nm

Temperatura da coluna: 45°C

Volume de injeção: 100 µl

Tempo de corrida: 25 min

Gradiente: O gradiente das fases móveis está demonstrado na tabela 3 pela porcentagem de cada fase por minuto da corrida analítica

Tabela 3 - Gradiente da fase móvel

Tempo (min)	% Fase Móvel A	% Fase Móvel B
0	95	5
10	45	55
11	5	95
15	5	95
20	95	5
25	95	5

Fonte: Arquivo pessoal

4. Resultados e discussões

4.1 Validação do método analítico por CLAE

A validação foi realizada de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 166 datada de 24 de julho de 2017 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária para os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Todos os ensaios foram realizados dentro do laboratório de controle de qualidade da empresa detentora do método, utilizando material fornecido para testes de proficiência interno como referência. Todos os cálculos e dados estatísticos, presentes nesse trabalho, foram realizados com o auxílio do Microsoft Excel® 2016.

4.1.1 Cálculo do teor de vitamina B9

Cálculo do teor de vitamina B9, equação 4:

$$\text{Ácido Fólico } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = \frac{(Y-A)}{B} \times \frac{V1}{m} \times \frac{V3}{V2} \quad (4)$$

No qual:

Y = altura do pico ou área do pico do ácido fólico na solução da amostra

A = Interceptação (eixo y)

B = Inclinação da curva

m = Peso da amostra (g)

V1 = Volume inicial da diluição da amostra

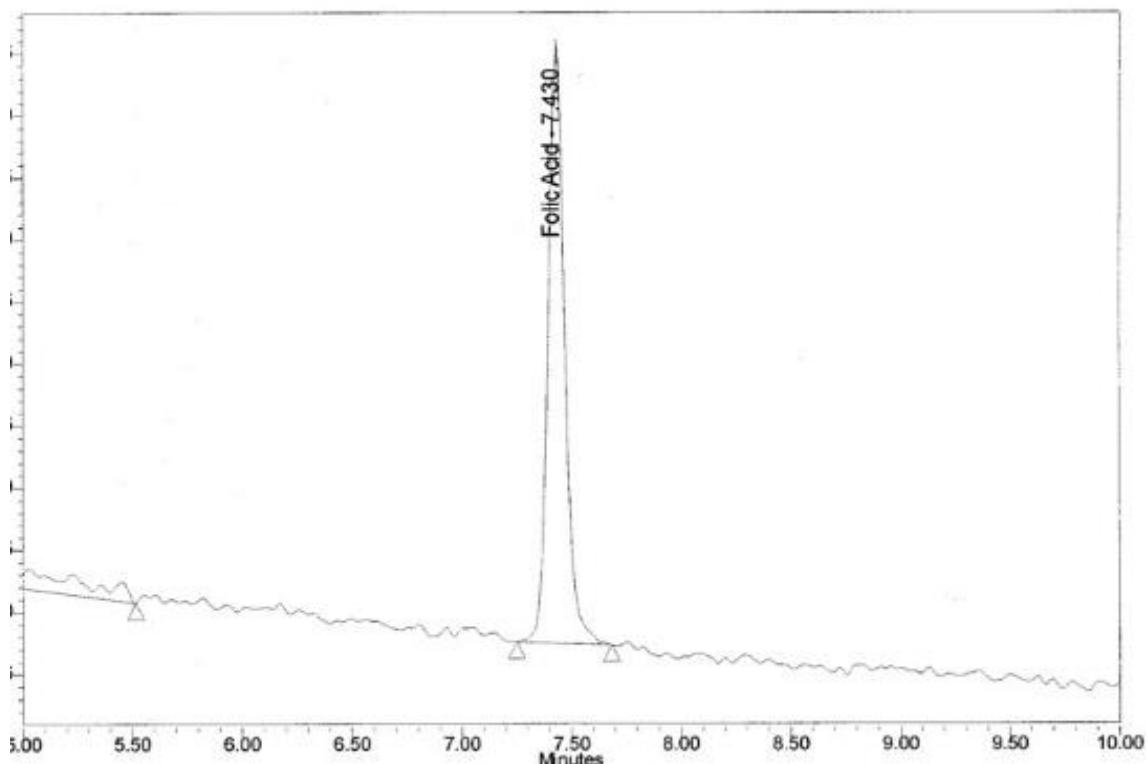
V2 = Volume da solução da amostra colocada na SPE

V3 = Volume de eluente coletado da SPE

4.1.2. Seletividade

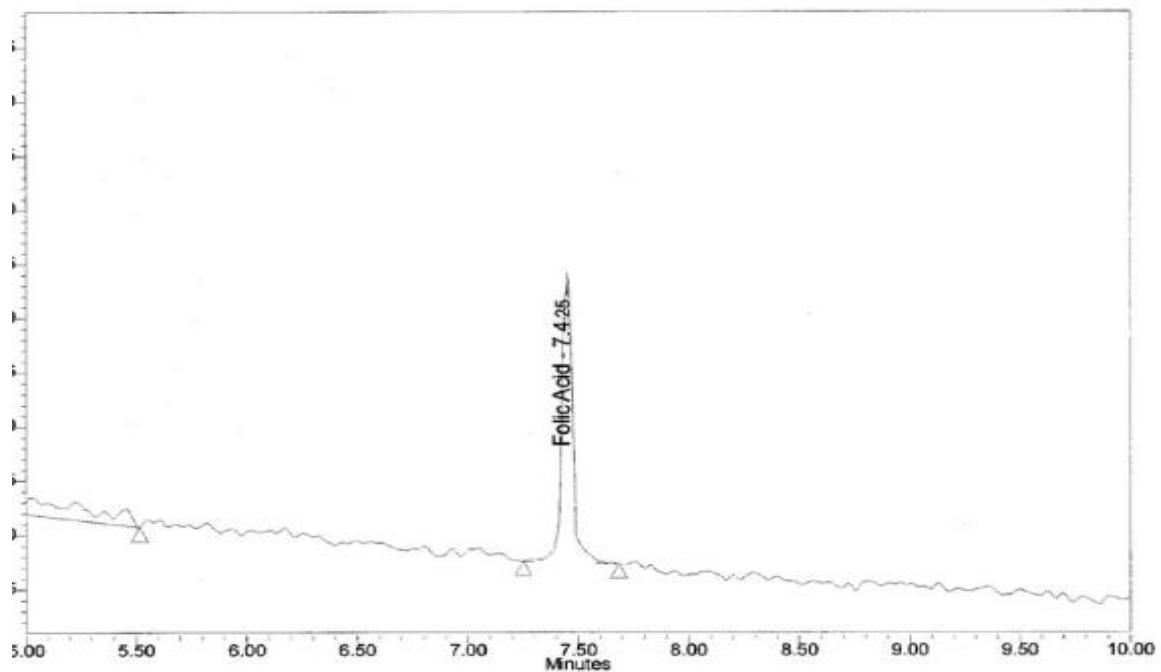
Para avaliar a seletividade do método, analisa-se a injeção da solução padrão no ponto 6 da curva analítica (Figura 3), uma injeção da solução padrão equivalente no ponto 3 da curva analítica (Figura 4), uma amostra branca que passou por todas as etapas da rota analítica (Figura 5). A Figura 6 representa um cromatograma da amostra de referência utilizada na validação.

Figura 3: Cromatograma do ponto 6 da curva analítica



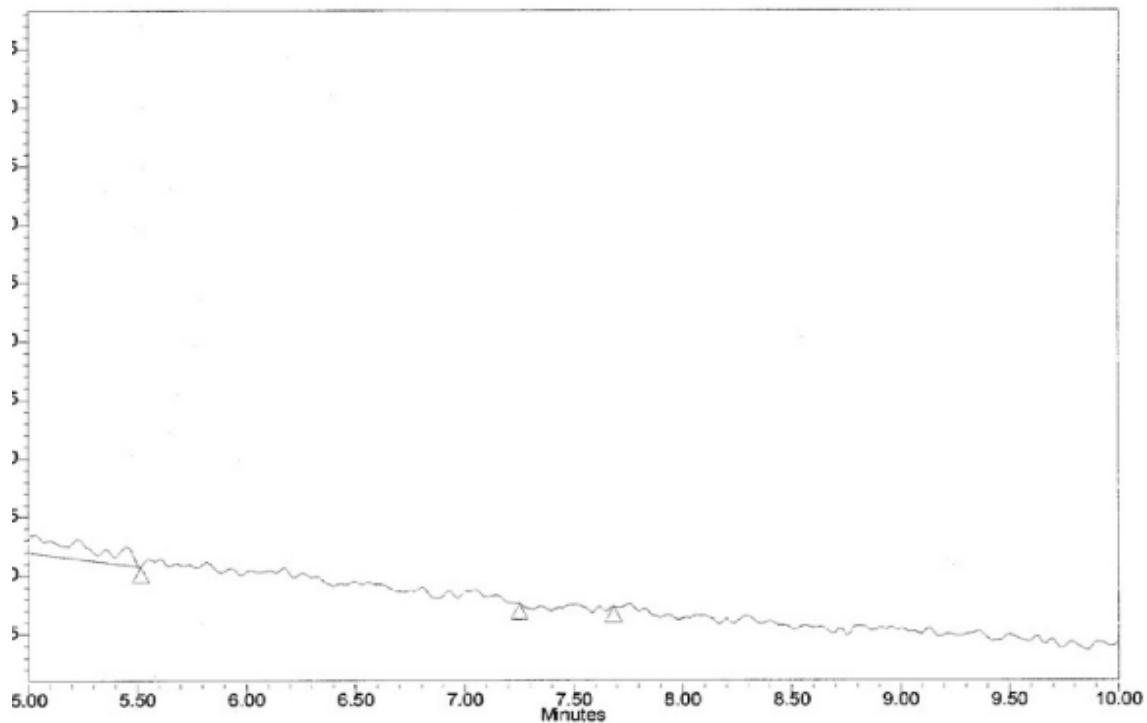
Fonte - Arquivo pessoal

Figura 4: Cromatograma do ponto 3 da curva analítica



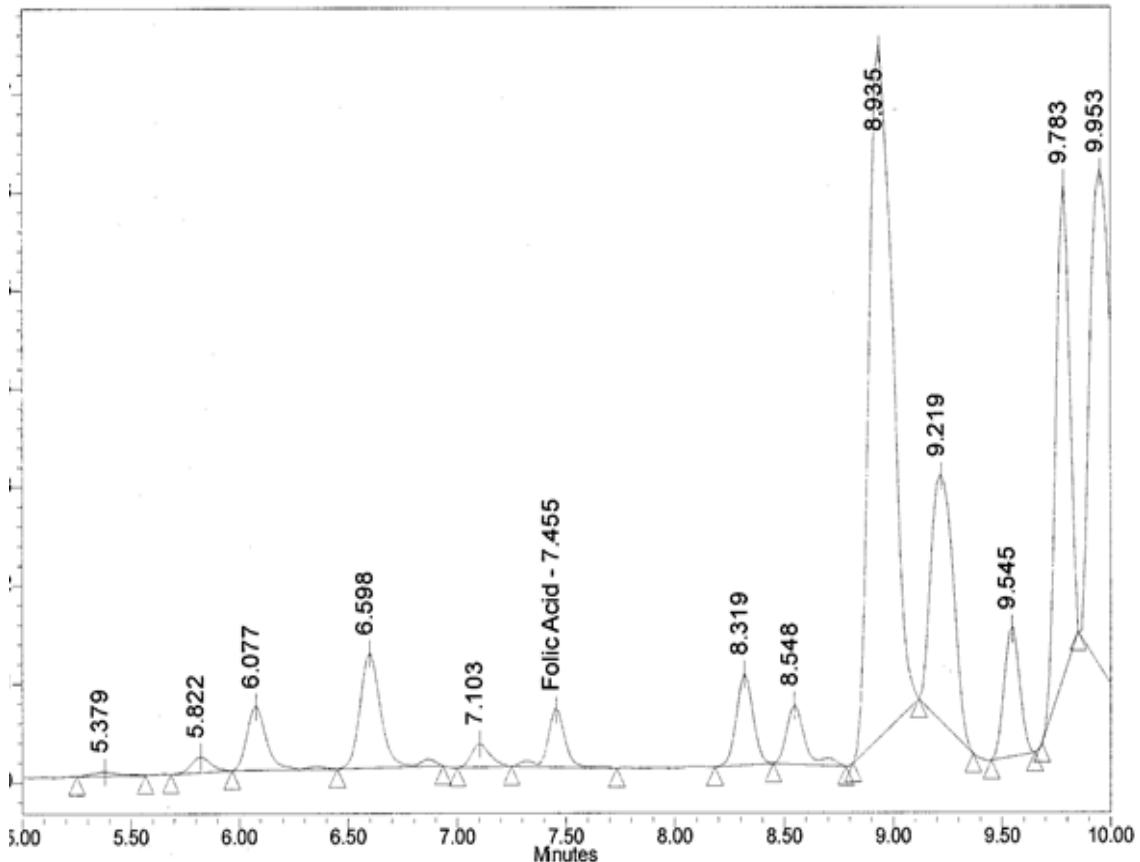
Fonte - Arquivo pessoal

Figura 5: Cromatograma da injeção do branco



Fonte - Arquivo pessoal

Figura 6: Cromatograma da amostra de validação



Fonte - Arquivo pessoal

4.1.3 Linearidade

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos nos ensaios realizados, visando estudar a resposta do método para a mesma amostra com diferentes concentrações. Todos os cálculos foram baseados na resposta da CLAE em relação à altura, a tabela 4 mostra a resposta de sete injeções para cada nível de concentração. A concentração encontrada, a recuperação e o coeficiente de variação foram calculados com o auxílio do Microsoft Excel® 2016

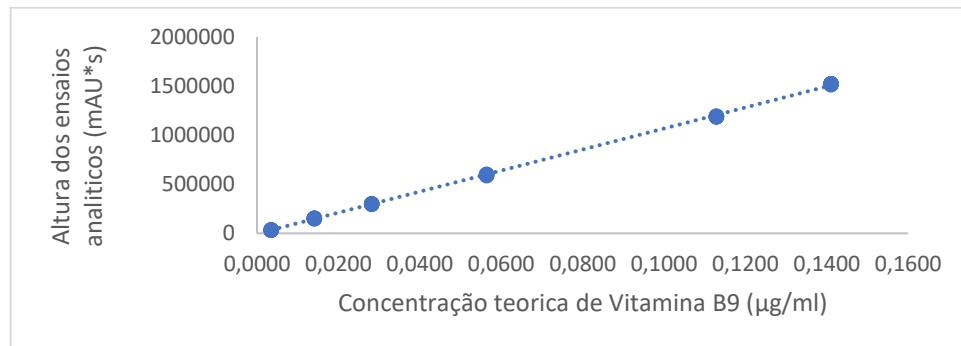
Tabela 4 -Resultados do teste de linearidade

Nível de concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Altura (mAU*s)	Altura média (mAU*s)	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
0,0035	33845				
	34702				
	34468				
	34315	34302,43	0,0036	101	0,85
	34123				
	34532				
0,0141	34132				
	154601				
	151006				
	151385				
	151326	152156,57	0,0146	103	0,85
	153132				
0,0282	151385				
	152261				
	299125				
	296979				
	298539				
	301041	299232,14	0,0283	100	0,61
0,0564	301202				
	300705				
	297034				
	598073				
	600825				
	600463				
0,1129	597105	596433,57	0,0560	99	0,73
	587848				
	595478				
	595243				
	1191414				
	1187571				
0,1411	1189451				
	1194337	1190056,43	0,1114	99	0,20
	1188278				
	1191028				
	1188316				
	1524053				
	1522793				
	1523665				
	1522800	1521527,86	0,1424	101	0,21
	1519879				
	1522555				
	1514950				

Fonte- Arquivo pessoal

Figura 7 mostra o gráfico da regressão linear realizada com os valores da altura dos picos na abcissa e a concentração teórica do padrão no eixo das ordenadas.

Figura 7 - Gráfico de linearidade



Fonte -Arquivo pessoal

A linearização realizada com os dados obtidos, nos primeiros ensaios, forneceu um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9997, mostrando que o método possui uma forte correlação linear entre a concentração do analito e a altura do pico cromatográfico, considerando o intervalo do ponto 1 e ponto 6 da curva analítica. Os critérios foram aceitos, portanto, o método pode ser considerado linear para esse intervalo.

4.1.4 Exatidão

A exatidão foi determinada a partir de um ensaio de recuperação, foram analisadas, em triplicadas, soluções contendo 80%, 100% e 120% de vitamina B9 em sua composição. Todos os resultados foram analisados e tabelados na tabela 5.

Tabela 5- Resultados do ensaio de exatidão

Solução	Resultados (ug/100g)		Recuperação (%)	DPR (%)
0%	12,98	13,05	13,02	
	13,13	13,18	13,25	99,4
	13,02	13,18	13,25	0,10
100%	16,49	16,65	16,57	
	16,69	16,75	16,78	101,0
	16,74	16,72	16,65	0,09
120%	20,03	20,05	20,12	
	19,98	20,13	20,05	99,9
	19,06	19,03	19,5	0,45

Fonte- Arquivo pessoal

O parâmetro está validado uma vez que seus critérios de aceitação foram atendidos, tanto parâmetros de recuperações médias quanto recuperações individuais. O método manteve dentro da faixa estipulada de 95% a 105%.

4.1.5 Precisão

Para verificar a precisão do método, realizou-se seis ensaios analíticos em triplicatas, utilizando uma amostra de referência fornecida para testes de proficiência de mesmo material para o qual esse método se destina. A amostra será identificada como BFF (Baby Food Formula) de concentração conhecida e validada de 16,50 ug/100g. A tabela 6 mostra os valores encontrados.

Tabela 6- Resultados para teste de exatidão

Ensaio	Valor Calculado (ug/100g)	Média (ug/100g)	Recuperação (%)
1	16,92		
	16,85	16,84	102,06
	16,75		
2	16,49		
	16,65	16,57	100,42
	16,57		
3	16,85		
	16,79	16,86	102,20
	16,95		
4	15,92		
	15,85	15,85	96,04
	15,77		
5	16,69		
	16,75	16,74	101,45
	16,78		
6	16,74		
	16,72	16,70	101,23
	16,65		

Fonte - Arquivo pessoal

Os parâmetros foram atendidos uma vez que os seus critérios de aceitação foram validados. Os resultados foram avaliados e o método apresentou um desvio padrão relativo de 0,36, estando abaixo do valor limite de 5% estipulado.

4.1.6 Precisão intermediária

Para avaliar a precisão intermediária, realizou-se uma nova sequência de ensaios em outro dia, nas quais todas as soluções utilizadas foram preparadas novamente. Os valores encontrados estão especificados na tabela 7.

Tabela 7- Resultados obtidos no teste para precisão intermediaria

Ensaio	Valor Calculado (ug/100g)	Média (ug/100g)	Recuperação (%)
1	16,43		
	16,35	16,43	99,58
	16,51		
2	16,2		
	16,16	16,14	97,80
	16,05		
3	16,78		
	16,75	16,78	101,72
	16,82		
4	15,98		
	15,96	15,94	96,63
	15,89		
5	16,45		
	16,43	16,46	99,78
	16,51		
6	16,23		
	16,25	16,22	98,32
	16,19		

Fonte - Arquivo pessoal

Na validação da precisão intermediária, analisa-se os resultados obtidos nos dois ensaios. A comparação entre os resultados não mostrou diferença significativa, uma vez que o segundo ensaio apresentou um desvio padrão de 0,27, mostrando que o método atende os parâmetros de reproduzibilidade.

4.1.7 Limites de Detecção e Quantificação

Para a determinação tanto do limite de detecção quanto limite de quantificação utiliza-se como base a variação média do sinal ruído. Para o limite de detecção utiliza-se a relação de 3 vezes a média de oscilações do sinal ruído. Para o limite de quantificação, utiliza-se a relação 10 vezes a média de oscilações do sinal ruído.

Aplicando as relações descritas, os valores encontrados foram 0,1 ug/100g para detecção e 0,3 ug/100g para quantificação, para a matriz analisada.

4.1.8 Análise de custos e impactos na rotina analítica

A inclusão da quantificação de vitamina B9 por CLAE surgiu pela necessidade de substituir um método microbiológico, anteriormente utilizado, que possuía quantificação por espectrofotometria. Considerando o custo absoluto por amostra, o método por CLAE possui um aumento considerável de 60% no valor final. Quando se dilui o novo método nos custos fixos do laboratório, uma vez que o mesmo equipamento de cromatografia é utilizado em outras análises, pode-se perceber aumento no custo total da análise de apenas 20%.

Mesmo o novo método possuindo um custo relativamente mais alto continua sendo mais vantajoso, uma vez que o método microbiológico necessita de 36 horas de inoculação, retirando um analista da rotina do laboratório por aproximadamente dois dias de trabalho. Outro aspecto positivo é o compartilhamento de equipamentos, uma vez que o método microbiológico necessita de equipamentos e vidrarias utilizados somente para esse método.

4.1.9 Robustez

Esse parâmetro não pode ser avaliado uma vez que todos os métodos analíticos são desenvolvidos pelo centro de pesquisa e desenvolvimento da empresa e por política interna da empresa as unidades não podem fazer mudanças maiores na rota analítica.

5. Conclusão

Considerando todos resultados obtidos durante a validação, pode-se dizer que a implementação do método de quantificação de vitamina B9 por cromatografia líquida de alta eficiência será realizada uma vez que atende todas as especificações determinadas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 166 datada de 24 de julho de 2017 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. O método apresentou:

- boa seletividade, com boa definição de picos e sem interferências de reagentes ou outros compostos no mesmo tempo de eluição da vitamina B9.
- forneceu resposta muito positiva no ensaio de linearidade, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9997, mostrando uma ótima correção linear para o intervalo de estudo.
- resultados satisfatórios nos ensaios de exatidão de precisão, apresentando uma recuperação média de 100,1%.
- a repetibilidade e reproduzibilidade do método forneceu valores de desvio padrão relativo de 0,36 e 0,27 respectivamente.
- os valores para os limites de detecção e quantificação foram 0,1 ug/100g e 0,3 ug/100g respectivamente, mostrando que o método possui uma alta sensibilidade sendo possível detectar e quantificar valores muito abaixo da média da concentração de vitaminas em produtos os quais esse método se destina.

Uma das principais vantagens do novo método em relação ao método antigo, é a necessidade de apenas um analista e um turno para realizar um ensaio com até 25 amostras. O compartilhamento de equipamento com outras análises, permitindo assim a diluição dos custos da análise, torna o método economicamente viável ao laboratório.

Portanto, pode-se dizer que todos os objetivos traçados para essa validação foram atingidos, uma vez que todos os parâmetros analisados estão dentro das normas, mostrando que o método proposto cumpre todos os requisitos legais para sua execução. Dessa forma, conclui-se que o método de quantificação de vitamina B9 por cromatografia líquida de alta eficiência está validado e pode ser incluído na rotina do laboratório de controle de qualidade.

Referências

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Resolução da diretoria colegiada rdc nº166, de 24 de julho de 2017.** Disponível em : <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/353660>

CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos.** 2000. 1 v. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências de Alimentos, Universidade de Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

DIAS, F. R. S. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos.** 2019. 15 f. Monografia (Especialização) - Curso de Farmácia, faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GIACOMINI, L. Z. **Quantificação de vitamina a em concentrados polivitamínicos por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

LATHAM, M. C. **Human nutrition in the developing world.** Food & Agriculture Org, Rome , v.1, 1997.

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

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.

OLIVEIRA, E. M. **A coluna de cromatografia líquida: uso, controles e descarte.** 2016. 41 f. Monografia (Especialização) - Curso de Farmácia, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, jul. 2004.

SILVA, W. J. M. **Ácido fólico: validação do método espectrofotométrico.** 2012. 68 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências de Alimentos, Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**, 5^a edição, Editora Bookman, 2006.

ZANCUL, M. S. **Fortificação de alimentos com ferro e vitamina a.** Medicina, Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, v. 37, n. 1, p. 45-50, 30 jun. 2004.

VAN DALEN, Deobold B. e MEYER, William J. **Manual de tecnica de la investigacion educacional.** Buenos Aires: Editorial Paidos, 1971.

SETTLE, Frank. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.** New Jersey: Prentice Hall, 1997. 1024 p.