

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS POR CLAE PARA ANÁLISE DAS VITAMINAS B₁, B₂, B₆ E NIACINA NATURALMENTE PRESENTES EM FARINHA DE CEREAIS

Ana Elisa Ferreira Presoto e Lígia Bicudo de Almeida-Muradian*

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508-900 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 16/11/06; aceito em 27/9/07; publicado na web em 19/3/08

VALIDATION OF HPLC METHODS FOR ANALYSIS OF VITAMINS B₁, B₂, B₆ AND NIACIN NATURALLY PRESENT IN CEREAL FLOURS. Complex B vitamins are present in some cereal foods and the ingestion of enriched products contributes to the recommended dietary intake of these micronutrients. To adapt the label of some products, it is necessary to develop and validate the analytical methods. These methods must be reliable and with enough sensitivity to analyze complex B vitamins naturally present in food at low concentration. The purpose of this work is to evaluate, with validated methods, the content of vitamins B₁, B₂, B₆ and niacin in five cereal flours used in food industry (oat, rice, barley, corn and wheat).

Keywords: vitamin; validation; flour.

INTRODUÇÃO

Os cereais e derivados contribuem em grande parte para a ingestão calórica da população brasileira. A região que apresenta menor participação relativa deste grupo de alimentos no total de calorias ingeridas por dia é a Norte, com 29,6% de 1884 kcal/dia per capita, dos quais 1,2% correspondem somente à farinha de trigo. As outras regiões seguem com a participação de 36,7; 36,9; 37,0 e 38,7%, respectivamente, para as regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste.¹

O principal produto derivado de trigo é a farinha, em seguida o farelo e o germe de trigo. O consumo per capita brasileiro é de 50 kg de farinha de trigo/ano, sendo o pão responsável por 54%, as massas por 12%, os biscoitos por 11%, a farinha de uso residencial por 10% e para as outras aplicações temos 12%.² Já para o milho, atualmente somente cerca de 15% de produção nacional se destina ao consumo humano e, mesmo assim, de maneira indireta na composição de outros produtos. Isto se deve principalmente à falta de informação sobre o milho e maior divulgação de suas qualidades nutricionais.³

Os cereais e derivados, além de contribuírem para a ingestão calórica, também contribuem para a ingestão de micronutrientes relevantes, como as vitaminas e minerais.

Apesar de estudos que comprovam as chamadas dietas bem-balanceadas suficientes para suprir as quantidades de vitaminas preconizadas, devemos considerar que nos tempos atuais cada vez mais consumimos produtos industrializados e até mesmo somos impossibilitados de ingerir uma dieta 100% adequada quanto aos teores desses nutrientes essenciais. Assim, alimentos naturalmente ricos em vitaminas ou têm seus teores perdidos no processamento ou mesmo não são usualmente ingeridos, podendo ser enriquecidos com vitaminas e ferro.⁴ Tais produtos devem ter sua qualidade garantida, principalmente quanto aos teores desses nutrientes, ao considerarmos que as vitaminas apresentam quantidades recomendadas de ingestão (IDR), podendo algumas delas causar toxicidade ou, ao contrário, não serem ingeridas de acordo com os objetivos da fortificação.

Na rotulagem nutricional obrigatória de alimentos industrializados, além da declaração de carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio, as

vitaminas e os minerais optativamente podem ser declarados, sempre e quando estiverem presentes em quantidade igual ou maior a 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo.⁵

Assim, se fazem necessários o desenvolvimento e a validação de metodologias para análise de micronutrientes em farinhas de cereais, visando garantir os teores declarados nos rótulos de produtos industrializados fortificados com vitaminas e minerais que as utilizam como matéria-prima.

Existe uma tendência mundial em implantar um sistema de garantia da qualidade com vistas ao reconhecimento da capacidade dos laboratórios em realizar ensaios analíticos. Para auxiliar na implantação desse sistema e padronizar os procedimentos adotados, existem diretivas do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial⁶ que discutem a validação de metodologia analítica. A realização, pelos laboratórios de ensaio, dos itens aplicáveis na validação de metodologia tem como objetivo o alcance da proficiência técnica desses laboratórios, baseada na sua capacidade de operar de acordo com o proposto, além de demonstrar o comprometimento em realizar serviços de ensaio com a confiabilidade metrológica necessária e do compromisso de melhor atender aos seus clientes.

A validação deve ser efetuada para um novo método, métodos já existentes e revistos para incorporar melhorias ou resolver problemas analíticos e métodos estabelecidos e que passam a ser utilizados por novos analistas, equipamentos ou laboratórios. A extensão da validação depende da natureza da alteração.⁷

As características de desempenho de um método são obtidas através da determinação dos parâmetros de validação do método.^{6,7} Assim, segundo recomendações da NBR17025,⁸ os principais requisitos e parâmetros a serem estudados durante o desenvolvimento do processo analítico para fins de validação do método em uma matriz são especificidade, seletividade, linearidade, sensibilidade, faixa de trabalho, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e precisão.

Os objetivos do presente trabalho foram validar metodologias para determinação das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina em farinhas de cereais e analisar amostras de farinha de trigo, milho, arroz, cevada e aveia que são utilizadas como matéria-prima de produtos industrializados fortificados com vitaminas e minerais.

*e-mail: ligiabi@usp.br

PARTE EXPERIMENTAL

Material

Segundo levantamento bibliográfico realizado em 2003 pelo Departamento Econômico da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), dentre os maiores produtores brasileiros de farinha existem 19 grandes fabricantes de farinha de trigo, 8 de farinha de milho, 3 de farinha de aveia e apenas um de farinha de cevada e de farinha de arroz. No presente trabalho, para as validações das metodologias, foram avaliados os teores das vitaminas hidrossolúveis B₁, B₂, B₆ niacina em farinha de aveia e para as análises finais, foram coletadas 12 amostras procedentes de 8 diferentes fornecedores.

Métodos

A extração das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina foi realizada em uma mesma etapa, conforme descrito por Moreschi⁹ e Presoto e Almeida-Muradian,¹⁰ em 5 g de amostra em meio ácido, através de autoclave (30 min/100 °C) e reação enzimática (0,5 g de enzima diastase fúngica em banho-maria por 2 h/42 °C). Os extratos foram avolumados para 100 mL, filtrados através de papel de filtro e o filtrado foi recolhido em erlenmeyer âmbar.

O método de análise cromatográfico da vitamina B₁ foi baseado no procedimento descrito por Ollilainen *et al.*¹¹ e Presoto e Almeida-Muradian.¹⁰ As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 (0,228% KH₂PO₄.3H₂O) dimetilformamida (85:15); fluxo: 1 mL/min; volume de injeção: 20 µL; coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 µm/125 x 4,0 mm com pré-coluna 5 µm/4x4 mm Lichrospher; detecção por fluorescência: Ex 368 nm; Em 440 nm.

Para preparo da solução padrão de vitamina B₁, uma massa de 50,0 mg de mononitrato de tiamina foi transferida com água ultrapura e 5 mL de ácido clorídrico 1 M para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Esta solução foi diluída a fim de se obter uma solução final de concentração 10 µg de mononitrato de tiamina/mL. A curva padrão utilizada apresentava as seguintes concentrações, em ng/mL: 25, 50, 100, 200 e 500.

Para a reação de conversão da tiamina em tiocromo, foram adicionados aproximadamente 2 mL de água deionizada e 3 mL de solução de ferricianeto de potássio em meio básico a cada 1 mL de solução padrão diluída, em balões volumétricos âmbar de 10 mL. O volume total foi agitado em agitador de tubos e colocado em repouso por 2 min para que ocorresse a reação. Após este tempo, foram adicionados 450 µL de ácido ortofosfórico 85%. A solução foi então resfriada e o volume final foi completado com água deionizada. Estas soluções foram injetadas no cromatógrafo imediatamente após o preparo.

O método de análise da vitamina B₂ foi baseado no procedimento descrito por Augustin¹² e Presoto e Almeida-Muradian,¹⁰ com modificação na composição da fase móvel. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 (0,228% KH₂PO₄.3H₂O) e dimetilformamida (85:15); fluxo: 1,5 mL/min; volume de injeção: 20 µL; coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 µm/125x 4,0 mm com pré-coluna 5 µm / 4x4 mm Lichrospher; detecção por fluorescência: Ex 450 nm; Em 530 nm.

Para preparo da solução padrão de vitamina B₂, foi pesada uma massa de 25,0 mg de riboflavina, levada à fervura branda, sob agitação, com 70 mL de água ultrapura e 0,6 mL de ácido acético glacial até total dissolução, transferida quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 250 mL com água ultrapura, a fim de se obter uma solução final de concentração 5 µg de riboflavina/mL. A solução padrão concentrada foi diluída a fim de se obter uma curva padrão

com as seguintes concentrações, em ng/mL: 6, 25, 50, 125, 250 e 500.

O procedimento de análise da vitamina B₆ foi baseado no descrito por Kall¹³ e Presoto e Almeida-Muradian.¹⁰ As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel: tampão fosfato pH 2,5 (0,68% KH₂PO₄) com par iônico (0,014% PIC 7) e acetonitrila (96:4); fluxo da bomba: 0,6 mL/min; coluna: C₁₈ de fase reversa Superspher 100 RP-18 *endcapped* 5 µm/ 250 x 4,0 mm com pré-coluna 5 µm/4x4 mm Lichrospher 100 RP-18; detecção por fluorescência: Ex 296 nm; Em 390 nm.

Para preparo da solução padrão de vitamina B₆, as formas cloridrato de piridoxol, cloridrato de piridoxal e dicloridrato de piridoxamina foram diluídas separadamente em água ultrapura a fim de se obter uma solução final de concentração 16 µg/mL. A curva padrão utilizada apresentava as seguintes concentrações, em ng/mL, contendo as três formas da vitamina B₆, uma vez que os três vitâmeros da vitamina B₆ foram analisados simultaneamente: 40, 80, 160, 320, 800 e 1600.

O procedimento de análise para a niacina foi baseado no descrito por Lahély *et al.*¹⁴ e Presoto e Almeida-Muradian.¹⁰ A niacina foi detectada por fluorescência após reação sob radiação ultravioleta (UV). As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel: tampão fosfato (0,954% KH₂PO₄) em solução de 0,76% de peróxido de hidrogênio 30 e 0,1% de solução de sulfato de cobre 5 mM; fluxo: 1,1 mL/min; coluna: C₁₈ de fase reversa Nucleosil 100-5 C₁₈, marca Macherey-Nagel; volume de injeção: 20 µL; reator composto por 12 m de tubulação de tetrafluoretileno (TFE), 0,5 mm de diâmetro interno, enrolada em uma lâmpada negra que emite radiação entre 300 a 400 nm; detecção por fluorescência: Ex 322 nm; Em 380 nm.

Para preparo da solução padrão de niacina, as formas niacina e niacinamida foram diluídas separadamente em água ultrapura a fim de se obter uma solução final de concentração 16 µg/mL. A curva padrão utilizada apresentava as seguintes concentrações, em ng/mL, contendo as duas formas da vitamina PP, uma vez que os três vitâmeros desta vitamina foram analisados simultaneamente: 4, 8, 16, 40, 80, 160, 800 e 1600.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos propostos aplicam-se a matriz cereal. As faixas de teores de cada micronutriente, os limites de detecção e quantificação e a sensibilidade dos métodos estão apresentados na Tabela 1. A sensibilidade foi expressa como a inclinação da reta de regressão.

Quanto ao estudo de linearidade, as Figuras 1 e 1S mostram as curvas de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada, respectivamente, das vitaminas B₁ e B₂. Estas informações para os vitâmeros da vitamina B₆ encontram-se na Figura 2S, para a niacina, na forma de vitâmeros, na Figura 3S.

Tabela 1. Faixas de teores de micronutrientes, limites de detecção e quantificação e sensibilidade dos métodos propostos

Micronutriente	Campo de aplicação (mg de micronutriente/100 g de amostra)	Limite de detecção (mg/100 g)	Limite de quantificação (mg/100 g)	Sensibilidade (unidade de área /massa injetada)
Vitamina B ₁	0,01 – 2,0	0,003	0,01	349512
Vitamina B ₂	0,06 – 1,2	0,004	0,01	20330
Piridoxol	0,04 – 4,0	0,003	0,01	171350
Piridoxal	0,04 – 4,0	0,002	0,01	164649
Piridoxamina	0,05 – 4,5	0,002	0,01	263163
Niacina	0,05 – 2,0	0,009	0,03	12148
Niacinamida	0,05 – 2,0	0,009	0,03	24007

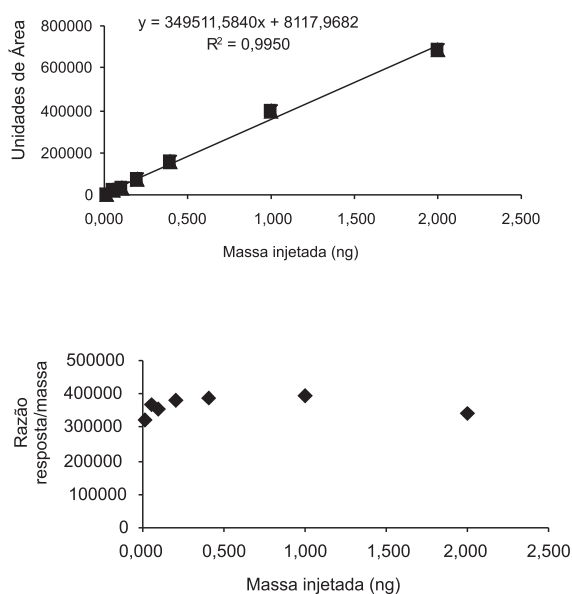


Figura 1. Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B₁

Todos os compostos apresentaram-se lineares nas faixas estudadas e a razão resposta/massa apresentada para cada um não foi independente da concentração em toda faixa estudada apenas para a vitamina B₂. Assim, a faixa linear de trabalho para esta vitamina ficou limitada à região de concentração onde a relação resposta/massa permaneceu praticamente inalterada. Neste trabalho foi adotado um desvio padrão relativo da razão resposta/massa máximo de 10% para considerar a relação resposta/massa inalterada. Assim, a faixa linear de trabalho para a vitamina B₂ foi definida entre 0,60 e 12 ng injetado.

Como as vitaminas B₁, B₂, B₆ e a niacina, encontradas em farinhas de cereais, estão presentes como teores naturais, o limite inferior de concentração de amostra para cada faixa linear de trabalho proposta apresentou-se muito próximo ao limite de quantificação.

Para a niacina, tanto na forma ácida quanto na forma amida, apesar do desvio padrão relativo da razão resposta/massa ter sido menor que 10%, a faixa linear de trabalho não foi definida como toda a faixa linear estudada, pois os pontos de concentração não se apresentaram equidistantes na reta de regressão estudada. O valor de máximo de 20 ng de niacina injetado é suficiente para quantificar esta vitamina nas amostras propostas.

A técnica de recuperação do analito adicionado foi utilizada para avaliação da exatidão dos métodos propostos. Os valores de recuperação calculados estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados da avaliação de precisão estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Limites de repetibilidade obtidos de teores de vitaminas calculados a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia

Amostras	Vitamina B ₁	Vitamina B ₂	Cloridrato de Piridoxol	Vitamina B ₆ Cloridrato de Piridoxal mg/100 g	Cloridrato de Piridoxamina	Niacinamida	Niacina
Média	0,47	0,087	0,04	0,06	0,05	0,27	0,38
Desvio Padrão	0,006	0,006	0,005	0,002	0,004	0,028	0,011
Desvio padrão relativo	1	7	13	3	8	10	3
Limites de repetibilidade (r)	0,020	0,020	0,020	0,015	0,015	0,080	0,031

Tabela 2. Dados de exatidão (recuperação) obtidos a partir de 6 tomadas de ensaio de amostra de farinha de aveia adicionadas de vitamina B₁, B₂, B₆ e niacina

Amostras	Dados de recuperação (%)						
	Vitamina B ₁	Vitamina B ₂	Cloridrato de piridoxol	Cloridrato de piridoxal	Cloridrato de piridoxamina	Niacinamida	Niacina
Média	73	90	94	68	92	88	96
Desvio padrão relativo	4	7	2	11	4	8	6

Os limites de repetibilidade (r), utilizados para definir a diferença máxima entre resultados de duplicata, foram calculados através da equação:

Limite de repetibilidade: $r = 2,8 * \text{desvio padrão}$

As Figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam os cromatogramas das soluções padrão e das amostras de farinhas de trigo e aveia, respectivamente, das vitaminas B₁, B₂, B₆ e niacina.

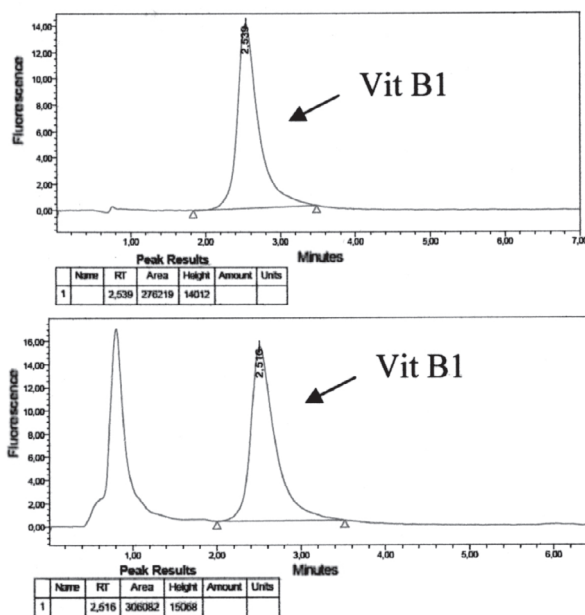


Figura 2. Cromatogramas de vitamina B₁ (reação pré-coluna): solução padrão e amostra de farinha de trigo (Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 (0,228% KH₂PO₄·3H₂O) dimetilformamida (85:15), Fluxo: 1 mL/min, Volume de injeção : 20 µL, Coluna: C18 de fase reversa RP-18 esférica 5 µm/125 x 4,0 mm com pré-coluna 5 µm/4x4 mm Lichrospher e detecção por fluorescência: Ex 368 nm; Em 440 nm)

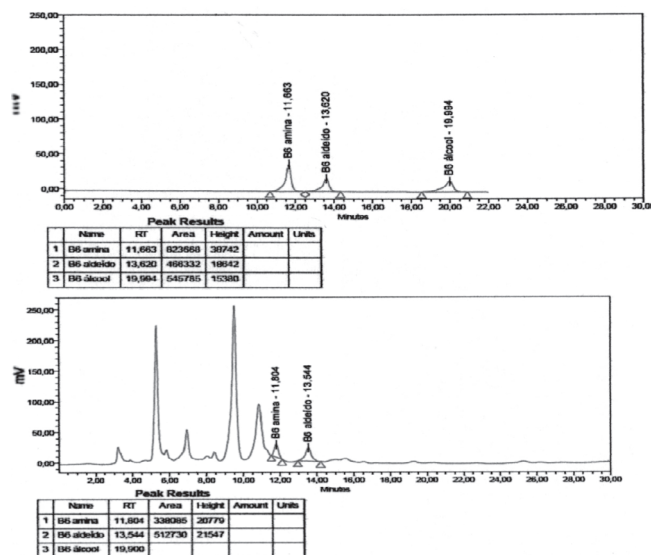
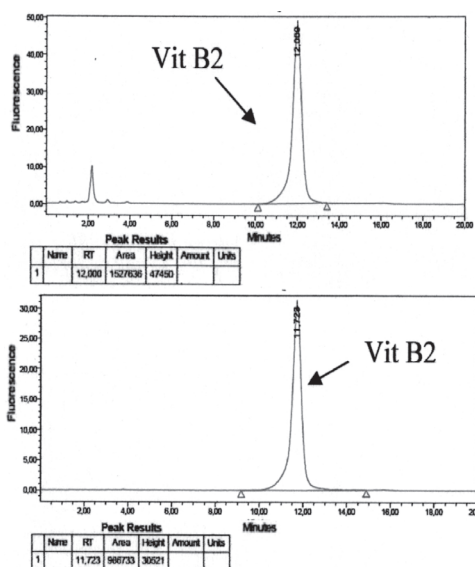


Figura 3. Cromatogramas de vitamina B₂: solução padrão e amostra de farinha de aveia (Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 (0,228% KH₂PO₄·3H₂O) dimetilformamida (85:15), Fluxo: 1,5 mL/min, Volume de injeção: 20 uL, Coluna: C₁₈ de fase reversa RP-18 esférica 5 µm/125 x 4,0 mm com pré-coluna 5 µm/4x4 mm Lichrospher e detecção por fluorescência: Ex 450 nm; Em 530 nm)

Figura 4. Cromatogramas de vitamina B₆: solução padrão e amostra de farinha de aveia (Fase móvel: tampão fosfato pH 2,5 (0,68% KH₂PO₄) com par iônico (0,014% PIC 7) e acetonitrila (96:4), Fluxo da bomba: 0,6 mL/min, Coluna: C₁₈ de fase reversa Superspher 100 RP-18 endcapped 5 µm/250 x 4,0 mm com pré-coluna 5 µm/4x4 mm Lichrospher 100 RP-18 e detecção por fluorescência: Ex 296nm; Em 390 nm)

Tabela 4. Resultados médios e desvios padrão relativos das vitaminas B₁, B₂, B₆, niacina em amostras de farinha de cereais

Amostras	Vitamina B ₁ (mg/100 g)	CV (%) n = 3	Vitamina B ₂ (mg/100 g)	CV (%) n = 3	Vitamina B ₆ (mg/100 g)	CV (%) n = 3	Niacina (mg/100 g)	CV (%) N = 3
Farinha de Arroz A	0,08	1,68	0,02	3,42	0,04	4,61	0,28	5,28
Tabelas	0,03 – 0,15		0,02 – 0,50		0,20 – 0,50		0,40 – 6,00	
Farinha de Aveia A	0,42	1,82	0,07	5,49	0,14	1,60	0,28	7,39
Farinha de Aveia B	0,34	1,31	0,06	2,93	0,18	9,71	0,32	1,33
Tabelas	0,20 – 0,70		0,08 – 0,15		0,12 – 0,20		0,80 – 3,80	
Farinha de Cevada A	0,14	3,28	0,05	1,45	0,10	9,70	0,71	1,35
Tabelas	0,08 – 0,80		0,11 – 0,45		0,10 – 0,56		1,50 – 11,50	
Farinha de Milho A	0,06	1,88	0,02	1,89	0,08	4,99	0,07	8,34
Farinha de Milho B	0,12	3,68	0,03	9,60	0,25	1,53	0,18	1,26
Farinha de Milho C	0,03	15,30	0,02	1,62	0,06	4,37	0,04	9,77
Tabelas	0,10 – 0,45		0,05 - 0,17		0,06 – 0,37		1,50 – 6,00	
Farinha de Trigo A	0,16	4,91	0,03	4,07	0,09	1,35	0,19	5,77
Farinha de Trigo B	0,47	1,24	0,08	7,20	0,12	3,61	0,66	4,95
Farinha de Trigo C	0,13	1,61	0,02	0,32	0,08	5,97	0,17	2,26
Farinha de Trigo D	0,54	0,62	0,05	0,17	0,22	10,63	0,34	1,75
Farinha de Trigo E	0,51	1,06	0,05	0,72	0,20	6,50	0,22	3,07
Tabelas	0,06 – 1,60		0,03 – 0,50		0,05 – 0,46		0,30 – 0,83	

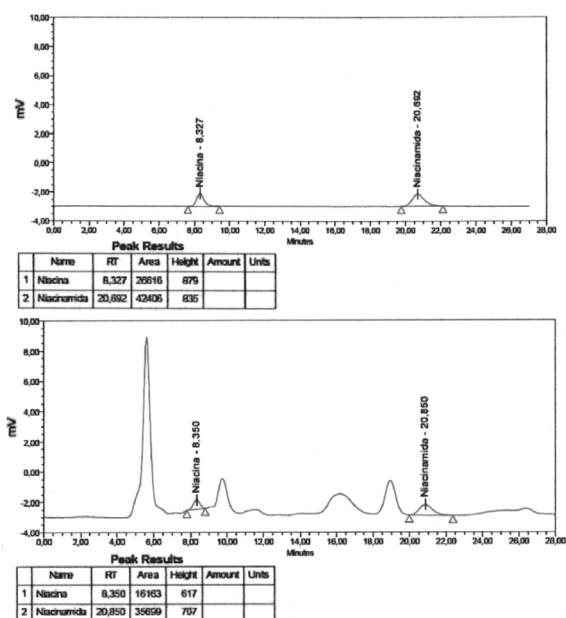


Figura 5. Cromatogramas de niacina: solução padrão e amostra de farinha de aveia (Fase móvel: tampão fosfato (0,954% KH_2PO_4) em solução de 0,76% de peróxido de hidrogênio 30 e 0,1% de solução de sulfato de cobre 5 mM, Fluxo: 1,1 mL/min, Coluna: C_{18} de fase reversa Nucleosil 100-5 C_{18} marca Macherey-Nagel, Volume de injeção: 20 μL , Reator composto por 12 m de tubulação de tetrafluoretileno (TFE), 0,5 mm de diâmetro interno, enrolada em uma lâmpada negra que emite radiação entre 300 a 400 nm e detecção por fluorescência: Ex 322 nm; Em 380 nm)

Os resultados médios e desvios padrão relativos obtidos das vitaminas B_1 , B_2 , B_6 e niacina nas amostras de farinha de cereais analisadas estão apresentados na Tabela 4, juntamente com as faixas encontradas desses micronutrientes em tabelas de composição de alimentos.¹⁶⁻²⁸

CONCLUSÕES

A farinha de aveia pode ser considerada a que apresentou teores naturais de vitaminas do complexo B mais significativos, podendo ser consumida pela população infantil brasileira (1-3 anos) como alimento fonte natural, quando o consumo diário corresponder a uma colher de sopa (30 g), de vitamina B_1 (aproximadamente 24% da IDR)¹⁵ e vitamina B_6 (aproximadamente 10% da IDR).¹⁵

Já a farinha de trigo, quando tais micronutrientes são avaliados como presentes naturalmente, pode ser consumida pela população infantil brasileira (1-3 anos) como alimento fonte natural, quando o consumo diário corresponde a uma colher de sopa (30 g), de vitamina B_1 (aproximadamente 32% da IDR)¹⁵ e vitamina B_6 (aproximadamente 13% da IDR).¹⁵

As farinhas de cevada, milho e arroz não podem ser consideradas fontes das vitaminas B_1 , B_2 , B_6 e niacina, mas, devido aos hábitos alimentares brasileiros, não são consumidas normalmente no país.

Os dados obtidos durante a validação dos métodos mostraram que os mesmos são métodos confiáveis, com precisão variando entre 1 e 10%. Os dados de exatidão obtidos podem ser considerados adequados, com recuperações variando entre 68 e 96%.

Tanto os dados de recuperação, quanto os limites de

quantificação (no mínimo igual 0,25 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) obtidos podem ser considerados adequados para a avaliação dos micronutrientes propostos na matriz estudada, uma vez que os mesmos, quando não adicionados, estão presentes em teores relativamente baixos quando comparados aos dados de composição de alimentos, o que possibilita a determinação destes micronutrientes quando estão naturalmente presentes.

MATERIAL SUPLEMENTAR

No material suplementar disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre e gratuito, encontram-se as seguintes Figuras:

Figura 1S: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B_2 . Figura 2S: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de vitamina B_6 . Figura 3S: Curva de regressão e a variação da razão resposta/massa injetada da análise de niacina.

REFERÊNCIAS

- Levy-Costa, R. B.; Sichieri, R.; Pontes, N. S.; Monteiro, C. A.; *Rev. Saúde Pública* **2005**, *39*, 530.
- <http://www.abitrigo.com.br>, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.abimilho.com.br/ocereal.htm>, acessada em Agosto 2006.
- Penteado, M. V. C.; *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*, Manole: São Paulo, 2003.
- http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm, acessada em Agosto 2006.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; *Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos*, INMETRO: Rio de Janeiro, 2003.
- Analytical Chemistry in Europe; *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*, Eurachem: Teddington, 1998.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025; *Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*, ABNT: Rio de Janeiro, 2001.
- Moreschi, E. C. P.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
- Presoto, A. E. F.; Almeida-Muradian, L. B.; *Abstracts of the 8th International Congress of Nutrition*, Durban, África do Sul, 2005.
- Ollilainen, V.; Vahteristo, L.; Uusi-Rauva, A.; Varo, P.; Koivistoinen, P.; Huttunen, J.; *J. Food Compos. Anal.* **1993**, *6*, 152.
- Augustin, J.; *J. AOAC Int.* **1984**, *67*, 1012.
- Kall, M. A.; *Food Chem.* **2003**, *82*, 315.
- Lahély, S.; Bergaentzle, M.; Hasselmann, C.; *Food Chem.* **1999**, *65*, 129.
- <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18828&word>, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.unicamp.br/nepa/taco>, acessada em Agosto 2006.
- http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/index_e.html, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.unlu.edu.ar/~argenfoods/Tablas/Tabla.htm>, acessada em Agosto 2006.
- http://www.foodcomp.dk/fcdb_default.htm, acessada em Agosto 2006.
- Franco, G.; *Tabela de composição química dos alimentos*, 9^a ed., Atheneu: São Paulo, 2002.
- <http://www.mrc.ac.za/FoodComp>, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.ktl.fi/fineli>, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.crop.cri.nz/home/products-services/nutrition>, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/>, acessada em Agosto 2006.
- Philipi, S. T.; *Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional*, ANVISA, FINATEC/NUT/UnB, Brasília, 2001.
- http://www.ieo.it/inglese/research/b_dati.htm, acessada em Agosto 2006.
- <http://www.sfk-online.net>, acessada em Agosto 2006.