

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE FOLATOS EM HORTALIÇAS FOLHOSAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

Ceres Mattos Della Lucia, Elizangela Rodrigues da Silva, Sônia Machado Rocha Ribeiro e Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana*
Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Av. PH Rolfs, s/nº, 36571-000 Viçosa – MG, Brasil

Sebastião César Cardoso Brandão

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, Av. PH Rolfs, s/nº, 36571-000 Viçosa – MG, Brasil

Recebido em 22/3/10; aceito em 23/8/10; publicado na web em 30/11/10

OPTIMIZATION OF METHOD TO ANALYZE FOLATE IN LEAFY VEGETABLES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION. We optimized a method for the determination of three main folate isoforms in leafy vegetables. Analysis was carried out by HPLC, using gradient of elution and fluorescence detection. Limits of quantification were 2 ng/mL; 2 ng/mL and 28 ng/mL for tetrahydrofolate (THF), 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) and 5-formyltetrahydrofolate (5-FTHF), respectively. Recovery rates of THF, 5-MTHF and 5-FTHF varied from 87.86 to 100.64%; 88.12-94.22% and 89.82-106.69%, respectively. Test of repeatability showed relative standard deviation for peak areas lower than 10%. Tests for linearity showed high coefficients of determination. The results showed advances in folates extraction and analysis in raw and cooked leafy vegetables.

Keywords: tetrahydrofolate; 5-methyltetrahydrofolate; 5-formyltetrahydrofolate.

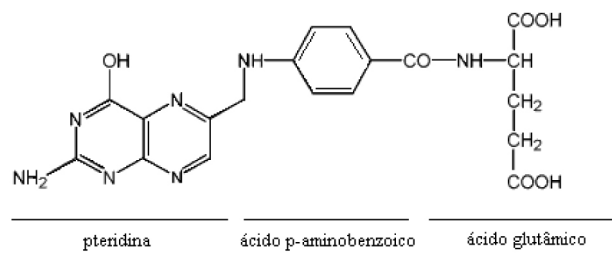
INTRODUÇÃO

A baixa ingestão de folatos/ácido fólico tem sido apontada como possível causa de doenças graves que atingem o homem, como as doenças cardíacas, o câncer e as malformações congênitas.¹

Informações sobre a concentração de folato em hortaliças ainda são escassas, especialmente quando se consideram diferentes concentrações desse composto em diversos cultivares, tipos de solo, locais e condições de cultivo, condições de estocagem e processamento. Os dados existentes na literatura são contraditórios, devido às dificuldades associadas à quantificação de folatos, que por sua vez estão relacionadas à sua instabilidade, grande variedade de formas² e quantidades reduzidas nos alimentos.

Folato é o termo utilizado para denominar compostos com atividade semelhante ao ácido pteroilglutâmico (PteGlu), também conhecido como ácido fólico. Os folatos são predominantemente poliglutamatos, contendo até sete resíduos de L-glutamato ligados ao grupo *p*-aminobenzoico por ligações peptídicas (Figura 1).³ Como os diferentes tipos de folato têm absorção e metabolismo diferentes, eles não podem ser quantificados como um só composto.^{4,5}

Tradicionalmente, a concentração de folato tem sido avaliada por meio de ensaios microbiológicos, com a utilização de *Lactobacillus casei*, em que a resposta de crescimento do micro-organismo à mistura de folatos presente é mensurada turbidimetricamente.⁶ Entretanto, quando se deseja separar as diversas formas de folatos existentes, é necessário realizar métodos mais específicos. Essas moléculas, por exibirem pequenas diferenças em suas características iônicas, podem ser analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A maioria dos folatos de ocorrência natural está presente sob a forma de poliglutamatos. Entretanto, a técnica de CLAE não responde de forma adequada aos derivados de folatos de cadeia longa. Portanto, a conver-



Ácido pteroilglutâmico (ácido fólico)

Fórmula molecular: C₁₉H₁₉O₆N₇

Massa molecular: 441

Figura 1. Estrutura química do ácido pteroilglutâmico

são de poliglutamatos a formas de mono ou diglutamatos requer uma conversão enzimática, utilizando a enzima γ -glutamyl carboxipeptidase (conjugase ou folato hidrolase). Pâncreas de frango, rim de porco e plasma de rato são as fontes de conjugase mais comumente utilizadas. O plasma de rato apresenta algumas vantagens em relação às demais fontes, como a facilidade de preparo, a ampla disponibilidade comercial, a baixa concentração de folatos endógenos e a não necessidade de procedimentos de extração e purificação. Amostras ricas em amido ou proteínas requerem ainda tratamento com trienzima (mistura das enzimas amilase, protease e conjugase) em sua análise.⁷

A importância que foi atribuída aos folatos recentemente, em virtude de sua ação benéfica ao homem, tem aumentado o interesse dos pesquisadores nos estudos sobre essa vitamina. Conseqüentemente, o interesse dos analistas em desenvolver métodos apropriados para a determinação de folatos também tem aumentado.⁸ Particularmente no Brasil, o desenvolvimento e a otimização de métodos para análise de folatos é imprescindível, uma vez que inexistem informações sobre as concentrações de folatos em tabelas brasileiras de composição de alimentos.

*e-mail: helena.santana@ufv.br

O conhecimento das concentrações de nutrientes em alimentos, entre eles as vitaminas, é imprescindível no trabalho de nutricionistas, na elaboração de dietas individuais, durante o atendimento ambulatorial, na elaboração de cardápios nutricionalmente balanceados para coletividades em Unidades de Alimentação e Nutrição e na análise de estudos de ingestão de nutrientes e adequação nutricional.⁹

Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar um método, utilizando CLAE com detecção por fluorescência para a determinação simultânea das três formas mais importantes de folatos (tetra-hidrofolato - THF, 5-metiltetra-hidrofolato - 5-MTHF e 5-formiltetra-hidrofolato - 5-FTHF) em cinco hortaliças cruas e cozidas (couve, espinafre, folhas de mostarda, floretes e folhas de brócolis).

Entre as otimizações realizadas, citam-se: utilização do plasma de rato como fonte da enzima conjugase para a etapa de hidrólise enzimática, em substituição à conjugase de rim de porco e pâncreas de frango, usadas na maior parte dos estudos encontrados na literatura,^{2,10,11} mas de difícil obtenção e com necessidade de longo tempo de incubação; purificação do extrato utilizando coluna de bancada, construída em laboratório e de menor custo (aproximadamente 70% menos) ao invés dos cartuchos de troca iônica comumente utilizados; análise simultânea dos três principais isômeros de folatos em hortaliças de amplo consumo na Zona da Mata Mineira e, não necessidade de utilização de trienzima na etapa de extração. Embora outros estudos também tenham sido capazes de realizar a detecção por fluorescência de THF, 5-MTHF e 5-FTHF, de maneira simultânea, em outras matrizes alimentares, este estudo é pioneiro em realizar esse tipo de análise em alimentos tipicamente brasileiros, crus e submetidos a diferentes formas de cocção utilizando esse método.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e outros materiais

Para análise de folatos, foi utilizada acetonitrila grau HPLC (Tedia, EUA) e água ultrapura produzida em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Os reagentes fosfato de sódio monobásico anidro (Synth, Brasil), ácido ascórbico (Vetec, Brasil), 2-mercaptoetanol (Vetec, Brasil), ácido fosfórico (Proquímios, Brasil), acetato de sódio (Chemco, Brasil) e cloreto de sódio (Vetec, Brasil) utilizados foram com grau de pureza para análise.

Para purificação dos extratos foi preparada uma coluna com recheio de Q-Sepharose (Pharmacia, EUA) em 20% de etanol 70%, com auxílio de seringa de plástico e fluxo estabelecido por meio de bomba peristáltica.

Para filtração dos extratos foi utilizado papel de filtro (Inlab, tipo 50,9 cm de diâmetro). Antes da injeção, os extratos e soluções padrão foram filtrados em membranas filtrantes (HV Millex, 0,45 µm de porosidade, Millipore, Brasil).

Os padrões de (6S)-5,6,7,8-tetra-hidrofolato de sódio (THF) (95% pureza), (6S)-5-metil-5,6,7,8-tetra-hidrofolato (5-MTHF) (97% pureza) e (6S)-5-formil-5,6,7,8-tetra-hidrofolato (5-FTHF) (97% pureza) foram cedidos gentilmente pela Merck-Eprova (Suíça) e mantidos a -18 °C até utilização.

Coleta e preparo das hortaliças

As hortaliças couve (*Brassica oleracea L.*), mostarda (*Sinapis arvensis*) (folhas), espinafre (*Spinacia oleracea L.*) e brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) (floretes e folhas), obtidas em Viçosa, MG, do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), vinculado ao Ministério de Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS), foram utilizadas neste estudo. Essas hortaliças foram escolhidas devido ao seu amplo consumo e disponibilidade na região e por serem consideradas importantes fontes de folato na alimentação.

As hortaliças foram coletadas, de forma aleatória, em estágio de comercialização (1 a 2 kg de cada hortaliça) e acondicionadas em sacos plásticos. Foram realizadas 8 repetições, sendo cada repetição representada por uma coleta semanal, realizada nos meses de agosto e outubro de 2008. As análises foram conduzidas no Laboratório de Análise de Vitaminas, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa.

As análises das hortaliças foram realizadas em até 48 h após a coleta, permanecendo acondicionadas em geladeira. As hortaliças foram lavadas em água corrente e analisadas na forma crua e cozida, utilizando métodos de cocção tradicionais. Couve, folhas de mostarda, espinafre e folhas de brócolis foram refogadas em óleo de soja (180 °C, por 6 min) enquanto os floretes de brócolis foram cozidos sob imersão em água em ebulição, em quantidade suficiente para cobrir as hortaliças, por 7 min.

Tanto as hortaliças cruas quanto as cozidas foram processadas em multiprocessador para completa homogeneização e acondicionadas em geladeira doméstica até o momento de extração e análise.

Extração de folatos

Durante o processo de extração e análise, as hortaliças e os extratos foram mantidos sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo *blackout*, e sob proteção do oxigênio através do uso de vidrarias com tampas e de ambiente com gás nitrogênio.

O procedimento de extração otimizado foi baseado em métodos previamente publicados.^{2,10,11}

Cerca de 3,00 g de hortaliça (o peso exato foi anotado), previamente homogeneizada em processador de alimentos, foram pesados em balança analítica Gehaka®, com quatro casas decimais. A hortaliça foi triturada com solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, contendo ácido ascórbico 1% e 2-mercaptoetanol 0,1% e filtrada a vácuo em funil de Büchner. O volume foi completado com água ultrapura para 25 mL em balão volumétrico e o extrato obtido foi aquecido por aproximadamente 12 min em banho-maria a 100 °C, sob agitação, utilizando frascos âmbar com tampa e atmosfera inerte, obtida com gás nitrogênio. Em seguida, o extrato foi resfriado, centrifugado (1789 g, por 30 min) e utilizado para a hidrólise enzimática de poliglutamatos.

Para hidrólise enzimática dos poliglutamatos a monoglutamatos¹² 100 µL de plasma de rato contendo a enzima conjugase (γ-glutamil carboxipeptidase) foram adicionados ao sobrenadante (3 mL) obtido no procedimento de extração descrito anteriormente. O plasma de rato foi obtido por meio da centrifugação (2500 g por 10 min) de sangue de ratos Wistar, machos e saudáveis. Os ratos recém-desmamados foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Viçosa e levados ao Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, onde foram criados em gaiolas individuais, com dieta comercial para animais de laboratório. Embora a alimentação dos animais não tivesse ausência de folatos, o plasma obtido foi injetado na coluna cromatográfica para verificar a presença ou ausência de folatos endógenos. O sobrenadante obtido a partir desse procedimento foi coletado, armazenado em alíquotas de 100 µL em tubos Eppendorf e armazenado a -18 °C. Os extratos de hortaliças contendo o plasma foram colocados em banho-maria a 37 °C por 3 h. Em seguida, para ocorrer inativação enzimática, os extratos foram aquecidos em água em ebulição por 5 min.² Para verificar a presença de folatos endógenos, injetaram-se na coluna cromatográfica alíquotas de plasma de rato diluídas em solução extratora, e compararam-se os tempos de retenção dos picos encontrados com aqueles presentes nas hortaliças e nas soluções de padrões.

Purificação dos extratos de hortaliças

A purificação do extrato foi feita com base em procedimento

descrito em trabalho prévio,² com modificações.

O extrato obtido no procedimento anterior foi purificado utilizando coluna de bancada de forte troca iônica, com 12 mm de diâmetro e 7 cm de comprimento, construída com 5 mL de fase estacionária de Q-Sepharose (Amersham Biosciences®). A coluna foi pré-condicionada com metanol e água (1:1) a um fluxo de 1-2 gotas/s. O extrato foi aplicado à coluna a um fluxo de 2 gotas/s, aproximadamente. A coluna foi lavada com água ultrapura para remoção dos componentes interferentes (fluxo de 1-2 gotas/s). Em seguida, a eluição dos folatos retidos foi feita com acetato de sódio (0,1 M) contendo cloreto de sódio 10%, ácido ascórbico 1% e 2-mercaptoetanol 0,1%.

Antes da injeção cromatográfica, o extrato foi filtrado em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm.

Curvas analíticas e quantificação de folatos

A solução estoque dos padrões de folato (200 µg/mL), assim como as soluções com concentrações crescentes dos padrões, foi preparada em solução extratora (solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, contendo ácido ascórbico 1% e 2-mercaptoetanol 0,1%).

A concentração real dos padrões de folato foi verificada por espectrofotometria (espectrofotômetro UV-visível, modelo UV-1601, Shimadzu) e corrigida utilizando-se a equação de Lambert-Beer. Os coeficientes de absorvidade molar foram 27 para THF; 32 para 5-MTHF e 31,5 para 5-FTHF.¹³ Os comprimentos de onda utilizados foram 297 nm para THF, 290 nm para 5-MTHF e 285 nm para 5-FTHF, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 2,0.

As curvas analíticas dos isômeros de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF) foram elaboradas considerando a concentração dos componentes nas hortaliças. Seis concentrações crescentes de soluções padrão foram injetadas em duplicata na faixa de 0,0095 a 0,3821 µg/mL para curva de THF ($R^2=0,99$); 0,2432 a 9,73 µg/mL para curva de 5-FTHF ($R^2=0,99$) e 0,049 a 0,98 µg/mL para curva de 5-MTHF ($R^2=0,97$).

A partir das curvas analíticas obtidas, foram calculadas as concentrações dos isômeros de folatos presentes nas hortaliças. O cálculo da concentração real nas hortaliças foi obtido a partir das diluições realizadas.

Condições de análise por CLAE

As condições para análise de folatos por CLAE foram otimizadas em laboratório baseando-se em métodos previamente publicados.^{2,10,11}

O sistema de CLAE (Shimadzu, modelo SCL 10AD VP) empregado na análise de folatos foi composto de bomba de alta pressão (com válvula para gradiente quaternário de baixa pressão), modelo LC-10AD VP; injetor automático com alça de amostragem de 50 µL, modelo SIL-10AF e detector de fluorescência (modelo RF10AXL). O sistema foi controlado pelo software Multi System, Class VP 6.12. A separação dos folatos foi feita em coluna Shim Pack 100 RP18, com recheio de sílica, com 150 x 4,6 mm D.I. e tamanho da partícula de 4,6 µm (Merck, Alemanha).

As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta por gradiente binário contendo acetonitrila e solução tampão fosfato (NaH_2PO_4 30 mM, pH ajustado para 2,3 com H_3PO_4); fluxo de 0,7 mL/min; volume injetado: 50 µL para padrões e extratos, detecção por fluorescência com excitação a 290 nm e emissão a 360 nm. O gradiente iniciou-se com acetonitrila 6% (v/v), sendo mantido por 6 min e aumentado linearmente para 25% em 25 min, permanecendo nessa concentração por 2 min, retornando em seguida às condições iniciais. A coluna foi re-equilibrada por 15 min antes da próxima análise. O tempo total de corrida foi de 43 min.

Para evitar a formação de bolhas e controlar a grande variação da pressão, foi necessário utilizar um sistema de degaseificação da

fase móvel com gás hélio antes e durante as corridas cromatográficas. Assim, a fase móvel foi degaseificada por 15 min a 150 kpa antes do início das análises e a 100 kpa ao longo das corridas.

A identificação do THF, 5-MTHF e 5-FTHF nos extratos foi realizada por comparação dos tempos de retenção obtidos nos extratos com os obtidos para os respectivos padrões analisados sob as mesmas condições, e por cocromatografia.

Otimização do método de análise de folatos

Testes de recuperação e faixa de linearidade

Testes de recuperação de THF, 5-MTHF e 5-FTHF foram realizados pela adição dos padrões às hortaliças (espinafre cru, couve rasgada e refogada, folhas de brócolis cruas, floretes de brócolis cozidos sob imersão em água e folhas de mostarda refogada) na proporção de 20 a 100% da concentração média original das hortaliças. As porcentagens de recuperação foram obtidas a partir da diferença percentual entre as concentrações iniciais analisadas e as adicionadas às hortaliças previamente homogeneizadas.

A determinação da faixa de linearidade foi feita pela injeção, em duplicata, de 6 concentrações crescentes das soluções padrão de THF, 5-MTHF e 5-FTHF, utilizando as mesmas condições cromatográficas empregadas para análise dos extratos de hortaliças. Os dados obtidos para as áreas dos picos foram usados para análise de regressão linear.¹⁴

Limites de detecção e quantificação

A avaliação do limite de detecção (LD) foi feita por diluições sucessivas dos padrões de THF, 5-MTHF e 5-FTHF, seguida da determinação da menor quantidade detectável, como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo 10 vezes o LD.⁸

Repetibilidade

O teste de repetibilidade foi realizado pela extração e análise de uma mesma hortaliça cinco vezes. A avaliação da repetibilidade foi feita pelo cálculo do coeficiente de variação das médias das áreas dos picos dos componentes analisados (THF, 5-MTHF e 5-FTHF).¹⁴

Avaliação da estabilidade de folatos em extratos de hortaliças

Visando avaliar possíveis perdas de folatos durante o armazenamento do extrato de hortaliças antes da análise, empregando duas temperaturas diferentes (refrigeração e congelamento), foi realizado um estudo de estabilidade utilizando espinafre cru. O extrato de espinafre cru foi analisado após diferentes tempos de estocagem em temperatura de refrigeração (8 °C: Tempo 0 – imediatamente após o procedimento de extração e Tempo 1 – 24 h após a extração) e em temperatura de congelamento (-18 °C: Tempo 2 – 48 h após a extração; Tempo 3 – 72 h após a extração e Tempo 4 – 7 dias após a extração). Cada injeção foi realizada em triplicata.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para o estudo das concentrações de folatos nas hortaliças foi considerado um delineamento inteiramente casualizado com 5 hortaliças e 8 repetições. A análise de variância e o teste de amplitudes múltiplas de Duncan ($\alpha = 5\%$) foram realizados para verificar a existência de diferenças significativas quanto à concentração de folatos entre as hortaliças.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o software SAS (Statistical Analysis System), versão 9.1 (2002-2003), licenciado para a UFV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação das isoformas de folatos

A Figura 2 mostra cromatogramas típicos da análise de folatos na solução de padrões, análise de plasma de rato sem a adição de extrato de hortaliças e análise de extratos de hortaliça, com e sem a etapa de hidrólise enzimática.

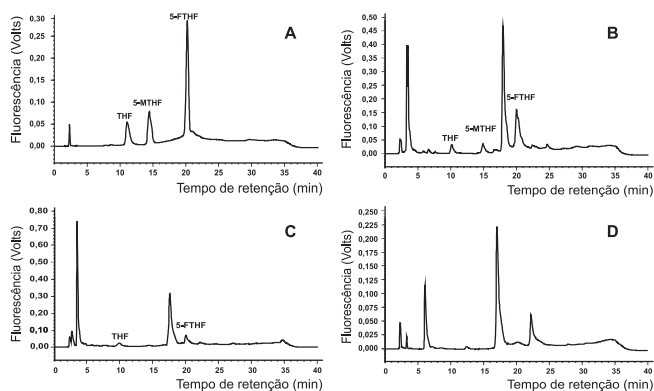


Figura 2. Cromatogramas típicos de mistura de padrões de folatos (A), espinafre cru com hidrólise enzimática de poliglutamatos (B), espinafre sem hidrólise enzimática de poliglutamatos (C), plasma de rato sem a adição de hortaliça (D). Ver condições cromatográficas descritas na Parte Experimental

O emprego da coluna RP-18 e a utilização do sistema de eluição por gradiente possibilitaram a detecção simultânea dos isômeros THF, 5-MTHF e 5-FTHF em todas as hortaliças estudadas. Verifica-se pelo perfil cromatográfico que foi possível obter resolução dos picos com tempos de corrida de 43 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 a repetibilidade do método.

Observou-se que o presente método mostrou ser útil e aplicável para separação das principais isoformas de folatos nas diferentes matrizes de hortaliças folhosas cruas e cozidas.

Com o objetivo de se avaliar o efeito da adição de plasma de rato ao extrato de hortaliça, analisou-se em duplicata amostras de espinafre cru, com e sem a adição de plasma, para verificar a presença ou ausência de picos de folatos. Observou-se que nos respectivos tempos de retenção dos isômeros (11 min para THF; 14,5 min para 5-MTHF e 20 min para 5-FTHF) não foram detectados picos, significando a necessidade da etapa de hidrólise enzimática para a análise dessa vitamina.

Para avaliar a presença de folatos endógenos possivelmente presentes no plasma de rato, realizou-se a análise em duplicata de alíquotas de plasma (100 µL), diluídas em 3 mL de solução extratora.

Observou-se que os tempos de retenção dos picos detectados no plasma não coincidiram com os tempos de retenção dos isômeros de folatos. Além disso, nos tempos de retenção dos isômeros, nenhum pico foi detectado na análise do plasma. Esses resultados sugerem a ausência de folatos no plasma de rato utilizado para hidrólise enzimática de poliglutamatos, o que confere maior confiabilidade à quantificação real de folatos nas hortaliças estudadas.

Concentração de folatos nas hortaliças

Como observado na Tabela 1, o 5-FTHF foi a forma predominante em todas as hortaliças analisadas.

Observa-se que os floretes e as folhas de brócolis foram as hortaliças que apresentaram as maiores concentrações de folatos totais, enquanto o espinafre apresentou a menor concentração. A concentração de folatos totais obtida no presente trabalho para os floretes de brócolis foi semelhante ao relatado em trabalho prévio,¹¹ em que os autores encontraram concentração igual a 866 µg/100 g mas, em geral, foi superior ao encontrado na maioria dos trabalhos revisados. Por exemplo, um estudo¹⁵ encontrou concentração de folatos totais em floretes de brócolis igual a 427,8 µg/100 g. A etapa de hidrólise enzimática não foi utilizada por esses autores. Outros trabalhos^{10,16,17} reportaram concentrações de folatos totais iguais a 114, 102 e 133 µg/100 g, respectivamente, os quais foram inferiores aos encontrados no presente estudo.

Em espinafre, as concentrações de folatos totais encontradas em nosso estudo estão na faixa descrita na literatura. Concentração de folatos nessa hortaliça iguais a 302 µg/100 g foram relatadas anteriormente.¹⁸ Outros estudos^{16,19,20,21} reportaram concentrações de folatos iguais a 364, 251, 193 e 224 µg/100 g, respectivamente, utilizando método semelhante ao do presente estudo.

O único estudo encontrado a respeito da concentração de folatos em folhas de mostarda¹⁸ detectou concentração dessa vitamina igual a 278 µg/100 g, inferior à verificada nesse trabalho.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a concentração de folatos em couve e folhas de brócolis, o que reforça a importância do nosso estudo no sentido de contribuir com dados a respeito da concentração dessa vitamina nessas hortaliças.

Os altos valores de desvio-padrão verificados são explicados pela grande variabilidade biológica presente em matrizes alimentares. Essa variabilidade pode ser explicada por diferenças no solo, nas condições de cultivo e na exposição à luz solar, dentre outros fatores, que podem estar presentes mesmo quando são realizados procedimentos precisos de coleta e homogeneização das amostras. Altos valores de desvio-padrão foram encontrados em outros estudos já publicados.^{22,23} No presente estudo buscou-se minimizar esse viés utilizando coleta de hortaliças no mesmo estágio de comercialização, maior número possível de repetições (8 repetições) e homogeneização de quantidades mais representativas de amostras (1 a 2 kg de cada hortaliça) antes de retirar as alíquotas para análise. No entanto, trabalhou-se com uma situação real de

Tabela 1. Concentração média, desvio-padrão (n=8) de tetra-hidrofolato (THF), 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF), 5-formiltetra-hidrofolato (5-FTHF) e soma de folatos em hortaliças cruas (em µg/100 g de matéria fresca)

Hortaliças	THF	5-MTHF	5-FTHF	Soma de Folatos
Couve	73 a ± 46	67 a ± 41	410 ab ± 279	550 ab ± 267
Floretes de brócolis	69 a ± 57	123 a ± 91	562 a ± 415	755 a ± 326
Folhas de brócolis	61 a ± 32	219 a ± 87	451 ab ± 264	732 a ± 306
Espinafre	25 a ± 21	43 a ± 26	174 b ± 73	241 b ± 81
Folhas de mostarda	72 a ± 60	165 a ± 32	332 ab ± 289	569 ab ± 234

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Duncan.

consumo, em que não é possível controlar a aquisição das mesmas variedades pela população. As hortaliças foram provenientes de diferentes produtores, que cultivam diferentes variedades de uma mesma hortaliça. Utilizou-se assim, para cada repetição, amostras nem sempre provenientes da mesma variedade para cada hortaliça, o que aumenta a variabilidade entre elas.

Faixa de linearidade e recuperação de folatos nas hortaliças

As três formas de folato apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração utilizadas (pesos injetados: THF, entre 0,19104 e 7,6416 ng; 5-MTHF, entre 0,24425 e 4,885 ng; 5-FTHF, entre 7,2975 e 291,9 ng). O coeficiente de determinação para THF foi 0,9931; para 5-MTHF, 0,993 e para 5-FTHF, 0,9761.

A Tabela 2 mostra os percentuais de recuperação dos padrões de folatos adicionados às hortaliças. Foi possível verificar excelente recuperação das isoformas de folato (em média 87,86 a 106,69%), o que demonstra que os procedimentos utilizados durante a extração e análise foram adequados para evitar perdas dessa vitamina. Um estudo¹⁵ encontrou valores médios de recuperação de THF, 5-MTHF e 5-FTHF entre 94 e 99%, analisando floretes de brócolis convencional e orgânico. Outro trabalho,¹¹ utilizando método semelhante ao do presente estudo, obteve taxas de recuperação de folatos variando de 92 a 96% em ervilhas, também indicando boa exatidão do método.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção encontrados no presente estudo foram iguais a 2 ng/mL para o THF e para o 5-MTHF, enquanto para o 5-FTHF foi de 28 ng/mL.

Limites de detecção para THF, 5-MTHF e 5-FTHF iguais a 5, 3 e 10 ng/mL, respectivamente, foram reportados previamente.²⁴ Nossos resultados são similares aos de outro trabalho²⁵ para THF e 5-MTHF, embora o limite de detecção para 5-FTHF tenha sido inferior, da ordem de 1,5 ng/mL. Outros trabalhos²⁶ encontraram limite de detecção superior para THF, igual a 5,7 ng/mL.

O limite de quantificação foi considerado como sendo 10 vezes o valor do limite de detecção, ou seja, 20 ng/mL para THF e 5-MTHF e 280 ng/mL para 5-FTHF. Esses resultados demonstram que o método otimizado permite a detecção de concentrações muito reduzidas de folatos em hortaliças.

Repetibilidade

Os valores de repetibilidade foram expressos como coeficiente de variação para a área do pico. Encontrou-se 5,63; 9,82 e 5,74% para THF, 5-MTHF e 5-FTHF, respectivamente, analisados em espinafre cru. Os resultados obtidos conferem confiabilidade às condições de análise utilizadas na presente pesquisa.²⁷

Estabilidade de folatos em extratos de hortaliças

A análise de folatos nas hortaliças envolveu procedimentos que poderiam favorecer perdas de folatos, tais como a preparação do extrato utilizando extração a quente (100 °C) e o tratamento enzimático do extrato usando banho-maria a 37 °C por 3 h. Além disso, alguns pesquisadores, por limitação de tempo, optam por não realizar a análise de folatos imediatamente após o procedimento de extração, de modo que o extrato permanece estocado em temperatura de refrigeração ou congelamento, para ser posteriormente analisado.¹² Para analisar a segurança de utilização do procedimento acima mencionado, avaliou-se nesse estudo a estabilidade das isoformas de folato em extratos provenientes de espinafre, após diferentes tempos de estocagem em temperatura de refrigeração (8 °C) e em temperatura de congelamento (-18 °C).

A estabilidade dos isômeros de folatos ao longo do tempo de estocagem em extratos de espinafre pode ser visualizada na Figura 3.

Observou-se que todos os isômeros apresentaram perdas consideráveis (cerca de 10 a 70%) após 7 dias de estocagem (Tempo 4), mesmo que o armazenamento tenha sido realizado em temperatura de congelamento (-18 °C). O THF foi o isômero que apresentou menor estabilidade, sendo que após 4 h de estocagem sob refrigeração, a perda foi de aproximadamente 30%. Após 7 dias de estocagem sob

Tabela 2. Recuperação (n=2) dos padrões de tetra-hidrofolato (THF), 5-miltetra-hidrofolato (5-MTHF), 5-formiltetra-hidrofolato (5-FTHF) adicionados a hortaliças cruas e cozidas

Hortaliça	Isômero	Concentração inicial (µg/g)	Concentração do padrão adicionado (µg/g)	Concentração medida (µg/g)	Recuperação* (%)
Couve rasgada refogada	THF	0,1752	0,2530	0,4229	97
	5-MTHF	0,4032	0,5000	0,8799	94
	5-FTHF	27,7270	16,3000	41,4112	91
Folhas de brócolis cruas	THF	0,5136	0,3244	0,7978	92
	5-MTHF	0,6768	0,3029	0,9392	94
	5-FTHF	68,1247	16,5118	79,1914	92
Espinafre cru	THF	0,1582	0,1622	0,3012	88
	5-MTHF	0,3172	0,1465	0,4272	88
	5-FTHF	11,2982	4,4600	16,5142	107
Folhas de mostarda refogada	THF	0,1653	0,3307	0,6561	101
	5-MTHF	0,8474	0,3224	1,0913	91
	5-FTHF	60,7264	6,4867	61,0332	90
Floretes de brócolis cozidos sob imersão em água	THF	0,2127	0,1600	0,3625	95
	5-MTHF	0,6073	0,3200	0,8552	88
	5-FTHF	77,5306	9,7300	85,8658	98

* % de Recuperação = (concentração final do isômero) - (quantidade adicionada do isômero) / (concentração inicial do isômero) x 100

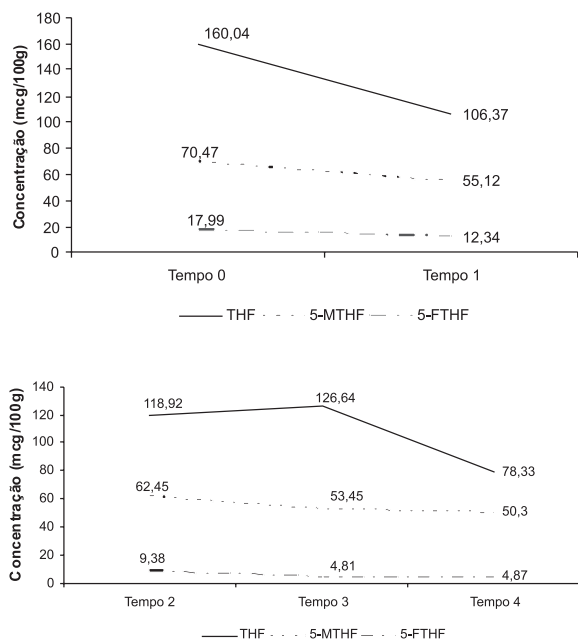


Figura 3. Estabilidade de isômeros de folatos em extrato de espinafre após diferentes tempos de estocagem em temperatura de refrigeração (8 °C; tempos 0 e 1) e em temperatura de congelamento (-18 °C; tempos 2, 3 e 4). Tempo 0: imediatamente após o procedimento de extração; tempo 1: 4 h após a extração; tempo 2: 24 h após a extração; tempo 3: 48 h após a extração; tempo 4: 7 dias após a extração

congelamento, o extrato de espinafre apresentou apenas 27% da concentração inicial de THF.

As menores perdas foram observadas para 5-MTHF, o qual apresentou retenção de 71,37% da concentração inicial após 7 dias de armazenamento a -18 °C (redução de 70,47 para 50,3 µg/100 g). Esses resultados corroboram os encontrados em outro trabalho,¹² que verificou que o 5-MTHF se mostrou mais estável frente aos diferentes tempos de armazenamento quando comparado ao THF, mostrando perdas de THF iguais a 53% após 4 semanas de estocagem a -22 °C, sendo essa perda inferior ao encontrado no presente estudo. Mesmo em temperaturas extremamente baixas, a degradação de THF pode ser observada. Mesmo a estocagem a -70 °C pode levar a perdas consideráveis de THF em extratos alimentares.²⁸ Esses resultados demonstram a importância da realização da análise cromatográfica logo após o procedimento de extração, visando a diminuição de perdas de folatos e a garantia de resultados mais confiáveis e próximos do valor real presente na hortaliça.

CONCLUSÕES

O método otimizado no presente estudo mostrou-se confiável para determinação simultânea das três formas mais importantes de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF) em hortaliças folhosas cruas e cozidas, apresentando altas taxas de recuperação, valores de repetibilidade confiáveis, ampla faixa de linearidade e baixos limites de detecção e quantificação. O plasma de rato, de fácil obtenção, atuou como fonte da enzima conjugase para a etapa de hidrólise enzimática, em substituição à conjugase de rim de porco e pâncreas de frango e consistiu em redução considerável do tempo de incubação das amostras. Além disso, a purificação do extrato utilizando coluna de bancada reduziu os custos do método em aproximadamente 70%. Essas otimizações, juntamente com a não necessidade de utilização de trienzima, consistiram em avanços no método de extração e análise de folatos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Em <http://quimicanova.s bq.org.br> está disponível gratuitamente, na forma de arquivo PDF, a Figura 1S, referente às estruturas químicas do tetra-hidrofolato, 5-metiltetra-hidrofolato e 5-formiltetra-hidrofolato.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado, à FAPEMIG pela bolsa de iniciação científica e financiamento da pesquisa e a L. M. Cardoso, pela dedicação na edição das figuras.

REFERÊNCIAS

- Dierkes, J.; Kroesen, M.; Pietrzik, K.; *Int. J. Vitamin Nutr. Res.* **1998**, *68*, 98.
- Jastrebova, J.; Witthöft, C.; Grahn, A.; Svensson, U.; Jägerstad, M.; *Food Chem.* **2003**, *80*, 579.
- Mckillop, D. J.; Pentieva, K.; Daly, D.; Mcpartlin, J. M.; Hughes, J.; Strain, J. J.; Scott, J. M.; McNulty, H.; *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 681.
- Osseyi, E. S.; Wehling, R. L.; Albrecht, J. A.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *826*, 235.
- Finglas, P. M.; Wigertz, K.; Vatheristo, L.; Witthöft, C.; Southon, S.; Froidmont-Görtz, I.; *Food Chem.* **1999**, *64*, 245.
- Ndaw, S.; Bergaentzlé, M.; Aoudé-Werner, D.; Lahély, S.; Hasselmann, C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *928*, 77.
- Ascort, J.; Shrestha, A.; *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 253.
- Catharino, R. R.; Godoy, H. T.; Lima-Pallone, J. A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 972.
- Campos, F. M.; Pinheiro-Sant'ana, H. M.; Souza, P. M.; Stringheta, P. C.; Chaves, J. B. P.; *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, *26*, 33.
- Vahteristo, L.; Lehtikoinen, K.; Ollilainen, V.; Varo, P.; *Food Chem.* **1997**, *59*, 589.
- Stea, T. H.; Johansson, M.; Jägerstad, M.; Frolich, W.; *Food Chem.* **2006**, *101*, 1095.
- Patring, J. D. M.; Johansson, M. S.; Yazynina, E.; Jastrebova, J. A.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *553*, 36.
- Blakely, R. L. Em *Frontiers of Biology*; Neuberger A.; Tatum, E. L., eds.; North Holland Publishing Company: Amsterdam, 1969, cap. 2.
- Lanças, F. M.; *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*, 6ª ed., Ed. Rima: São Carlos, 2004, cap. 4.
- Lima-Pallone, J. A.; Catharino, R. R.; Godoy, H. T.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 530.
- Desouza, S. C.; Eitenmiller, R. R.; *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 626.
- Mullin, W. J.; Wood, D. F.; Howsam, S. G.; *Nutr. Report Int.* **1982**, *26*, 7.
- Iwatani, Y.; Arcot, J.; Shrestha, A. K.; *J. Food Composition and Analysis* **2003**, *16*, 37.
- Lin, B. F.; Lin, R. F.; *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* **1999**, *37*, 443.
- Shrestha, A. K.; Arcot, J.; Paterson, J.; *Food Chem.* **2000**, *71*, 545.
- Aiso, K.; Tamura, T.; *J. Nutr. Sci. Vitaminology* **1998**, *44*, 361.
- Della Lucia, C. M.; Campos, F. M.; Oliveira, D. S.; Pinheiro-Sant'Ana, H. M.; *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, *28*, 809.
- Della Lucia, C. M.; Campos, F. M.; Mata, G. M. S. C.; Pinheiro-Sant'Ana, H. M.; *Revista Ciência e Saúde Coletiva* **2008**, *13*, 1627.
- Day, B. P.; Gregory III, 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.
- Rodríguez-Amaya, D. B.; *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **1999**, *49*, 74S.
- Tamura, T.; Mizuno, Y.; Johnston, K. E.; Jacob, R. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 135.