

CERES MATTOS DELLA LUCIA

**ANÁLISE DE FOLATOS EM HORTALIÇAS FOLHOSAS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA, COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência da Nutrição, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

CERES MATTOS DELLA LUCIA

**ANÁLISE DE FOLATOS EM HORTALIÇAS FOLHOSAS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, COM DETECÇÃO POR
FLUORESCÊNCIA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência da Nutrição,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 17 de março de 2009.

Prof. Sebastião César Cardoso Brandão
(Co-Orientador)

Prof^a. Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Co-Orientadora)

Prof. José Benício Paes Chaves

Prof^a. Hércia Stampini Duarte Martino

Prof^a. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana
(Orientadora)

Entrega teu caminho ao Senhor, confia nEle e o mais Ele fará”.
(Sl 37:5)

Agradeço a Deus o dom da vida e por ter-me abençoado com saúde e força. Agradeço por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, sem as quais nada teria sentido.

Dedico aos meus pais, Lizete e Marco Tulio, e aos meus irmãos, Amanda e Emanuel.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização da graduação e do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado; e à FAPEMIG, pela concessão de bolsa de iniciação científica.

À Profa. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana, pela orientação, companheirismo, amizade e força, desde os tempos da graduação até agora.

À Profa. Sônia Machado Rocha Ribeiro, pelos conselhos, sugestões e informações e pela simpatia em sempre me receber.

Ao Prof. Sebastião César Cardoso Brandão, por todos os seus conhecimentos compartilhados sobre química e cromatografia, essenciais para o início e continuidade do trabalho.

Ao Prof. José Benício Paes Chaves, pelo aprendizado e auxílio no delineamento experimental e orientação na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Sebastião Tavares de Rezende, pelas preciosas informações a respeito do processo de purificação por troca iônica, pelo fornecimento do material para a construção da coluna de purificação e pelo empréstimo da bomba peristáltica.

À Profa. Neuza Maria Brunoro Costa, pela boa vontade em sacrificar os animais para retirada do sangue e coleta do plasma.

À Profa. Fátima Aparecida Ferreira de Castro, pela concessão do Laboratório de estudo Experimental dos Alimentos.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Saúde e Nutrição pelos ensinamentos e colaborações.

Ao Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), em especial ao Alessandro, pela colaboração no fornecimento das hortaliças para a pesquisa.

À Merck Eprova (Suíça) por nos ceder gentilmente os padrões vitamínicos utilizados nesse estudo.

Aos Prof. Paul Finglas (Institute of Food Research, Noruega), Tony Wright (Institute of Food Research, Noruega) e Maria King (Institute of Food Research, Noruega) pela preciosa parceria no esclarecimento de dúvidas a respeito da otimização da metodologia.

A minha querida amiga e bolsista de Iniciação Científica, Elizangela Rodrigues da Silva, pela integral dedicação a este trabalho, pela disponibilidade em sempre ajudar e pela simpatia que sempre carrega consigo.

Às estagiárias do curso de Nutrição, Bárbara e Nice, pela amizade e auxílio em momentos de muito sufoco.

A Daniela, minha grande amiga e companheira de monitorias de BIO 111 e de Laboratório, por sua ajuda, força, amizade, paciência e bom humor, sempre.

Às minhas queridas amigas, em especial, Hudsara e Monise, pela troca de confidências, ajuda em momentos difíceis e pelos lanchinhos especiais.

A Marina Maria, amiga e técnica, pelas valiosas dicas no Laboratório e por todo o carinho.

A todos os meus colegas de Pós-Graduação, pelo ótimo tempo de convívio e de estudos.

Aos meus queridos pais, Lizete e Marco Tulio, por tudo o que fizeram por mim e por meus irmãos, pelo amor e pela confiança.

Aos meus irmãos, Amanda e Emanuel, por serem minha razão de viver.

Ao meu namorado, Marco Antônio, pelo amor, incentivo, e por ser um grande exemplo de lutas e sucessos.

Aos meus tios, Ricardo e Terezinha, pelo carinho e apoio e por terem me recebido em sua família durante cinco anos.

Aos meus queridos tios e tias, pelo auxílio sempre presente e que foi responsável pela continuidade da minha permanência em Viçosa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, pelas bênçãos, pela vida e por permitir a minha chegada até aqui.

BIOGRAFIA

Ceres Mattos Della Lucia nasceu em 11 de junho de 1984, no município de Três Corações, Minas Gerais.

Em maio de 2002, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa (MG), concluindo-o em março de 2007. Foi bolsista de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq durante o período de agosto de 2005 a julho de 2006, atuando em pesquisa sobre o controle de perdas de vitamina C e carotenóides em hortaliças servidas em uma Unidade de Alimentação e Nutrição Hospitalar, no município de Viçosa.

Em março de 2007, ingressou no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa (MG), atuando na linha de pesquisa 'Valor Nutricional, Funcional e Controle de Qualidade de Alimentos e de Dietas' e pleiteou o título de mestre em março de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Objetivo Geral	6
2.2. Objetivos Específicos	6
3. METODOLOGIA GERAL	7
3.1. Material.....	7
3.1.1. Matéria-prima.....	7
3.1.2 Equipamentos.....	7
3.1.3 Reagentes e outros materiais	8
3.2 Métodos.....	9
3.2.1. Coleta, amostragem, preparo e acondicionamento das hortaliças	9
3.2.2. Extração de folatos	10
3.2.3. Desconjugação de poliglutamatos	10
3.2.4. Purificação do extrato de hortaliça.....	11
3.2.5. Curvas de calibração e quantificação de THF, 5-MTHF e 5-FTHF	11
3.2.6. Análise de folatos por CLAE	13
3.2.7. Identificação de folatos	14
3.2.8. Cálculo da estabilidade dos folatos nas hortaliças após cocção	14
3.2.9. Testes para validação da metodologia	15
3.3. Delineamento experimental e análise estatística dos dados	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Artigo 1	18
RESUMO	19
ABSTRACT.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4. CONCLUSÕES.....	35
5. AGRADECIMENTOS.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
4.2. Artigo 2	39
RESUMO	40
ABSTRACT.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. CONCLUSÕES	61
5. AGRADECIMENTOS.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
5. CONCLUSÕES GERAIS	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

RESUMO

DELLA LUCIA, Ceres Mattos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência.** Orientadora: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana. Co-Orientadores: Sebastião César Cardoso Brandão e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

A baixa ingestão de folatos tem sido apontada como possível causa de doenças graves que atingem o homem, como as doenças cardíacas, o câncer e as malformações congênitas. Informações na literatura sobre a concentração de folatos em hortaliças são escassas e muitas vezes contraditórias, devido às dificuldades associadas à análise dessa vitamina, que por sua vez estão relacionadas à sua baixa estabilidade, presença em pequenas concentrações em sistemas biológicos, complexos procedimentos de extração e variedade de formas. Esse estudo teve como objetivo otimizar uma metodologia para determinação da concentração natural de diferentes formas de folatos (tetraidrofolato – THF, 5-metiltetraidrofolato – 5-MTHF e 5-formiltetraidrofolato – 5-FTHF) em hortaliças de elevado consumo no Brasil e cultivadas em Viçosa, MG (couve, espinafre, mostarda, floretes e folhas de brócolis). Visou ainda comparar as concentrações de folatos entre duas estações do ano (inverno e primavera) e avaliar sua estabilidade a diferentes práticas culinárias comuns de cocção (cocção a vapor, cocção sob imersão em água e refogamento em óleo). A metodologia otimizada no preparo das hortaliças consistiu de homogeneização das mesmas em um sistema tampão (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0), seguido por aquecimento e centrifugação, procedendo-se a desconjugação enzimática dos poliglutamatos para monoglutamatos, utilizando conjugase proveniente de plasma de rato. Após a fase de extração, o extrato contendo os monoglutamatos foi purificado utilizando coluna de troca iônica. A análise dos folatos foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando gradiente de eluição e fase móvel composta de acetonitrila e solução tampão fosfato (30 mM, pH ajustado para 2,3 com ácido fosfórico). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com duas estações do ano (inverno e primavera), cinco hortaliças e quatro repetições em cada estação. Realizou-se a análise de variância ($\alpha= 5\%$) para verificar diferenças entre as duas estações. Para verificação de diferenças entre a concentração dos compostos nas hortaliças cruas e submetidas à cocção, foi aplicado o teste t

pareado, ao nível de 5% de probabilidade, sendo as hortaliças comparadas duas a duas (hortaliça crua x hortaliça cozida/refogada). Para essa análise, foram consideradas oito repetições (quatro repetições no inverno e quatro na primavera). A concentração média de folatos totais encontrado foi de $549,67 \pm 467,07$ $\mu\text{g}/100$ g em couve; $754,57 \pm 564,16$ $\mu\text{g}/100$ g em floretes de brócolis; $731,51 \pm 384,01$ $\mu\text{g}/100$ g em folhas de brócolis; $241,04 \pm 121,80$ $\mu\text{g}/100$ g em espinafre e $568,76 \pm 383,20$ $\mu\text{g}/100$ g em mostarda. Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de folatos das hortaliças entre o inverno e a primavera. O 5-FTHF foi o isômero encontrado em maior quantidade nas hortaliças estudadas, sendo os floretes de brócolis considerados a melhor fonte desse isômero e o espinafre, a hortaliça que apresentou as menores concentrações. O refogamento em óleo preservou a concentração das três isoformas de folatos em couve, espinafre e mostarda. Por outro lado, a cocção sob imersão em água foi o método que menos preservou a concentração de 5-FTHF e THF em floretes de brócolis (retenção de 17,01% para THF e de 57,68% para 5-FTHF). A cocção a vapor também não se mostrou eficiente na preservação de THF em floretes de brócolis (41,83% de retenção). A metodologia otimizada 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. A estabilidade de folatos mostrou-se fortemente dependente de cada hortaliça, do método de cocção e da forma isomérica. Todas as hortaliças mostraram-se como boas fontes de folatos, sendo que seu consumo pela população deve ser estimulado.

ABSTRACT

DELLA LUCIA, Ceres Mattos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2009. **Folate analysis in leafy vegetables by high performance liquid chromatography and detection by fluorescence.** Advisor: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana. Co-Advisors: Sebastião César Cardoso Brandão and Sônia Machado Rocha Ribeiro.

The low intake of folate has been identified as a possible cause of serious diseases that affect man, such as heart disease, cancer and congenital malformations. Information in the literature about the concentration of folate in vegetables are rare and often contradictory, due to difficulties associated with analysis of this vitamin, which are related to its low stability, the presence in small concentrations in biological systems, complex procedures of extraction and variety of forms. This study aimed to optimize a methodology for determining the concentration of different natural forms of folate (tetrahydrofolate - THF, 5-methyl tetrahydrofolate - 5-MTHF and 5-formyl tetrahydrofolate - 5-FTHF) in vegetables of high consumption in Brazil and grown in Viçosa, MG (kale, spinach, mustard, flowers and sheets of broccoli). Also aimed to compare the concentrations of folate between two seasons (winter and spring) and assess its stability to various common culinary cooking practices (steam cooking, cooking on immersion in water and stir frying). The optimized method to prepare the vegetables consisted of homogenization in a buffer system (0.1 M phosphate buffer, pH 6.0), followed by heating and centrifugation, and enzymatic deconjugation of polyglutamate to monoglutamate using conjugase from rat plasma. After the stage of extraction, the extract containing the monoglutamate was purified using ion exchange column. The folate analysis was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) using gradient elution and mobile phase consisting of acetonitrile and phosphate buffer (30 mM, pH adjusted to 2.3 with phosphoric acid). We used a completely randomized design with two seasons (winter and spring), five vegetables and four replications in each season. Analysis of variance ($\alpha = 5\%$) was used to determine differences between the two seasons. To check differences between the concentration of compounds in raw and cooked vegetables it was applied the paired t test, at 5% level of probability, and the vegetables compared two by two (vegetable raw x vegetables cooked). For this analysis, we used eight replicates (four replicates in winter and four replicates in

spring). The average concentration of total folate was $549.67 \pm 467.07 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ in kale; $754.57 \pm 564.16 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ in flowers of broccoli; $731.51 \pm 384.01 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ in leaves of broccoli, $241.04 \pm 121.80 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ in spinach and $568.76 \pm 383.20 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ in mustard. There were no significant differences in the concentration of folate in vegetables analyzed in winter and spring. 5-FTHF was found in greater quantity in vegetables studied, and the flowers of broccoli were considered the best source of this isomer. Spinach was vegetable that had the lowest concentrations. Stir frying preserved the concentration of the three isoforms of folate in kale, spinach and mustard. Furthermore, cooking under immersion in water was the method that less preserved the concentration of 5-FTHF and THF in flowers of broccoli (retention of 17.01% for THF and 57.68% for 5-FTHF). Steam cooking also was not effective in preserving THF in flowers of broccoli (41.83% retention). The optimized methodology showed to be reliable for the simultaneous determination of three major forms of folate (THF, 5-MTHF and 5-FTHF) in raw and cooked leafy vegetables. The stability of folate was strongly dependent on the kind of vegetable, the method of cooking and the isomeric form. All the vegetables were considered good sources of folate, and its consumption by the population should be encouraged.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Folato é o termo utilizado para denominar compostos com atividade semelhante ao ácido pteroilglutâmico (PteGlu), também conhecido como ácido fólico. Os folatos possuem em comum a estrutura química do ácido fólico (forma sintética), sendo constituído por um anel de pteridina unido por uma ponte de metil a um resíduo de ácido p-aminobenzoico que, por sua vez, liga-se a um resíduo de ácido glutâmico (VARELA-MOREIRAS et al., 2000). As diversas formas de folato se diferenciam pelo anel de pteridina, que pode apresentar várias formas reduzidas e vários tipos de substituições de radicais, e pelo resíduo de p-aminobenzoglutamato, que pode apresentar várias ligações peptídicas a um número variável de resíduos de glutamato (Figura 1) (STOKES; WEBB, 1999).

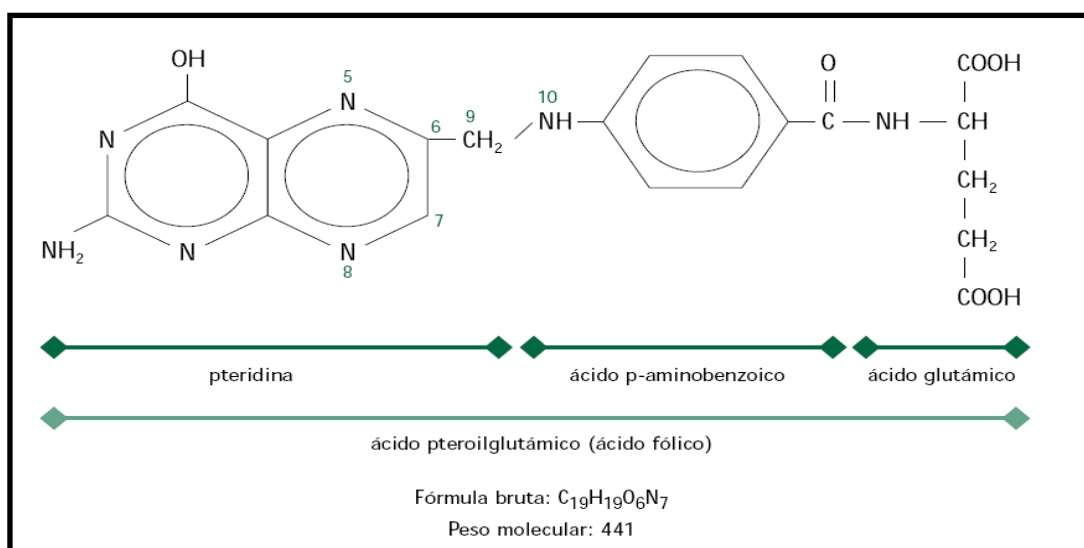


Figura 1: Estrutura química do ácido pteroilglutâmico.

Fonte: Varela-Moreiras et al., 2000.

Nos alimentos, os folatos encontram-se, em sua maioria, como derivados poliglutâmicos e podem apresentar-se em diversas formas isoméricas, com base no seu estado de oxidação e em substituições no anel de pteridina. As fontes naturais mais ricas em folatos são as hortaliças verde-escuras, como espinafre, brócolis, couve manteiga e couve de bruxelas. Outros vegetais, como couve-flor, aspargos, milho, e frutas cítricas também são boas fontes (GONZÁLEZ; GARCIA, 2003).

As formas naturais de folatos mais abundantes nos alimentos são os pteroilpoliglutamatos que contêm entre dois e sete glutamatos. Estes folatos naturais incluem 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF); 5-formiltetraidrofolato (5-FTHF); 10-formiltetraidrofolato (10-FTHF); 5, 10- metilenotetraidrofolato (5,10- metileno-THF); 5,10-meteniltetraidrofolato (5,10-metenil-THF); 5-forminotetraidrofolato (5-forminino-THF); 5,6,7,8-tetraidrofolato e diidrofolato (DHF) (MARTINEZ et al., 2005).

As formas naturais de folato predominantes nos alimentos, tanto em frutas como em hortaliças são o 5-MTHF e o 5-FTHF; nos produtos animais são o 5-MTHF e o THF; em produtos cereais são o 5-MTHF, o 10-formiltetraidrofolato (10-FTHF) e o ácido 10-formilfólico, juntamente com o ácido fólico usado para enriquecimento (RUGGERI et al., 1999).

Aproximadamente 80% do folato da dieta estão na forma de poliglutamatos e necessitam ser clivados para a forma de monoglutamatos para serem absorvidos pelo organismo, e também quantificados (FINGLAS et al., 1999).

A principal função dos folatos na célula está em sua capacidade de receber e doar elétrons a partir de unidades de carbono (VARELA-MOREIRAS et al., 2000), atuando como cofator essencial das reações de transferências de unidades monocarbono, incluindo a biossíntese de purinas e pirimidinas, bem como as interconversões de aminoácidos (EICHHOLZER et al., 2006). Em humanos, os folatos atuam na interconversão de serina e glicina, participam no catabolismo da histidina (DROGUETTI; PENTEADO, 2003) e na interconversão de homocisteína em metionina, reação que requer vitamina B₁₂ como coenzima e 5-metiltetraidrofolato como substrato. Esta reação é muito importante por se supor ser a maior fonte de metionina para a síntese de S-adenosil-metionina, um importante agente metilante *in vivo* (GREGORY, 1997).

A deficiência de folato acarreta uma série de doenças. O transtorno que ocorre mais freqüentemente em virtude da carência de folatos é a anemia macrocítica e megaloblástica, cuja sintomatologia clínica é muito semelhante à da anemia induzida pela deficiência de vitamina B₁₂ (HERBERT, 1967).

A deficiência de folato também pode estar associada com várias complicações na gestação, tais como aborto espontâneo, síndrome hipertensiva da gravidez (pré-eclâmpsia), retardo no crescimento intra-uterino e hemorragia (ROSE; MENNUTI, 1994).

Evidências epidemiológicas, clínicas e teratológicas têm demonstrado que o folato está envolvido na prevenção e patogênese de defeitos do tubo neural (DTN). As anomalias descritas mais frequentemente são anencefalia e espinha bífida, que são acompanhadas de retardo no crescimento e, em alguns casos, morte prematura (LIMA et al., 2002).

Devido às diversas funções desempenhadas pelos folatos na saúde humana, existe a necessidade de desenvolver e otimizar métodos que determinem a concentração de folatos em alimentos, de forma segura, específica e sensível.

A análise de folatos em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que se encontram naturalmente nos alimentos, da presença de inúmeros interferentes, da complexidade da matriz e da exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade desse nutriente. Os maiores desafios para determinação de folatos em alimentos incluem, além do melhoramento dos processos de extração e purificação, o desenvolvimento e a validação de métodos simultâneos para as diferentes isoformas que reduziram, sensivelmente, o tempo gasto para a análise e os custos (CATHARINO et al., 2006).

Nas frutas e hortaliças, os derivados de folatos e sua distribuição nas diferentes porções são afetados pela luz, uma vez que a síntese da vitamina ocorre na fotorrespiração. O grau de maturação também é um parâmetro importante na concentração de folatos nessas matrizes alimentares, já que participam do processo de divisão celular, sendo sua quantidade maior nos tecidos em divisão que nos tecidos maduros, onde não há ocorrência desse processo (SCOTT et al., 2000). Minerais como magnésio e potássio também são bastante importantes na produção de folatos pelas frutas e hortaliças, participando da biossíntese dessa vitamina (VAHTERISTO et al., 1997). Dessa forma, a variação na concentração dessa vitamina verificada nos estudos pode se dever a essas variações endofoclimáticas, além da variedade de espécies e da própria metodologia utilizada na sua determinação (LIMA-PALLONE et al., 2008).

Os folatos são sensíveis à luz, aos ácidos, aos álcalis, aos agentes oxidantes e aos redutores. Por seu caráter hidrossolúvel, também podem ser perdidos na água de preparação ou cocção dos alimentos (VARELA-MOREIRAS, 2000). Dessa forma, torna-se fundamental a adoção de métodos

racionais de cocção, visando ao atendimento das recomendações de ingestão de folatos e para que o próprio planejamento de dietas leve em consideração possíveis perdas.

Dentro desse panorama, verifica-se a importância da otimização e validação de metodologia confiável que permita a determinação da concentração natural de folatos em hortaliças cultivadas no Brasil em distintas épocas do ano, além da avaliação da estabilidade dessa vitamina frente a diferentes métodos de cocção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

DROGUETTI, D.C.; PENTEADO, M.V.C. Ácido fólico. In: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas - Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. 1.ed., Manole, cap.13, 2003. 612p.

EICHHOLZER, M.; TÖNZ, O.; ZIMMERMANN, R. Folic acid: a public-health challenge. **Lancet**, v.367, n.9519, p.1352-1361, 2006.

FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VATHERISTO, L.; WITTHÖFT, C.; SOUTHON, S.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, v.64, n.2, p.245-255, 1999.

GONZÁLEZ, A.I.; GARCÍA, M. Ácido fólico y defectos del tubo neural en Atención Primaria. **MEDIFAM**, v.13, n.4, p.305-310, 2003.

GREGORY, J.F. Bioavailability of folate. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, suppl.1, p.S54-S59, 1997.

HERBERT, V. Biochemical and hematological lesions in folic acid deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.20, p.562-569, 1967.

LIMA, H.T.; SAUNDERS, C.; RAMALHO, A. Ingestão dietética de gestantes do município do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v.2, n.3, p.303-311, 2002.

LIMA-PALLONE, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Determinação de folatos em espinafre – avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.58, p.81-86, 2008.

MARTINEZ, A.B.O.; BERRUEZO, G.R.; CAVA, M.J.B.; GRACIÁ, C.M.; CASTÓN, M.J.P. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.55, n.1, p.5-14, 2005.

ROSE, N.C.; MENNUTI, M.T. Periconceptional folate supplementation and neural tube defects. **Clinical and Obstetric Gynecology**, v.37, p. 605-620, 1994.

RUGGERI, S.; VAHTERISTO, L.,T.; AGUZZI, A.; FINGLAS, P.; CARNOVALE, E. Determination of folate vitamers in food and in italian reference diet by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.885, n.1, p.237-245, 1999.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility of nutritional enhancement of plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, 795 – 824, 2000.

STOKES, P.; WEBB, K. Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography-Mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.864, p.59-67, 1999.

VAHTERISTO, L.; LEHIKOINEN, K.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. **Food Chemistry**, v.59, n.4, p.589–597, 1997.

VARELA-MOREIRAS, G.; APERTE, E.A.; PRIETO, R.P. **La determinación “in vitro/in vivo” de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza.** 2000. Dissertação de mestrado. Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo-CEU, Madrid.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a concentração natural de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar uma metodologia para extração e análise da concentração natural de folatos por CLAE em hortaliças cruas e submetidas a diferentes métodos de cocção;
- Determinar a concentração natural de folatos (5-FTHF, 5-MTHF e THF) em hortaliças cruas e cozidas, cultivadas no município de Viçosa, MG;
- Comparar a concentração de folatos das hortaliças cultivadas no inverno e primavera;
- Avaliar a estabilidade de folatos nas hortaliças cozidas, utilizando métodos de cocção usados rotineiramente;

3. METODOLOGIA GERAL

3.1. Material

3.1.1. Matéria-prima

Foram utilizadas as hortaliças couve (*Brassica oleracea L.*), mostarda (*Sinapsis arvensis*), espinafre (*Spinacia oleracea L.*) e brócolis (*Brassica oleracea var. itálica*) (floretes e folhas), obtidas em Viçosa, MG no Programa de Aquisição de Alimentos (PAA). O Programa é vinculado ao Ministério de Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS) e possui convênio firmado com os estados que apresentam interesse em cadastrar seus produtores rurais, como o estado de Minas Gerais, por exemplo.

As hortaliças foram cultivadas pelo sistema convencional, sem utilização de agrotóxicos, utilizando água de córrego para irrigação e esterco de frango para adubação. As hortaliças foram provenientes de um grupo de fornecedores que semanalmente se reunia para realizar a doação ao Programa.

As hortaliças foram coletadas nos meses de agosto e outubro, em seu estágio de comercialização, caracterizando condições adequadas para consumo imediato (Figura 1) e acondicionadas em sacos plásticos. A preparação e análises das hortaliças foram realizadas em, no máximo, 48 horas após a coleta.



Figura 1. Representação fotográfica das hortaliças utilizadas.

3.1.2 Equipamentos

Para homogeneização das hortaliças, utilizou-se processador doméstico (Faet Multipratic, modelo MC5).

Para o preparo das hortaliças e para a análise de folatos, utilizou-se microtritador (Marconi modelo MA 102); bomba de vácuo (modelo CA Fanem); centrífuga (Excelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 mL modelo 206-R, Fanem) e banho metabólico (Dubnoff, Marconi). Para o preparo da fase móvel foram usados: pHmetro (Hexis, UB10); sistema de filtração (All Glass),

membranas de filtração de 0,45 µm de porosidade e sistema de degaseificação de fase móvel (Shimadzu, modelo DGU-2 A).

O Sistema de CLAE (Shimadzu, modelo SCL 10AD VP) empregado para 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); detector de fluorescência (modelo RF10AXL). O sistema foi controlado pelo software Multi System, Class VP 6.12.

3.1.3 Reagentes e outros materiais

Para análise de folatos, foram utilizadas acetonitrila grau HPLC (Tedia, EUA) e água ultrapura produzida em sistema Milli-Q[®] (Millipore, EUA). Foram utilizados reagentes com grau de pureza para análise (p.a.): 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).

Para purificação dos extratos foi preparada uma coluna com fase estacionária de Q-Sepharose (resina) (Pharmacia, EUA) em 20% de etanol 70%, utilizando uma seringa de plástico (3 mL de capacidade; 9 cm de altura; 1 cm de diâmetro) como suporte e fluxo estabelecido com auxílio de bomba peristáltica (Pharmacia Biotech).

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 unidades filtrantes (HV Millex, 0,45 µm de porosidade, Millipore, Brasil).

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

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Coleta, amostragem, preparo e acondicionamento das hortaliças

Foram coletados aleatoriamente cerca de 1 a 2 kg de cada hortaliça. Foram realizadas quatro coletas em cada estação (inverno e primavera), sendo cada semana de coleta caracterizada como uma repetição.

No Laboratório foi feita a remoção das partes não comestíveis das hortaliças (talos e folhas danificadas), sendo em seguida, lavadas em água corrente e o excesso de água removido com auxílio de papel toalha.

As hortaliças foram preparadas no Laboratório de acordo com as práticas culinárias comuns, utilizadas em domicílio e em restaurantes de pequeno e médio porte, possibilitando a análise da concentração de folatos em condições semelhantes às reais de preparação e consumo.

3.2.1.1. Preparo de couve e mostarda

Foi realizado o quarteamento das folhas de couve e mostarda, de modo que as porções dispostas em diagonal foram agrupadas, sendo uma das partes analisada crua e outra analisada após fatiamento manual utilizando faca (tiras com espessura de aproximadamente 0,5 cm) (couve fatiada e mostarda). A couve também foi analisada sob a forma rasgada, sendo o corte realizado manualmente. Após o pré-preparo, as hortaliças foram refogadas em óleo. Para cada 100 g de hortaliça, foram utilizados 8 mL de óleo de soja (1 colher de sopa), sendo o tempo de cocção igual a 2 minutos.

3.2.1.2. Preparo das folhas de brócolis e do espinafre

As folhas de brócolis e espinafre foram divididas em duas partes, sendo uma delas analisada crua e a outra, analisada após refogar em óleo. Para cada 100 g de hortaliça, foram utilizados 8 mL de óleo de soja, sendo o tempo de cocção igual a 2 minutos.

3.2.1.3. Preparo dos floretes de brócolis

Os floretes de brócolis foram divididas em três partes, sendo uma delas analisada crua, a outra analisada após cocção a vapor (utilizando panela a vapor doméstica) e a terceira parte, após cocção sob imersão em água em ebulição, em quantidade suficiente para cobrir a hortaliça (100 g de hortaliça

em 1000 mL de água (LIMA-PALLONE et al., 2008). O tempo de cocção foi igual a 6 minutos.

Logo depois da cocção, todas as hortaliças foram processadas em multiprocessador para completa homogeneização, sendo acondicionadas em geladeira doméstica até o momento da análise.

3.2.2. Extração de folatos

Durante as etapas de extração e análise, as hortaliças e o 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 por meio da utilização de tampas e de ambiente com gás nitrogênio nas vidrarias.

A extração foi baseada em metodologia utilizada por Vahteristo et al. (1997), Jastrebova et al. (2003) e Stea et al. (2006) e otimizada em nosso laboratório. Para a extração foram pesados em balança digital semi-analítica cerca de 3,00 g de hortaliça (o peso exato foi anotado) previamente homogeneizada em processador de alimentos. A hortaliça foi triturada com 15 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, colocados de uma única vez, 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 minutos em banho-maria a 100 °C, sob agitação em frasco de vidro âmbar, fechado, em atmosfera inerte, obtida com fluxo de nitrogênio. Em seguida, o extrato foi resfriado com auxílio de gelo, centrifugado (1789 g, por 30 minutos) e, em seguida, utilizado para desconjugação de poliglutamatos.

3.2.3. Desconjugação de poliglutamatos

Para desconjugação dos poliglutamatos a monoglutamatos, 100 µL de plasma de rato contendo a enzima conjugase (γ -glutamil carboxipeptidase) foram adicionados ao sobrenadante (3mL) obtido no procedimento de extração descrito anteriormente. O plasma de rato foi obtido por meio da centrifugação (2500 g por 10 minutos) de sangue de ratos *Wistar*, machos e saudáveis, obtidos no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. O sobrenadante obtido a partir

desse procedimento (100 µL) foi adicionado em tubos *ependorf* e armazenado a -18°C até utilização.

Os extratos de hortaliças contendo o plasma permaneceram em banho-maria a 37°C por 3 horas. Em seguida, para ocorrer inativação enzimática, os extratos foram aquecidos em água fervente por 5 minutos (JASTREBOVA et al., 2003). Para efeito de controle, investigou-se a presença de folatos endógenos, injetando na coluna cromatográfica alíquotas de plasma de rato diluídas em solução extratora, e comparando-se os tempos de retenção dos picos encontrados com aqueles presentes nos extratos de hortaliças e de soluções de padrões.

3.2.4. Purificação do extrato de hortaliças

A purificação do extrato foi feita com base em procedimento descrito por Jastrebova et al. (2003). O extrato obtido no procedimento anterior foi purificado utilizando coluna de troca iônica, com fase estacionária de Q-Sepharose. A coluna foi pré-condicionada com metanol e água (1:1) a um fluxo de 1-2 gotas/segundo. O extrato foi aplicado à coluna a um fluxo de 2 gotas/segundo, aproximadamente. 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 através de unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm.

3.2.5. Curvas de calibração de THF, 5-MTHF e 5-FTHF

A solução estoque dos padrões de folato (200 µg/mL), assim como as soluções com concentrações crescentes dos padrões, foram preparadas 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 e corrigida, utilizando-se a seguinte equação:

$$A = E \times C \times L$$

Em que:

A = Absorvância máxima (lida a 297 nm para THF, a 290 nm para 5-MTHF e a 285 nm para 5-FTHF, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 2,0) (BALL, 1998);

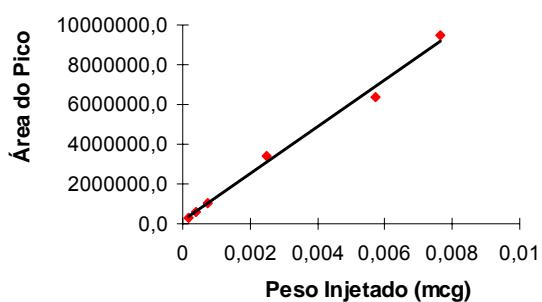
E = Coeficiente de absorvidade molar (para THF, 27; para 5-MTHF, 32 e para 5-FTHF, 31,5) (BLAKELY, 1969);

C = Concentração molar;

L = Largura da cubeta (1 cm).

As curvas de calibração dos isômeros de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF) foram elaboradas considerando a concentração dos componentes nas hortaliças. Utilizou-se injeção em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções padrão na faixa de 0,0095 a 0,3821 $\mu\text{g/mL}$ para curva de THF; 0,2432 a 9,73 $\mu\text{g/mL}$ para curva de 5-FTHF e 0,049 a 0,98 $\mu\text{g/mL}$ para curva de 5-MTHF. As curvas elaboradas com faixas amplas foram necessárias devido à variação de concentração dos isômeros nas hortaliças, além da preocupação com as possíveis perdas nos processos de cocção.

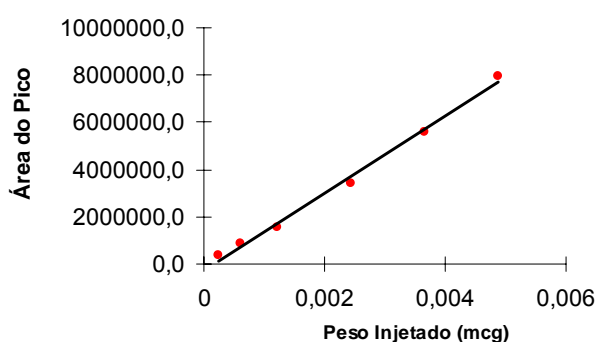
As curvas de calibração e equações de regressão utilizadas para cálculo de folatos nas hortaliças são apresentadas na Figura 2.



THF

$$Y = 1178396061 X + 158374$$

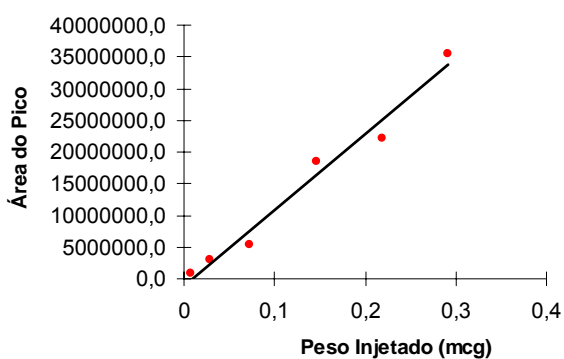
$$R^2 = 0,9931$$



5-MTHF

$$Y = 163409416 X - 262055$$

$$R^2 = 0,9936$$



5-FTHF

$$Y = 119560115,8 X - 1041248$$

$$R^2 = 0,9760$$

Figura 2. Correlação linear entre a concentração de THF, 5-MTHF e 5-FTHF e as áreas dos picos correspondentes.

Eixo Y: Áreas médias dos picos obtidas pelas injeções em duplicata.

3.2.6. Análise de folatos por CLAE

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 μ L, 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, 150 mm x 4,6 mm, 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 0,7 mL/min; volume injetado, 50 µL, 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 minutos e foi aumentado linearmente para 25% em 25 minutos, permanecendo nessa concentração durante 2 minutos, retornando em seguida às condições iniciais. A coluna foi re-equilibrada por 15 minutos antes da próxima injeção. O tempo total de corrida foi de 43 minutos.

Para evitar a formação de bolhas e controlar a grande variação da pressão, foi necessário utilizar um sistema de degasamento da fase móvel com gás hélio antes e durante as corridas cromatográficas. Assim, a fase móvel foi degaseificada por 15 minutos a 150 kpa antes do início das análises e a 100 kpa ao longo das corridas.

3.2.7. Identificação e quantificação de folatos

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 co-cromatografia (adição de padrões vitamínicos às hortaliças e verificação do aumento das áreas dos respectivos picos).

A partir das curvas de calibração e equações de regressão obtidas, foram calculadas as concentrações dos isômeros de folatos presentes nas hortaliças. O valor real da concentração nas hortaliças foi obtido por cálculos a partir das diluições realizadas.

3.2.8. Cálculo da estabilidade dos folatos nas hortaliças após cocção

A porcentagem de retenção da concentração de folatos após diferentes métodos de cocção foi ajustada levando-se em consideração as modificações de peso sofridas pelas hortaliças. Para tanto, foi utilizada a fórmula da retenção verdadeira ou real (% RR) (MURPHY; CRINER; GRAY, 1975), como descrito abaixo:

$$\% \text{ RR} = \frac{\text{Fcoz} (\mu\text{g}) \times \text{Hcoz} (\text{g})}{\text{Fc} (\mu\text{g}) \times \text{Hc} (\text{g})} \times 100$$

Em que:

Fcoz = concentração de folato na hortaliça cozida

Fc = concentração de folato na hortaliça crua

Hcoz = quantidade de hortaliça cozida

Hc = quantidade de hortaliça crua

3.2.9. Testes para validação da metodologia

3.2.9.1. Recuperação e faixa de linearidade

Testes de recuperação de THF, 5-MTHF e 5-FTHF foram realizados pela adição dos padrões ao espinafre cru, couve rasgada refogada, folhas de brócolis cruas, floretes de brócolis cozidos sob imersão e mostarda refogada na proporção de 20 a 100% da concentração médio 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 seis concentrações crescentes das soluções padrão de THF (entre 0,0095 e 0,3821 $\mu\text{g/mL}$), 5-MTHF (entre 0,049 e 0,98 $\mu\text{g/mL}$) e 5-FTHF (entre 0,2432 e 9,73 $\mu\text{g/mL}$), utilizando as mesmas condições cromatográficas empregadas para análise dos extratos. Os dados obtidos para as áreas dos picos foram usados para análise de regressão linear (LANÇAS, 2004).

3.2.9.2. 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 da linha de base ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo 10 vezes o LD (CATHARINO et al., 2006).

3.2.9.3. Repetibilidade

O teste de repetibilidade foi realizado pela extração (cinco repetições) e análise em duplicata de uma mesma hortaliça contendo os isômeros THF, 5-MTHF e 5-FTHF. A avaliação da repetibilidade foi feita pelo cálculo do

coeficiente de variação das áreas dos picos dos componentes analisados (LANÇAS, 2004).

3.2.9.4. Avaliação da estabilidade de folatos em extrato de hortaliças

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

3.3. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para o estudo das concentrações de folatos foi considerado um delineamento inteiramente casualizado com duas estações do ano (inverno e primavera), cinco hortaliças e quatro repetições em cada estação. Realizou-se a análise de variância ($\alpha= 5\%$) para verificar a existência de diferenças significativas entre as duas estações. Para verificação de diferenças significativas entre a concentração dos compostos nas hortaliças cruas e submetidas à cocção, foi aplicado o teste t pareado, ao nível de 5% de probabilidade, sendo as hortaliças comparadas duas a duas (hortaliça crua x hortaliça cozida/refogada). Para essa análise, foram consideradas oito repetições (quatro repetições no inverno e quatro na primavera).

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, G.F.M. Folate. In: BALL, G.F.M. **Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods**. 1ª Edition. Ed. Chapman & Hall, London, UK, 1998. p. 439-487.
- BALL, G. F. M. **Water-soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994.
- BLAKELY, R.L. The biochemistry of folic acid and related pteridines. In: NEUBERGER A.; TATUM, E.L. **Frontiers of Biology**. Amsterdam: North Holland Publishing Company, p. 92-94, 1969.
- CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T.; LIMA-PALLONE, J.A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Revista Química Nova**, v.29, n.5, p.972-976, 2006.
- JASTREBOVA, J.; WITTHÖFT, C.; GRAHN, A.; SVENSSON, U.; JÄGERSTAD, M. HPLC determination in raw and processed beetroots. **Food Chemistry**, v.80, p. 579-588, 2003.
- LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 6ª ed. São Carlos, Ed. Rima, 2004, 62 p.
- LIMA-PALLONE, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Química Nova** (no prelo), 2008.
- MURPHY, E.W.; CRINER, P.E.; GRAY, B.C. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, n.6, p.1153-1157, 1975.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT User's Guide**. Version 9.1, Fourth Edition, v.2, Cary, NC: SAS Institute Inc. 846p, 2003.
- STEA, T.H; JOHANSSON, M.; JÄGERSTAD, M.; FROLISH, W. Retention of folates in cooked and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. **Food Chemistry**, v.101, p.1095-1107, 2006.
- VAHTERISTO, L.; LEHIKONEN, K.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. **Food Chemistry**, v.59, n.4, p.589–597, 1997.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo 1

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

RESUMO

Os folatos ocorrem como um grupo de poliglutamatos cuja multiplicidade de formas e níveis geralmente baixos em alimentos tornam a análise quantitativa um desafio a ser superado. A determinação de folatos geralmente envolve sua liberação da matriz alimentar; a desconjugação dos poliglutamatos para as formas de monoglutamatos e a detecção das isoformas resultantes. O objetivo desse trabalho foi otimizar uma metodologia utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a determinação simultânea de três isoformas de folatos (tetraidrofolato - THF, 5-metiltetraidrofolato – 5-MTHF e 5-formiltetraidrofolato – 5-FTHF) em hortaliças folhosas (couve, espinafre, mostarda, floretes e folhas de brócolis) cruas e submetidas a cocção. A preparação das hortaliças envolveu homogeneização em um sistema tampão, seguida por aquecimento e centrifugação, procedendo-se a desconjugação enzimática dos poliglutamatos para monoglutamatos, utilizando conjugase proveniente de plasma de rato. Após a fase de extração, o extrato contendo os monoglutamatos foi purificado utilizando coluna de troca iônica. A análise dos folatos foi feita por CLAE, utilizando gradiente de eluição e fase móvel composta de acetonitrila e solução tampão fosfato (30 mM, pH ajustado para 2,3 com ácido fosfórico). Para validação da metodologia, foram realizados testes de recuperação, linearidade, limites de detecção e quantificação e avaliação da estabilidade do extrato vitamínico. A análise qualitativa mostrou cromatogramas com excelente resolução de picos das três isoformas de folato, com tempo de corrida de 43 minutos. A concentração de folatos totais variou de $154,79 \pm 98,38 \mu\text{g}/100\text{g}$ em espinafre cru a $803,74 \pm 495,61 \mu\text{g}/100\text{g}$ em folhas de brócolis refogadas. O plasma de rato, fonte da enzima γ -glutamil carboxipeptidase, não demonstrou a presença de folatos endógenos, o que justificou seu uso no presente trabalho, além de sua facilidade de obtenção e preparo. Os limites de quantificação foram iguais a 2 ng/mL; 2 ng/mL e 28 ng/mL para THF, 5-MTHF e 5-FTHF, respectivamente. As taxas de recuperação variaram de 87,86 a 100,64% para THF; 88,12 a 94,22% para 5-MTHF e 89,82 a 106,69% para 5-FTHF. O teste de repetibilidade mostrou coeficiente de variação em relação às áreas dos picos inferior a 10%. Os testes de linearidade mostraram-se satisfatórios, sendo os coeficientes de determinação iguais a 0,9932; 0,9936 e 0,9761 para THF, 5-MTHF e 5-FTHF, respectivamente. Todos os isômeros apresentaram perdas consideráveis após

diferentes tempos de estocagem em temperatura de refrigeração (8°C) e em temperatura de congelamento (-18°C), sendo que o THF foi o isômero com menor estabilidade. A metodologia otimizada mostrou-se eficiente quando aplicada para análise de diferentes hortaliças cruas e cozidas e pode ser utilizada para a determinação de folatos nesse tipo de matriz alimentar.

Palavras-chave: tetraidrofolato - THF, 5-metiltetraidrofolato – 5-MTHF, 5-formiltetraidrofolato – 5-FTHF, CLAE.

ABSTRACT

Folate occur as a group of poliglutamate whose multiplicity of forms and generally low levels in food make quantitative analysis a challenge to overcome. Determination of folate normally involves their liberation from the food matrix, the deconjugation of poliglutamate to monoglutamate forms and detection of isoforms. This study aimed to optimize a methodology using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the simultaneous determination of three folate isoforms (tetrahydrofolate - THF, 5-methyl tetrahydrofolate - 5-MTHF and 5-formyl tetrahydrofolate - 5-FTHF) in leafy vegetables (kale, spinach, mustard, flowers and leaves of broccoli), raw and submitted to cooking. Sample preparation involved homogenization in a buffer system, followed by heating, centrifugation and enzyme deconjugation of poliglutamate to monoglutamate using conjugase obtained from plasma of rats. After the step of extraction, the extract containing the monoglutamate was purified using ion exchange column. The analysis of folate was carried out by HPLC, using gradient of elution and mobile phase consisting of acetonitrile and phosphate buffer (30 mM, pH adjusted to 2.3 with phosphoric acid). To validate the methodology, tests were made to analyze recovery, linearity, limits of detection and quantification and assessment of the stability of vitamin extract. The qualitative analysis showed chromatograms with excellent resolution of peaks of the three isoforms of folate, with a running time of 43 minutes. The contents of total folate ranged from $154.79 \pm 98.38 \mu\text{g}/100\text{g}$ in raw spinach to $803.74 \pm 495.61 \mu\text{g}/100\text{g}$ in stir fried leaves of broccoli. Plasma of rats, source of the enzyme γ -glutamyl carboxipeptidase, did not show the presence of endogenous folate, which justified its use in this work, besides its ease of collection and preparation. Limits of quantification and recovery rates were respectively 2 ng/mL and from 87.86 to 100.64% for THF, 2 ng/mL and from 88.12 to 94.22% for 5-MTHF and

28 ng / mL and 89.82 to 106.69% for 5-FTHF. Test of repeatability showed relative standard deviation for peak areas lower than 10%. Tests for linearity were shown to be satisfactory, with coefficients of determination equal to 0.9932, 0.9936 and 0.9761 for THF, 5-MTHF and 5-FTHF respectively. All isomers showed considerable losses after different times of storage at refrigeration temperature (8°C) and freezing temperature (-18°C), and THF was the isomer that showed lower stability. The optimized methodology was efficient when applied to analysis of various raw and cooked vegetables and can be used for the determination of folate in this type of food matrix.

Key words: tetrahydrofolate - THF, 5-methyl tetrahydrofolate - 5-MTHF, 5-formyl tetrahydrofolate - 5-FTHF, HPLC.

1. 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 (DIERKES et al., 1998).

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 formas (JASTREBOVA et al., 2003) e quantidades reduzidas nos alimentos.

Os folatos são predominantemente poliglutamatos, contendo até sete resíduos de L-glutamato ligados ao grupo p-aminobenzóico por ligações peptídicas (MCKILLOP et al., 2002). Como os diferentes tipos de folato têm absorção e metabolismo diferentes, eles não podem ser quantificados como um só composto (OSSEYI et al., 1998; FINGLAS et al., 1999).

Tradicionalmente, a concentração de folato tem sido avaliado por meio de ensaios microbiológicos, com a utilização de *Lactobacillus casei*, em que a resposta de crescimento do microrganismo à mistura de folatos presente é mensurada turbidimetricamente (NDAW et al., 2001). 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, as técnicas bioespecíficas e CLAE não respondem de forma adequada aos derivados de folatos de cadeia longa. Portanto, a conversão de poliglutamatos a formas de mono ou diglutamatos requer uma conversão enzimática, utilizando a enzima γ -glutamil 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 (ASCORT; SHRESTHA, 2005).

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 metodologias apropriadas para a determinação de folatos também tem aumentado (CATHARINO et al., 2006). Particularmente no Brasil, o desenvolvimento e 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.

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 (CAMPOS et al., 2006). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar em nosso laboratório uma metodologia, utilizando CLAE, para a determinação simultânea de três formas mais importantes de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF) em cinco hortaliças cruas e cozidas (couve, espinafre, mostarda, floretes e folhas de brócolis).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. 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). Foram utilizados reagentes com grau de pureza para análise (p.a.): 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).

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-tetraidrofolato de sódio (THF), (6S)-5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato (5-MTHF) e (6S)-5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato (5-FTHF) foram cedidos gentilmente pela Merck-Eprova (Suíça) e mantidos a -18°C até utilização.

2.2. Coleta e preparo das hortaliças

Foram utilizadas as hortaliças couve (*Brassica oleracea L.*), mostarda (*Sinapsis arvensis*), espinafre (*Spinacia oleracea L.*) e brócolis (*Brassica oleracea var. itálica*) (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). 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 oito repetições, sendo cada repetição representada por uma coleta semanal, realizada nos meses de agosto e outubro de 2008.

As análises das hortaliças foram realizadas em até 48 horas após a coleta, permanecendo estas acondicionadas em geladeira. As hortaliças foram

lavadas em água corrente e analisadas na forma crua e cozida, utilizando métodos de cocção tradicionais. Couve, mostarda, espinafre e folhas de brócolis foram refogadas em óleo enquanto os floretes de brócolis foram cozidos sob imersão em água.

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.

2.3. 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 da utilização de vidrarias com tampas e de ambiente com gás nitrogênio.

A extração foi baseada em metodologia utilizada por Vahteristo et al. (1997), Jastrebova et al. (2003) e Stea et al. (2006) e otimizada em nosso laboratório. Para a extração foram pesados cerca de 3,00 g de hortaliça (o peso exato foi anotado), previamente homogeneizada em processador de alimentos. 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 minutos em banho-maria a 100°C, sob agitação, utilizando frascos âmbar com tampa e atmosfera inerte, obtida com gás nitrogênio. Em seguida, foi resfriado, centrifugado (1789 g, por 30 minutos) e, em seguida, utilizado para desconjugação de poliglutamatos.

Para desconjugação dos poliglutamatos a monoglutamatos, 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 minutos) de sangue de ratos Wistar, machos e saudáveis. O sobrenadante obtido a partir desse procedimento foi coletado, armazenado em alíquotas de 100 µL em tubos *ependorf* e armazenado a -18°C. Os extratos de hortaliças contendo o plasma foram colocados em banho-maria a 37°C por 3 horas. Em seguida, para ocorrer inativação enzimática, os extratos foram

aquecidos em água fervente por 5 minutos (JASTREBOVA et al., 2003). 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 àqueles presentes nas hortaliças e nas soluções de padrões.

2.4. Purificação dos extratos de hortaliças

A purificação do extrato foi feita com base em procedimento descrito por Jastrebova et al. (2003). O extrato obtido no procedimento anterior foi purificado utilizando coluna de forte troca iônica, com fase estacionária de Q-Sepharose. A coluna foi pré-condicionada com metanol e água (1:1) a um fluxo de 1-2 gotas/segundo. O extrato foi aplicado à coluna a um fluxo de 2 gotas/segundo, aproximadamente. A coluna foi lavada com água ultrapura para remoção dos componentes interferentes (fluxo de 1-2 gotas/segundo). 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.

2.5. Curvas de calibração e quantificação de folatos

A solução estoque dos padrões de folato (200 µg/mL), assim como as soluções com concentrações crescentes dos padrões, foram preparadas 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 e corrigida utilizando-se a seguinte equação:

$$A = E \times C \times L$$

Em que:

A = Absorvância máxima (lida a 297 nm para THF, a 290 nm para 5-MTHF e a 285 nm para 5-FTHF, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 2,0 (BALL, 1998);

E = Coeficiente de absorvidade molar (para THF, 27; para 5-MTHF, 32 e para 5-FTHF, 31,5 (BLAKELY, 1969);

C = Concentração molar;

L = Largura da cubeta (1 cm).

As curvas de calibração dos isômeros de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF) foram elaboradas considerando a concentração dos componentes nas hortaliças. Utilizou-se injeção em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções padrão na faixa de 0,0095 a 0,3821 µg/mL para curva de THF; 0,2432 a 9,73 µg/mL para curva de 5-FTHF e 0,049 a 0,98 µg/mL para curva de 5-MTHF.

A partir das curvas de calibração 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.

2.6. Condições de análise por CLAE

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, 150 mm x 4,6 mm, 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 minutos e aumentado linearmente para 25% em 25 minutos, permanecendo nessa concentração por 2 minutos, retornando em seguida às condições iniciais. A coluna foi re-equilibrada por 15 minutos antes da próxima corrida. O tempo total de corrida foi de 43 minutos.

Para evitar a formação de bolhas e controlar a grande variação da pressão, foi necessário utilizar um sistema de degasamento da fase móvel com gás hélio antes e durante as corridas cromatográficas. Assim, a fase móvel foi degaseificada por 15 minutos 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 co-cromatografia.

2.7. Validação do método

Testes de recuperação e faixa de linearidade

Testes de recuperação de THF, 5-MTHF e 5-FTHF foram realizados pela adição de padrão ao espinafre cru, couve rasgada e refogada, folhas de brócolis cruas, floretes de brócolis cozidos sob imersão em água e 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 seis concentrações crescentes das soluções padrão de THF, 5-MTHF e 5-FTHF, utilizando as mesmas condições cromatográficas empregadas para análise dos extratos. Os dados obtidos para as áreas dos picos foram usados para análise de regressão linear (LANÇAS, 2004).

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 (CATHARINO et al., 2006).

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) (LANÇAS, 2004).

Avaliação da estabilidade de folatos em extrato de hortaliça

Visando avaliar possíveis perdas de folatos durante o armazenamento do extrato de hortaliças antes da análise, utilizando duas diferentes

temperaturas (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 horas após a extração) e em temperatura de congelamento (-18°C) (Tempo 2 – 48 horas após a extração; Tempo 3 – 72 horas após a extração e Tempo 4 – 7 dias após a extração). Cada injeção foi realizada em triplicata.

2.8. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para o estudo das concentrações de folatos nas hortaliças foi considerado um delineamento inteiramente casualizado com cinco hortaliças e oito repetições. Realizou-se análise de variância e teste de amplitudes múltiplas de Duncan ($\alpha= 5\%$) 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise qualitativa

A Figura 1 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 desconjugação enzimática.

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 minutos. Em função da utilização do sistema de eluição por gradiente, o tempo de re-equilíbrio da coluna foi fixado em 15 minutos após o final da corrida e foi fundamental para a repetibilidade do método.

Observou-se que a presente metodologia mostrou ser útil e aplicável para separação das principais isoformas de folatos nas diferentes matrizes de hortaliças folhosas cruas e cozidas (cromatogramas não mostrados).

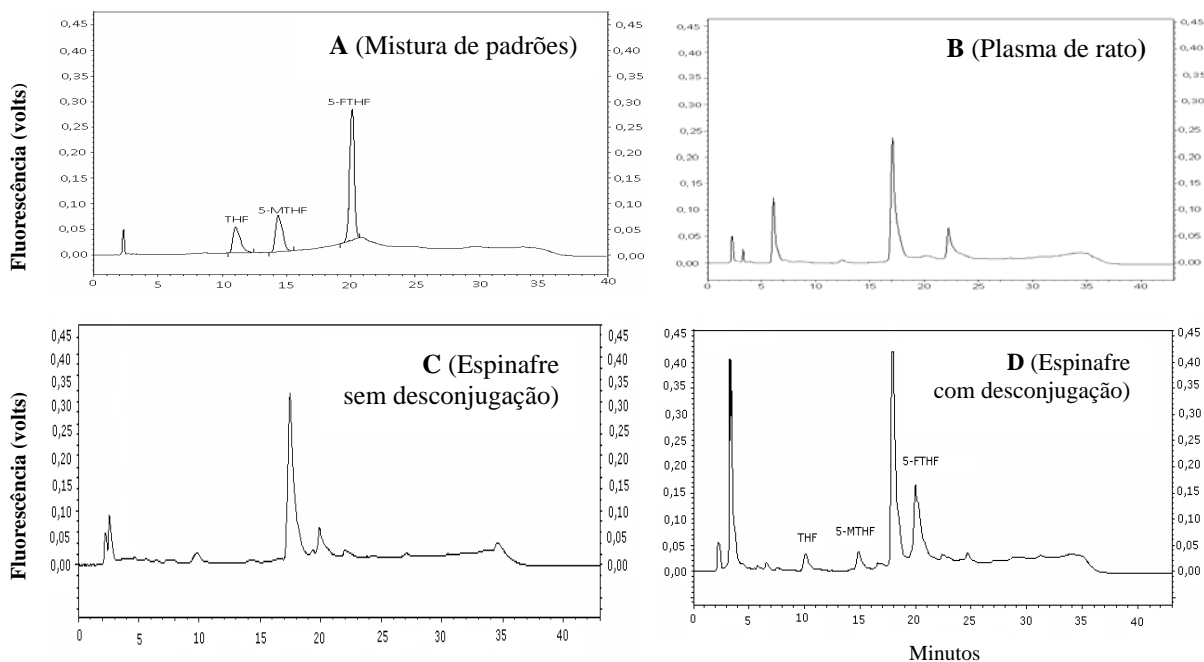


Figura 1. Cromatogramas típicos de mistura de padrões de folatos, plasma de rato sem a adição de hortaliça e espinafre com e sem desconjugação de poliglutamatos.

Condições cromatográficas são descritas em métodos (Item 2.6).

Com o objetivo de se avaliar o efeito da adição de plasma de rato ao extrato de hortaliça, analisaram-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 minutos para THF, 14,5 minutos para 5-MTHF e 20 minutos para 5-FTHF) não foram detectados picos (Figura 1 - cromatograma C), significando a necessidade da etapa de desconjugação 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 μ L), 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 (Figura 1 - cromatograma B). Esses resultados sugerem a ausência de folatos no plasma

de rato utilizado para desconjugação de poliglutamatos, o que confere maior confiabilidade à quantificação real de folatos nas hortaliças estudadas.

3.2. Concentração média 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, 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 por Stea et al. (2006), em que os autores encontraram concentração igual a 866 µg/100g mas, em geral, foi superior ao encontrado na maioria dos trabalhos revisados. Por exemplo, Lima-Pallone et al. (2008) encontraram concentração de folatos totais em floretes de brócolis igual a 427,8 µg/100g. A etapa de desconjugação enzimática não foi utilizada por esses autores. Vahteristo et al. (1997), De Souza; Eitenmiller (1986) e Mullin et al. (1982) reportaram concentrações de folatos totais iguais a 114 µg/100g, 102 µg/100g e 133 µg/100g, respectivamente, os quais foram inferiores aos encontrados no presente estudo.

Tabela 1. Concentração média* de THF, 5-MTHF e 5-FTHF e de folatos totais em hortaliças cruas (em µg/100 g de matéria fresca).

Hortaliças	THF	5-MTHF	5-FTHF	Soma de Folatos
Couve	72,91 a ± 46,05	67,02 a ± 41,63	409,74 ab ± 379,39	549,67 ab ± 267,89
Floretes de brócolis	69,46 a ± 57,67	123,10 a ± 91,29	562,01 a ± 415,20	754,57 a ± 326,82
Folhas de brócolis	60,71 a ± 32,42	219,40 a ± 87,47	451,40 ab ± 264,12	731,51 a ± 306,76
Espinafre	24,57 a ± 21,89	42,70 a ± 26,59	173,77 b ± 73,32	241,04 b ± 81,29
Mostarda	71,68 a ± 60,85	164,90 a ± 32,41	332,18 ab ± 289,94	568,76 ab ± 234,22

*Média de oito repetições ± desvio padrão

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

Em espinafre, as concentrações de folatos totais encontradas em nosso estudo estão na faixa descrita pela literatura. Iwatani et al. (2003) relataram concentração de folatos nessa hortaliça iguais a 302 µg/100g. Lin e Lin (1999), DeSouza e Eitenmiller (1986), Shrestha et al. (2000) e Aiso e Tamura (1998)

reportaram concentrações de folatos iguais a 364 µg/100g, 251 µg/100g, 193 µg/100g e 224 µg/100g, respectivamente, utilizando metodologia semelhante à do presente estudo.

O único estudo encontrado a respeito da concentração de folatos em mostarda foi o de Iwatani et al. (2003), no qual os autores detectaram concentração dessa vitamina igual a 278 µg/100g, inferior ao verificado 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, a qual buscou-se minimizar utilizando coleta de hortaliças no mesmo estágio de comercialização e completa homogeneização das hortaliças.

3.3. Faixa de linearidade e teste de recuperação

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. Lima-Pallone et al. (2008) encontraram valores médios de recuperação de THF, 5-MTHF e 5-FTHF entre 94 e 99%, quando analisaram floretes de brócolis convencional e orgânico. Stea et al. (2006), utilizando metodologia semelhante à utilizada no presente estudo, obtiveram taxas de recuperação de folatos variando de 92 a 96% em ervilhas, também indicando boa exatidão do método.

Tabela 2. Recuperação* dos padrões de THF, 5-MTHF e 5-FTHF adicionados às hortaliças cruas e cozidas.

Hortaliça	Isômero	Concentração* inicial (µg/g)	Padrão adicionado* (µg/g)	Concentração final* (µg/g)	Recuperação** (%)
Couve rasgada refogada	THF	0,1752	0,253	0,4229	96,97
	5-MTHF	0,4032	0,5	0,8799	94,22
	5-FTHF	27,727	16,3	41,4112	90,56
Folhas de brócolis cruas	THF	0,5136	0,3244	0,7978	92,17
	5-MTHF	0,6768	0,3029	0,9392	94,01
	5-FTHF	68,1247	16,5118	79,1914	92,0
Espinafre cru	THF	0,1582	0,1622	0,3012	87,86
	5-MTHF	0,3172	0,1465	0,4272	88,49
	5-FTHF	11,2982	4,46	16,5142	106,69
Mostarda refogada	THF	0,1653	0,3307	0,65614	100,64
	5-MTHF	0,8474	0,3224	1,0913	90,73
	5-FTHF	60,7264	6,4867	61,0332	89,82
Floretes de brócolis cozidos sob imersão	THF	0,2127	0,16	0,3625	95,2
	5-MTHF	0,6073	0,32	0,8552	88,12
	5-FTHF	77,5306	9,73	85,8658	98,20

*Médias de duas repetições ± desvio padrão (DP). Concentração em matéria fresca.

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

3.4. 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, o limite de detecção foi de 28 ng/mL

Day e Gregory III (1981) reportaram limites de detecção para THF, 5-MTHF e 5-FTHF iguais a 5, 3 e 10 ng/mL, respectivamente, semelhantes aos encontrados no presente estudo. Nossos resultados são similares aos de Duch et al. (1983) para THF e 5-MTHF, embora o limite de detecção para 5-FTHF tenha sido inferior, da ordem de 1,5 ng/mL. Holt et al. (1988) obteve 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 a metodologia otimizada permite a detecção de concentrações muito reduzidas de folatos em hortaliças.

3.5. Repetibilidade

Os valores de repetibilidade foram expressos como coeficiente de variação para área do pico. Os valores encontrados foram de 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 (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

3.6. Estabilidade de folatos em extratos de hortaliças

A análise de folatos nas hortaliças envolveu procedimentos que poderiam favorecer perdas vitamínicas, tais como a preparação do extrato utilizando extração a quente (100°C) e o tratamento enzimático do extrato utilizando banho-maria a 37°C por 3 horas. 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 (PATRING et al., 2005). 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) (Tempo 0 – imediatamente após o procedimento de extração e Tempo 1 – 4 horas após a extração) e em temperatura de congelamento (-18°C) (Tempo 2 – 24 horas após a extração; Tempo 3 – 48 horas após a extração e Tempo 4 – 7 dias após a extração).

A estabilidade dos isômeros de folatos ao longo do tempo de estocagem em extratos de espinafre pode ser visualizada na Figura 2.

Observou-se que todos os isômeros apresentaram perdas consideráveis (retenção variando de 30 a 90%) 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 horas do procedimento de extração, a retenção foi de aproximadamente 70%. Após 7 dias de estocagem sob congelamento, o extrato de espinafre apresentou apenas 27,07% da concentração inicial de THF.

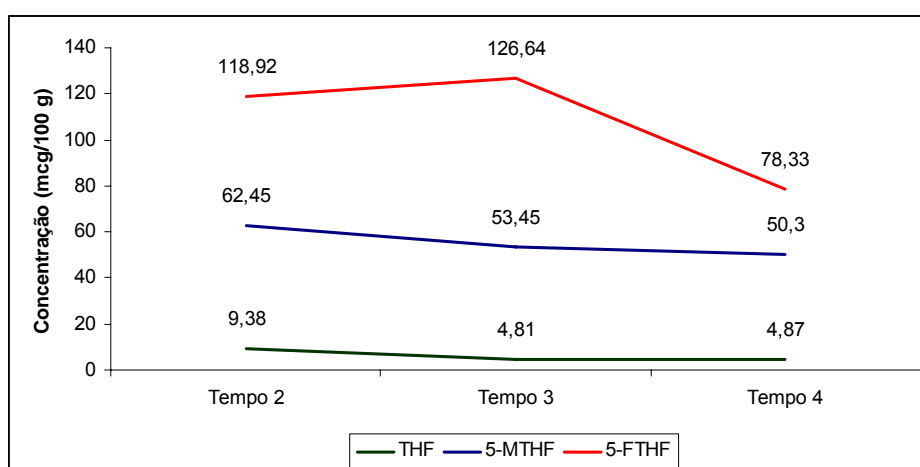
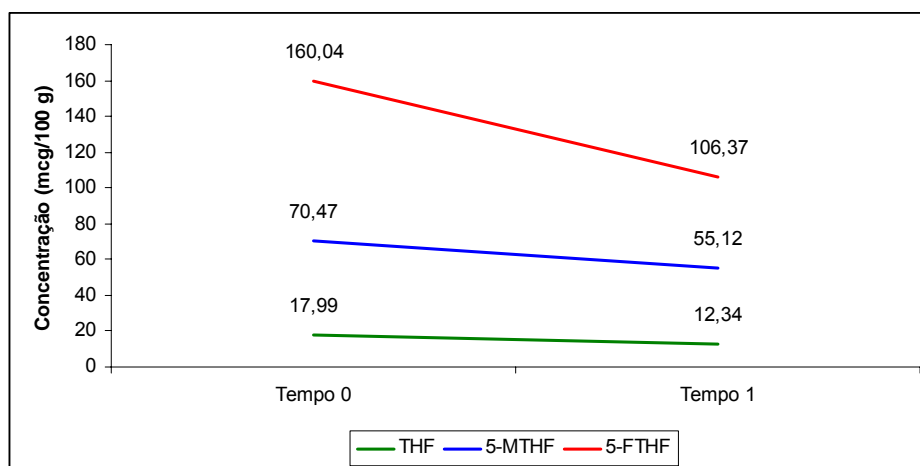


Figura 2. Estabilidade de isômeros de folatos em extrato de espinafre após diferentes tempos de estocagem em temperatura de refrigeração (8°C; Tempos 0 e 1) e em temperatura de congelamento (-18°C; Tempos 2, 3 e 4).

Tempo 0 - Imediatamente após o procedimento de extração; Tempo 1 - 4 horas após a extração; Tempo 2 - 24 horas após a extração; Tempo 3 - 48 horas após a extração; Tempo 4 - 7 dias após a extração. Valores em $\mu\text{g}/100\text{g}$.

As menores perdas foram observadas para 5-MTHF, o qual apresentou retenção de 71,37% da concentração inicial após sete dias de armazenamento a -18°C (redução de 70,47 para 50,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$). Esses resultados corroboram os de Patring et al. (2005), que verificaram que o 5-MTHF mostrou-se 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. Como demonstrado por Tamura et al. (1997), mesmo a estocagem a -70°C

pode levar a perdas consideráveis de THF em extratos alimentares. Esses resultados demonstram a importância da realização da análise cromatográfica logo após o procedimento de extração, visando à diminuição de perdas de folatos e a garantia de resultados mais confiáveis e próximos do valor real presente na hortaliça.

4. CONCLUSÕES

A metodologia otimizada 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.

Essa metodologia também pode ser testada e aplicada à análise de folatos em outras matrizes, dessa forma, contribuindo para a avaliação da concentração de folatos em outros alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e à FAPEMIG pela bolsa de iniciação científica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISO, K.; TAMURA, T. Trienzyme treatment for food folate analysis: Optimal pH and incubation time for α -amilase and protease treatment. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.44, p.361-370, 1998.

ASCORT, J., SHRESTHA, A. Folate: methods of analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 253-266, 2005.

BALL, G.F.M. Folates. In: BALL, G.F.M. **Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods**. 1ª Edition. Ed. Chapman & Hall, London, UK. 1998. p. 439 – 487.

BLAKELY, R.L. The biochemistry of folic acid and related pteridines. In: NEUBERGER A.; TATUM, E.L. **Frontiers of Biology**. Amsterdam: North Holland Publishing Company, p. 92-94, 1969.

CAMPOS, F. M., PINHEIRO-SANT'ANA, H. M., SOUZA, P. M.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J.B.P. **Pró-vitaminas A em hortaliças comercializadas no**

mercado formal e informal de Viçosa (MG), em três estações do ano. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.1, p.33-40, 2006.

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

DAY, B.P.; GREGORY III, J.F. Determination of folacin derivatives in selected foods by high performance liquid chromatography. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.29, p. 374-377, 1981.

DESOUZA, S.C.; EITENMILLER, R.R. Effects of processing and storage on the folate content of spinach and broccoli. ***Journal of Food Science***, v.51, .626-628, 1986.

DIERKES, J., KROESEN, M., PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B6 supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. ***International Journal of Vitamin Nutrition Research***, v. 68, p. 98-103, 1998.

DUCH, D.S.; BOWERS, S.W.; NICHOL, C.A. Analysis of folate cofactor levels in tissues using high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v.130, p.385-391, 1983.

FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VATHERISTO, L.; WITTHÖFT, C.; SOUTHON, S.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. ***Food Chemistry***, v.64, n.2, p.245-255, 1999.

HOLT, D.L.; WEHLING, R.L.; ZEECE, M.G. Determination of native folates in milk and other dairy products by high performance liquid chromatography. ***Journal of Chromatography A.***, v.449, p.271-279, 1988.

IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A.K. Determination of folate content in some Australian vegetables. ***Journal of Food Composition and Analysis***, v.16, p. 37-48, 2003.

JASTREBOVA, J.; WITTHÖFT, C.; GRAHN, A.; SVENSSON, U.; JÄGERSTAD, M. HPLC determination in raw and processed beetroots. ***Food Chemistry***, v.80, p. 579-588, 2003.

LANÇAS, F. M. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. 6ª ed. São Carlos, Ed. Rima, 2004, 62 p.

LIMA-PALLONE, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Química Nova** (no prelo), 2008.

LIN, B.F.; LIN, R.F. Effect of Chinese stir-fry cooking on folate contents of vegetables. **Journal of Chinese Agricultural and Chemical Society**, v.37, p.443-454, 1999.

MCKILLOP, D.J.; PENTIEVA, K.; DALY, D.; MCPARTLIN, J.M.; HUGHES, J.; STRAIN, J.J.; SCOTT, J.M.; MCNULTY, H. The effect of different cooking methods on folate retention in various food that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. **British Journal of Nutrition**, v.88, p. 681-688, 2002.

MULLIN, W.J.; WOOD, D.F.; HOWSAM, S.G. Some factors affecting folacin content of spinach, Swiss chard, broccoli and Brussels sprouts. **Nutrient Reports International**, v.26, p.7-16, 1982.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDE-WERNER, D.; LAHÉLY, S.; HASSELMANN, C. Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. **Journal of Chromatography A**, v.928, p.77-90, 2001.

OSSEYI, E. S.; WEHLING, R. L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, v.826, n.2, p.235-240, 1998.

PATRING, J.D.M.; JOHANSSON, M.S.; YAZYNINA, E.; JASTREBOVA, J.A. Evaluation of impact of different antioxidants on stability of dietary folates during food sample preparation and storage of extracts prior to analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.553, p.36-42, 2005.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Latin American food sources of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.49, n.1, 74S-84S, 1999.

SHRESTHA, A.K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**, v.71, p.545-552, 2000.

STEA, T.H.; JOHANSSON, M.; JÄGERSTAD, M.; FROLICH, W. Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. **Food Chemistry**, v.101, p. 1095-1107, 2006.

TAMURA, T.; MIZUNO, Y.; JOHNSTON, K.E.; JACOB, R.A. Food folate assay with protease, α -amilase and folate conjugase treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.135-139, 1997.

VAHTERISTO, L.; LEHIKONEN, K.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. **Food Chemistry**, v.59, n.4, p.589–597, 1997.

4.2. Artigo 2

FOLATOS EM HORTALIÇAS FOLHOSAS DURANTE DUAS ESTAÇÕES DO ANO E APÓS MÉTODOS DE COCÇÃO TRADICIONAIS

RESUMO

A concentração de folatos ingerido na dieta é influenciada pela concentração inicial existente nos alimentos e pode depender dos métodos e época de cultivo de hortaliças e frutas. Além disso, os métodos de cocção aos quais são submetidos os alimentos podem ter forte influência na concentração de folato ingerido. O calor, a presença de oxigênio, a umidade, a luz, o pH e a duração do tratamento térmico podem degradar as formas naturais dessa vitamina e dificultar a ingestão de folato em nível da recomendação nutricional. O objetivo do presente estudo foi comparar as concentrações de folatos entre duas estações do ano (inverno e primavera) e determinar o efeito de diferentes métodos de cocção tradicionais (refogamento em óleo, cocção a vapor e cocção sob imersão em água) sobre a retenção dessa vitamina em hortaliças rotineiramente consumidas pela população brasileira (couve, espinafre, mostarda, floretes e folhas de brócolis). A análise das isoformas de folatos (tetraidrofolato - THF, 5-metiltetraidrofolato – 5-MTHF e 5-formiltetraidrofolato – 5-FTHF) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando gradiente de eluição e fase móvel constituída de acetonitrila e solução tampão fosfato. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em relação à concentração de folatos entre as hortaliças coletadas no inverno e na primavera. A retenção dos isômeros nas hortaliças após cocção variou de 17,01% a 87,21% para THF, 53,41 a 94,07% para 5-MTHF e 39,04 a 107,9% para 5-FTHF. O refogamento em óleo não promoveu redução significativa da concentração de folatos em couve rasgada ou fatiada, mostarda e espinafre. A cocção sob imersão em água foi o método que menos preservou a concentração de 5-FTHF e THF (57,68% e 17,01% de retenção, respectivamente em floretes de brócolis). A cocção a vapor também não se mostrou eficiente na preservação de THF na mesma hortaliça (41,83% de retenção). Os resultados demonstraram que a retenção de folatos foi fortemente dependente da matriz alimentar, do tipo de isômero e do método utilizado para cocção das hortaliças. Todas as hortaliças estudadas podem ser consideradas excelentes fontes dessa vitamina, mas o atendimento às recomendações nutricionais de folato pode ser comprometido com as perdas ocorridas durante os processos de cocção. Reforça-se a recomendação de se promover maior controle em relação à escolha do método e tempo de cocção e

a quantidade de água utilizada, tanto na prática domiciliar quanto em serviços de alimentação.

Palavras-chave: técnicas de cocção, estabilidade, tetraidrofolato, 5-metiltetraidrofolato, 5-formiltetraidrofolato, épocas de cultivo.

ABSTRACT

The intake of folate in diet is influenced by the initial content in food and depends on the methods and seasons of vegetables and fruits growing. Furthermore, foods are submitted to methods of cooking that have strong influence on the content of folate intake. Warmth, presence of oxygen, humidity, light, pH and duration of heat treatment can degrade the natural forms of this vitamin and difficult the intake of folate in terms of nutritional recommendations. The aim of this study was to compare the levels of folate between two seasons (winter and spring) and determine the effect of different traditional cooking methods (stir frying, steam and cooking under immersion in water) on the retention of this vitamin in vegetables routinely consumed by Brazilian population (kale, spinach, mustard, flowers and leaves of broccoli). Analysis of isoforms of folate (tetrahydrofolate - THF, 5-methyl tetrahydrofolate - 5-MTHF and 5-formyl tetrahydrofolate - 5-FTHF) was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) using gradient elution and a mobile phase of acetonitrile and phosphate buffer. No statistically significant differences were found on the content of folate from vegetables collected in winter and spring. The retention of isomers in vegetables after cooking ranged from 17.01% to 87.21% for THF, 53.41 to 94.07% for 5-MTHF and from 39.04 to 107.9% for 5-FTHF. Stir frying did not promote reduction of folate content in ripped or sliced kale, mustard and spinach. Cooking under immersion in water was the method that least preserved 5-FTHF and THF (retention of 57.68% and 17.01%, respectively, in flowers of broccoli). Steam cooking also was not effective in the preservation of THF in the same vegetables (41.83% retention). Results showed that the retention of folate was strongly dependent on the food matrix, the type of isomer and the method used for cooking the vegetables. All vegetables studied can be considered excellent sources of this vitamin, but the achievement of folate nutritional recommendations may be compromised with the loss occurring during the process of cooking. We reinforce the recommendation to promote greater control about the choice of method and

time of cooking and the quantity of water used, both in home practice and in foodservice.

Key words: cooking methods, stability, tetrahydrofolate, 5-methyl tetrahydrofolate, 5-formil tetrahydrofolate, seasons of growing.

1. INTRODUÇÃO

Os folatos têm recebido grande atenção devido aos efeitos na saúde, especialmente na redução dos riscos de defeitos do tubo neural, na prevenção de doenças cardiovasculares e de certos tipos de cânceres (MCKILLOP et al., 2002).

Folatos de ocorrência natural são encontrados nos alimentos sob diversas formas, sendo os isômeros 5-metiltetraidrofolato (5-MTF), tetraidrofolato (THF) e 5-formiltetraidrofolato (5-FTHF) os mais comumente detectados em alimentos e em hortaliças folhosas (GREGORY, 1989).

A síntese de folatos é realizada apenas por microorganismos e plantas superiores, portanto, trata-se de um nutriente essencial para os mamíferos (MCNULTY, 1995). As hortaliças, são consideradas as principais fontes naturais de folatos na dieta humana (MULLIN et al., 1982).

As perdas de folatos podem ser causadas por fatores ambientais, tais como pH, oxigênio, antioxidantes, luz, ácidos, álcalis, concentrações de íons metálicos, duração e o método de cocção, quantidade de água utilizada, além das próprias características do alimento (HAWKES; VILLOTA, 1989). Perdas durante a cocção ocorrem principalmente por lixiviação, devido ao caráter hidrossolúvel dos folatos, e também por degradação térmica (EITENMILLER; LANDEN, 1999). Mullin et al. (1982) também acrescentam que outros fatores, tais como as condições ambientais (estação do ano, clima e condições geográficas e geológicas) podem afetar os níveis de folatos nas hortaliças.

Estima-se que aproximadamente 50% da concentração inicial de folatos nos alimentos sejam perdidos durante os processos culinários (MCKILLOP et al., 2002). Alguns resultados relataram que a cocção a vapor e a fritura podem conduzir a perdas da concentração inicial de até 90% (VARELA-MOREIRAS, 2000). Segundo a mesma autora, as hortaliças podem perder cerca de 70% de sua concentração de folatos ao serem fervidas durante 8 minutos, sendo a maior parte das perdas por dissolução na água de cocção.

Estudos específicos que avaliam o impacto dos diferentes métodos de cocção na concentração de folatos em alimentos preparados tanto em residências quanto em serviços de alimentação são escassos (MCKILLOP et al., 2002).

Entre todas as vitaminas, os folatos constituem um dos grupos de compostos menos estudados, tanto no que diz respeito à concentração em alimentos crus, quanto em relação à estabilidade durante a preparação. Particularmente no Brasil, a necessidade de pesquisas na área é imprescindível, uma vez que inexistem informações disponíveis sobre as concentrações de folatos em tabelas de composição de alimentos. De fato, a metodologia para análise de folatos em alimentos exige procedimentos complexos, além da necessidade de padrões pouco disponíveis no mercado em nível mundial.

Neste trabalho utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) na análise de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF) em hortaliças de elevado consumo no Brasil (couve, espinafre, mostarda, floretes de folhas de brócolis). Uma vez que a oferta dessas hortaliças ocorre praticamente durante todo o ano, a análise de folatos também foi realizada em estações distintas, considerando-se a escassez dessa informação na literatura. Além disso, comparamos os diferentes métodos de cocção de hortaliças rotineiramente utilizados no Brasil quanto à estabilidade de folatos. As quantidades de hortaliças usadas nas preparações simularam aquelas utilizadas no preparo em domicílios.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. 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). Utilizaram-se reagentes com grau de pureza para análise (p.a.): 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).

Para purificação dos extratos foi preparada uma coluna, com fase estacionária de Q-Sepharose (Pharmacia, EUA) em 20% de etanol 70%

utilizando seringa de plástico descartável como suporte, e fluxo estabelecido com bomba peristáltica (Pharmacia Biotech).

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

2.2. Padrões e curvas de calibração

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

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

A concentração real das soluções padrão foi verificada por espectrofotometria e corrigida de acordo com a seguinte equação:

$$A = E \times C \times L$$

Em que:

A = Absorvância máxima (lida a 297 nm para THF, a 290 nm para 5-MTHF e a 285 nm para 5-FTHF, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 2,0 (BALL, 1998);

E = Coeficiente de absorvidade molar (para THF, 27; para 5-MTHF, 32 e para 5-FTHF, 31,5 (BLAKELY, 1969);

C = Concentração molar;

L = Largura da cubeta (1 cm).

A construção das curvas de calibração dos isômeros de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF) foi realizada de acordo com a concentração dos componentes nas hortaliças. Para a curva de THF, utilizou-se injeção, em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções padrão entre 0,0095 e 0,3821 µg/mL; para 5-FTHF, utilizou-se injeção, em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções padrão entre 0,2432 e 9,7300 µg/mL e para 5-MTHF, utilizou-se injeção, em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções padrão entre 0,0490 e 0,9800 µg/mL.

2.3. Coleta e preparo das hortaliças

Foram utilizadas as seguintes hortaliças: couve (*Brassica oleracea L.*), mostarda (*Sinapsis arvensis*), espinafre (*Spinacia oleracea L.*) e brócolis (*Brassica oleracea var. itálica*) (floretes e folhas), obtidas do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), vinculado ao Ministério de Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS). Essas hortaliças foram escolhidas devido ao seu amplo consumo e disponibilidade na região e por serem consideradas importantes fontes de folato na alimentação (VARELA-MOREIRAS, 2000). Foram coletados cerca de 1 a 2 kg de cada hortaliça.

As hortaliças foram coletadas de forma aleatória, em estágio de comercialização, durante o inverno e primavera (agosto e outubro de 2008) e acondicionadas em sacos plásticos. As análises das hortaliças foram realizadas em, no máximo, 48 horas após a coleta. Foram realizadas quatro coletas em cada estação avaliada, sendo cada repetição caracterizada por uma coleta semanal.

No laboratório, as partes não comestíveis (talos e folhas danificadas) foram removidas, as hortaliças foram lavadas em água corrente, sendo o excesso removido com auxílio de papel toalha e preparadas como descrito abaixo.

Foi realizado o quarteamento das folhas de couve e mostarda, de modo que as porções dispostas em diagonal foram agrupadas, sendo uma das partes analisada crua e outra analisada após fatiamento manual utilizando faca (tiras com espessura de aproximadamente 0,5 cm) (couve fatiada e mostarda). A couve também foi analisada sob a forma rasgada manualmente. Após o pré-preparo, as hortaliças foram refogadas em óleo. Para cada 100 g de hortaliça, foram utilizados 8 mL de óleo de soja (1 colher de sopa), sendo o tempo de cocção igual a 2 minutos.

As folhas de brócolis e espinafre foram divididas em duas partes, sendo uma delas analisada crua e a outra, analisada após refogar em óleo. Para cada 100 g de hortaliça, foram utilizados 8 mL de óleo de soja, sendo o tempo de cocção igual a 2 minutos.

Os floretes de brócolis foram divididas em três partes, sendo uma delas analisada crua, a outra analisada após cocção a vapor, em panela doméstica, por 6 minutos e a terceira parte após cocção sob imersão em água em

ebulição, também por 6 minutos (quantidade de água suficiente para cobrir a hortaliça: 100 g de hortaliça para cada 1000 mL (LIMA-PALLONE et al., 2008a).

As quantidades de hortaliças utilizadas para cocção simularam aquelas utilizadas na preparação em domicílios.

Logo após a cocção, todas as hortaliças foram processadas em multiprocessador para completa homogeneização, sendo acondicionadas em geladeira doméstica até o momento da análise.

Para avaliar a estabilidade, a porcentagem de retenção da concentração de folatos nas hortaliças após os diferentes métodos de cocção foi obtida levando-se em consideração as modificações de peso sofridas durante o processo. Para tanto, foi utilizada a fórmula da retenção verdadeira ou real (% RR) (MURPHY; CRINER; GRAY, 1975), como descrito abaixo:

$$\% \text{ RR} = \frac{\text{Fcoz} (\mu\text{g}) \times \text{Hcoz} (\text{g})}{\text{Fc} (\mu\text{g}) \times \text{Hc} (\text{g})} \times 100$$

Em que:

Fcoz = concentração de folato na hortaliça cozida

Fc = concentração de folato na hortaliça crua

Hcoz = quantidade de hortaliça cozida

Hc = quantidade de hortaliça crua

2.4. Obtenção dos extratos e análise de folatos

Todas as etapas utilizadas para obtenção dos extratos e para análise dos folatos nas hortaliças foram efetuadas utilizando metodologia otimizada em nosso laboratório (DELLA LUCIA et al., 2009).

Durante as etapas de extração e análise as hortaliças e os extratos foram mantidas 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 da utilização de tampas e de ambiente com gás nitrogênio nas vidrarias.

2.4.1. Extração de folatos

A extração foi baseada em metodologia utilizada por Vahteristo et al. (1997), Jastrebova et al. (2003) e Stea et al. (2006). Para a extração foram pesados em balança digital semi-analítica cerca de 3,00 g (o peso exato foi

anotado) de cada hortaliça, previamente homogeneizada em processador de alimentos. 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 para 25 mL e o extrato obtido foi aquecido por aproximadamente 12 minutos em banho-maria a 100 °C, sob agitação. Em seguida, foi resfriado, centrifugado (1789 g, por 30 minutos) e, em seguida, utilizado para desconjugação de poliglutamatos.

Para desconjugação dos poliglutamatos a monoglutamatos, 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. Os extratos foram colocados em banho-maria a 37°C por 3 horas. Em seguida, para ocorrer inativação enzimática, os extratos foram aquecidos em água fervente por 5 minutos (JASTREBOVA et al., 2003).

2.4. Purificação do extrato de hortaliça

A purificação do extrato foi feita com base em procedimento descrito por Jastrebova et al. (2003). O extrato obtido no procedimento anterior foi purificado utilizando coluna de forte troca iônica, com fase estacionária de Q-Sepharose, preparada em nosso laboratório. A coluna foi pré-condicionada com metanol e água (1:1) a um fluxo de 1-2 gotas/segundo (usando bomba peristáltica). Em seguida, o extrato foi aplicado à coluna a um fluxo de 2 gotas/segundo, aproximadamente. A coluna foi lavada com água ultrapura para remoção dos componentes interferentes (fluxo de 1-2 gotas/segundo). 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 análise cromatográfica, o extrato foi filtrado através de membranas filtrantes com porosidade de 0,45 µm.

2.5. Análise de folatos por CLAE

O sistema de CLAE (Shimadzu, modelo SCL 10AD VP) empregado na análise de folatos foi composto de bomba de alta pressão (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, 150 mm x 4,6 mm, 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 0,7 mL/min; volume injetado, 50 µL, detecção por fluorescência com excitação a 290 nm e emissão a 360 nm. O gradiente iniciou-se com acetonitrila 6% (v/v), aumentando linearmente para 25% em 25 minutos, sendo essa concentração mantida por 2 minutos, retornando em seguida às condições iniciais. A coluna foi re-equilibrada por 15 minutos antes da próxima corrida. O tempo total de corrida foi de 43 minutos.

Para evitar a formação de bolhas e controlar a variação da pressão, utilizou-se um sistema de degasamento da fase móvel com gás hélio antes e durante as corridas cromatográficas. Assim, a fase móvel foi degaseificada por 15 minutos 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 de hortaliças 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 co-cromatografia.

A quantificação dos isômeros de folatos nas hortaliças foi feita a partir das curvas de calibração e equações de regressão obtidas (THF: $Y = 1178396061 x + 158374,83$; $R^2 = 0,99$; 5-MTHF: $Y = 1634094176 x - 262055,40$; $R^2 = 0,99$; 5-FTHF: $Y = 119560115,8 x - 1041248,88$; $R^2 = 0,98$). O cálculo da concentração real nas hortaliças foi obtido a partir das diluições realizadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise qualitativa

As condições cromatográficas utilizadas permitiram boa resolução dos picos de folatos (THF, 5-MTHF e 5-FTHF), o que permitiu a quantificação nas hortaliças de forma segura (Figura 1). Todos os isômeros foram identificados nas hortaliças estudadas, sendo os tempos de retenção de aproximadamente 11; 14,5 e 20 minutos para THF, 5-MTHF e 5-FTHF, respectivamente.

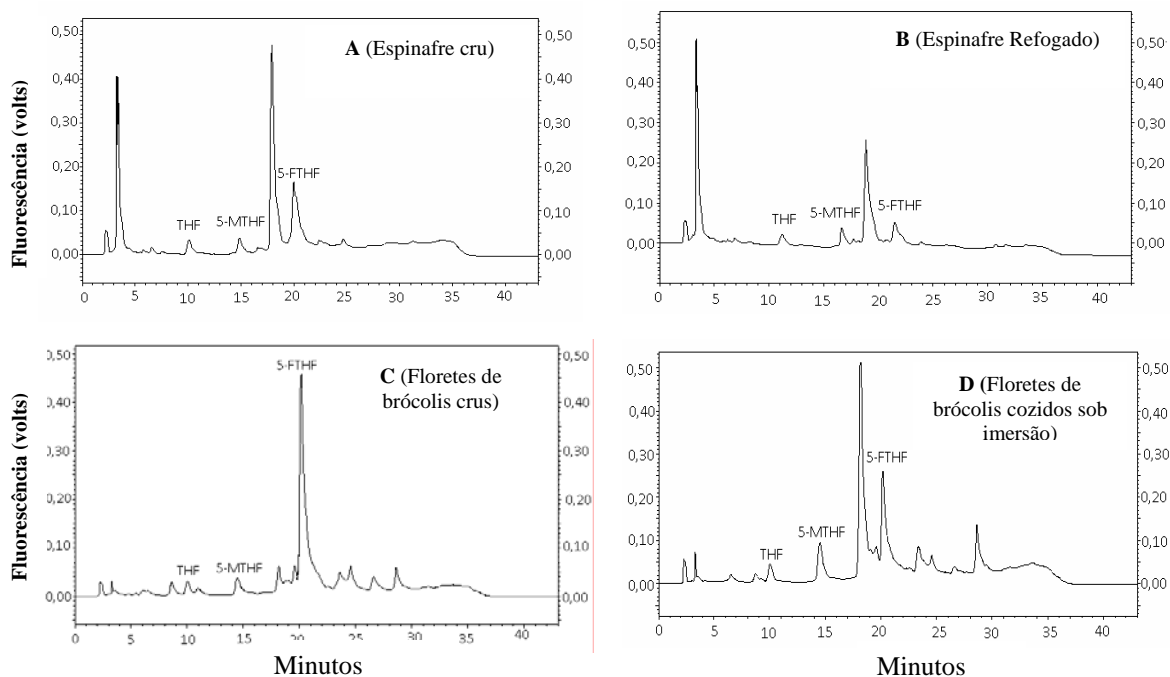


Figura 1. Cromatogramas típicos de folatos em hortaliças cruas e cozidas. Condições cromatográficas descritas em métodos (2.5).

3.2. Concentração de folatos nas hortaliças

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em relação à concentração de folatos entre as hortaliças coletadas no inverno ou na primavera (dados não mostrados). Esse resultado pode ser explicado pela coleta das hortaliças em duas épocas do ano relativamente próximas entre si, sem grandes variações sazonais. Na região da cidade de Viçosa, MG, o clima enquadra-se na classificação Cwa (C: clima temperado; w: chuvas de verão; a: verão quente), de acordo com a classificação climática de Köppen, com temperatura do mês mais frio inferior a 18°C e do mês mais quente superior a 22°C e com precipitação média anual de 1203 mm (CHAGAS et al., 2008). Assim, não há grandes diferenças climáticas entre as duas estações do ano estudadas. Dessa forma, nota-se que estações próximas entre si (inverno e primavera) não são marcadamente diferentes, assim como as estações “intermediárias” (primavera e outono), ou seja, basicamente apenas duas estações no ano apresentam diferenças climáticas mais marcantes (verão, quente e úmido; e inverno, frio e seco) (CAMPOS et al., 2006).

No ano de 2008, as temperaturas médias do município de Viçosa nos meses de agosto e outubro não mostraram grande variação (agosto: média das mínimas de $12,7^{\circ}\text{C}$ e média das máximas de $26,6^{\circ}$; outubro: média das

mínimas de 17,1°C e média das máximas de 27,9°C). O fato de não terem sido encontradas diferenças significativas pode ser considerado um achado positivo, significando que os habitantes de um país tropical como o Brasil podem estar consumindo quantidades similares de folato ao longo das estações estudadas. Além disso, sugere-se que as hortaliças analisadas podem ser consideradas fontes alimentares cuja concentração de folatos não sofreria oscilações no referido período.

Como este se trata de um estudo preliminar, a realização de outros trabalhos que permitam a coleta de hortaliças ao longo de todo o ano (incluindo as quatro estações), seria útil para avaliar possíveis diferenças sazonais quanto à concentração de folatos em hortaliças.

Em estudo sobre a análise da concentração de folatos em espinafre, verificou-se que a concentração de 5-MTHF em espinafre variou de 225,8 a 527,3 µg/100 g no período de setembro a novembro e de 386,0 a 550,4 µg/100 g no período de maio a julho, enquanto as concentrações de 5-FTHF ficaram entre 4,6 e 7,8 µg/100 g e 4,0 e 6,3 µg/100 g nos mesmos períodos avaliados (LIMA-PALLONE et al., 2008b). A análise estatística dos dados mostrou não haver diferença significativa entre os valores obtidos nas distintas épocas do ano avaliadas, assim como o verificado no presente estudo.

Em outro trabalho que relacionou as concentrações de folatos às épocas de cultivo, encontrou-se concentração de 5-MTHF variando de 16 a 26 µg/100 g e de THF variando de 1 a 4 µg/100 g em batata. O repolho branco não mostrou variação quanto à concentração de 5-MTHF, que foi igual a 27 µg/100 g nas três épocas do ano, enquanto o THF variou de 2 a 5 µg/100 g. Nenhuma dessas hortaliças apresentou quantidades expressivas de 5-FTHF (VAHTERISTO et al., 1997).

A Tabela 1 mostra os dados da concentração de folatos em hortaliças cruas e após serem submetidas a diferentes métodos de cocção.

A concentração de folatos totais variou de 154,79 µg/100 g em espinafre cru (menor valor) a 798,14 µg/100 g em folhas de brócolis refogadas (maior valor).

Tabela 1. Concentração de folatos (isômeros e soma de folatos) em hortaliças cruas e submetidas à cocção (em µg/100 g de matéria fresca).

Hortaliças	THF	5-MTHF	5-FTHF	Folatos (Soma)	Retenção de folatos totais (%)
Couve crua	72,91 ± 46,05	67,02 ± 41,63	409,79 ± 379,39	549,71 ± 267,89	--
Couve fatiada refogada	56,22 ± 30,12	56,84 ± 30,00	347,16 ± 285,00	460,22 ± 211,99	77,97
Couve rasgada refogada	53,63 ± 22,93	56,22 ± 30,93	300,56 ± 260,41	410,41 ± 187,30	72,30
Floretes de brócolis crus	69,46 ± 57,67	123,12 ± 91,29	562,01 ± 415,20	754,59 ± 326,82	--
Floretes de brócolis cozidos a vapor	26,40 ± 18,37***	102,19 ± 87,60	354,55 ± 96,67	483,14 ± 257,77	70,46
Floretes de brócolis cozidos sob imersão	10,83 ± 5,07***	87,99 ± 65,53	297,29 ± 138,25***	396,11 ± 219,19****	57,24
Folhas de brócolis cruas	60,71 ± 32,42	219,40 ± 87,47	451,40 ± 264,12	731,51 ± 306,76	--
Folhas de brócolis refogadas	56,61 ± 35,63	226,31 ± 68,80	520,82 ± 391,18	803,74 ± 356,23	102,03
Espinafre cru	24,57 ± 21,89	42,72 ± 26,59	173,77 ± 73,22	241,06 ± 81,29	--
Espinafre refogado	13,25 ± 12,97	27,11 ± 15,92	114,43 ± 69,49	154,79 ± 60,76	54,04
Mostarda crua	71,67 ± 60,85	164,93 ± 32,41	327,78 ± 289,94	564,38 ± 234,22	--
Mostarda refogada	44,13 ± 38,40	112,67 ± 30,10	129,84 ± 65,91	286,64 ± 91,39	53,20

Média de oito repetições ± desvio-padrão

% de Retenção = colocar aqui a fórmula para cálculo.

Valores médios foram significativamente diferentes das hortaliças cruas (teste t pareado: ***P<0,005; ****P<0,001)

Embora não tenham sido encontrados na literatura estudos que avaliaram a concentração de folatos em folhas de brócolis, verifica-se que essa hortaliça, geralmente descartada durante as etapas de pré-preparo, contribui com concentrações expressivas dessa vitamina, de modo que seu consumo sob a forma de sopas, suflês e saladas deve ser estimulado.

Muitos trabalhos relatam a concentração de vitaminas em couve, entretanto, não foram encontrados estudos a respeito das concentrações de folatos nessa hortaliça, indicando o pioneirismo dessa pesquisa.

Stea et al. (2006) encontraram concentração de folatos totais em floretes de brócolis semelhante ao encontrado no presente estudo. Os autores detectaram concentração igual a 866 µg/100g, mas esse valor normalmente é superior àqueles verificados em outros trabalhos, como o de Lima-Pallone (2008a), Vahteristo et al. (1997), DeSouza e Eitenmiller (1986) e Mullin et al. (1982), em que foi observada concentração dessa vitamina de 427,8 µg/100g, 114 µg/100g, 102 µg/100g e 133 µg/100g, respectivamente.

Em espinafre, as concentrações de folatos totais encontrados estão de acordo com a literatura pesquisada. Iwatani et al. (2003) relataram concentração de folatos nessa hortaliça iguais a 302 µg/100g. Lin e Lin (1999), DeSouza e Eitenmiller (1986), Shrestha et al. (2000) e Aiso e Tamura (1998) reportaram concentrações de folatos iguais a 364 µg/100g, 251 µg/100g, 193 µg/100g e 224 µg/100g, respectivamente, utilizando metodologia semelhante à do presente estudo. Em estudo conduzido por Pandrangji; Laborde (2004), o espinafre apresentou concentração de folatos totais variando de 84 a 225 µg/100g, com média de 160 ± 42 µg/100g.

O único estudo encontrado a respeito da concentração de folatos em mostarda foi o de Iwatani et al. (2003), no qual os autores detectaram concentração dessa vitamina igual a 278 µg/100g, inferior ao verificado nesse trabalho.

Ao se analisar a Tabela do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2009), percebe-se que, de modo geral, as concentrações de folatos encontrados em nosso estudo foram superiores, com exceção da couve, que mostrou concentrações menores. De acordo com essa tabela, as concentrações de folatos totais para floretes de brócolis, couve, espinafre e mostarda (avaliados pelo método microbiológico) foram, respectivamente, 160 µg/100 g, 764 µg/100 g, 52 µg/100 g e 137 µg/100 g.

A variação nas concentrações de folatos encontrada no presente trabalho em relação a outros estudos pode ser explicada por fatores que levariam à maior ou menor síntese dessa vitamina em hortaliças. Nas frutas e hortaliças, os isômeros de folatos e a sua distribuição nas diferentes porções são afetadas pela luz, já que a síntese da vitamina ocorre na fotorrespiração (LIMA-PALLONE et al., 2008a). O grau de maturação também se mostra importante, já que os folatos participam do processo de divisão celular e sua quantidade é maior nos tecidos em divisão do que nos tecidos já maduros (SCOTT et al., 2000). Minerais como potássio e magnésio também são bastante importantes na produção de folatos pelas frutas e hortaliças, participando de uma das etapas da biossíntese dessa vitamina (VAHTERISTO et al., 1997).

Vale ressaltar que as diferentes metodologias de extração e análise também levam a variações importantes quanto à concentração de folatos. O método oficial, baseado em ensaio microbiológico, quantifica a concentração de folatos totais presente nas amostras, enquanto técnicas bioespecíficas e a CLAE são capazes de determinar os isômeros mais comumente presentes, os quais desempenham papéis diferentes no metabolismo (PATRING, 2005).

Observou-se que a cocção sob imersão em água em ebulição foi o método que menos preservou a concentração de 5-FTHF e de THF em floretes de brócolis (ver Tabela 1). A cocção a vapor também não foi eficiente na preservação de THF nestas hortaliças. O método refogar em óleo não promoveu redução significativa da concentração de folatos nas hortaliças estudadas. Vale ressaltar que para esse método o tempo de cocção foi curto (2 minutos), enquanto as formas de cocção a vapor e sob imersão em água utilizaram tempos mais longos (cerca de 6 minutos para ambos os métodos). Além disso, o folato, por ser uma vitamina hidrossolúvel, é mais facilmente perdido na água de cocção. Nenhum dos métodos avaliados promoveu redução significativa ($p > 0,05$) da concentração de 5-MTHF.

Para determinar se uma maior superfície de exposição ao oxigênio seria capaz de promover perdas significativas de folatos em couve, as formas fatiada e rasgada foram analisadas. Sabe-se que a maior área de superfície e a forma geométrica em que a hortaliça é cortada podem afetar as perdas de folatos (MALIN, 1977). Entretanto, no presente trabalho, não foi encontrado efeito do tipo de corte sobre a retenção de folatos em couve.

Nosso estudo mostrou que as folhas de brócolis apresentaram concentração dos isômeros de folatos similar àqueles encontrados em floretes de brócolis (parte normalmente utilizada para consumo). Ao serem preparadas sob a forma refogada, assim como as demais hortaliças analisadas sob as mesmas condições, as folhas de brócolis não apresentaram redução significativa de folatos.

Em estudo sobre a retenção de folatos em alimentos consumidos rotineiramente pela população do Reino Unido (MCKILLOP et al. 2002), foram encontradas concentrações de folatos totais (avaliados pelo método microbiológico) em espinafre cru variando de 189,5 µg/100 g a 191,8 µg/100 g e em floretes de brócolis crus variando de 172 µg/100 g a 177 µg/100 g. Após cocção em água, a concentração dessa vitamina foi significativamente reduzido para 94,4 µg/100 g e para 102,8 µg/100 g em espinafre e brócolis, respectivamente. As perdas foram explicadas pela escolha do método de cocção, uma vez que os folatos podem ter sido perdidos por lixiviação. Por outro lado, os floretes de brócolis cozidos a vapor não apresentaram perdas significativas de folatos totais. No presente estudo, as perdas foram observadas em ambos os métodos, tanto na cocção sob imersão em água quanto na cocção a vapor.

Em estudo sobre a influência do cozimento em espinafre (LIMA-PALLONE et al. 2008b), foi encontrada redução na concentração de 5-MTHF de 552,0 µg/100 g para 127,1 µg/100 g, diferente do que foi encontrado no presente trabalho, em que as concentrações de 5-MTHF em todas as hortaliças analisadas permaneceram estáveis após a cocção. Ainda em relação ao estudo desenvolvido por esses autores, foi verificada redução de 5-FTHF, de 7,8 µg/100 g para 1,6 µg/100 g, após cocção em água. Os autores não detectaram a presença de THF na hortaliça estudada. Observa-se que, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, as concentrações de 5-FTHF foram inferiores aos detectados na presente pesquisa.

Outros autores também encontraram perdas consideráveis de folatos em espinafre após a cocção em água. De Souza e Eitenmiller (1986) observaram perdas de 83% na concentração de folatos totais, enquanto Puupponen-Pimia et al. (2003) relataram perdas de 70% na concentração dessa vitamina. Embora a técnica de cocção a vapor não tenha sido analisada por esses autores, os mesmos sugerem que esse método de cocção tem maior

capacidade de retenção de folatos quando comparada à cocção sob imersão em água, corroborando os resultados do presente estudo, cuja retenção de 5-FTHF foi superior no primeiro método de cocção.

McKillop et al. (2002) verificaram que a retenção de folatos em espinafre após a cocção em água foi de 49%, sendo que as concentrações variaram de 191,8 a 94,4 µg/100g na hortaliça *in natura* e após a cocção, respectivamente. De forma semelhante, a retenção de folatos em brócolis foi de 44% (177,1 e 77µg/100g, *in natura* e após a cocção, respectivamente). A cocção a vapor para essas duas hortaliças não ocasionou em perdas estatisticamente significativas de folatos, resultando em retenção significativamente maior em ambas as hortaliças quando comparada à cocção em água. Em nosso estudo, a cocção a vapor foi capaz de preservar a concentração de 5-MTHF e 5-FTHF em floretes de brócolis, mas não se mostrou eficaz na preservação de THF.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre as perdas de folatos após a cocção de couve, folhas de brócolis e mostarda, o que mostra a importância e contribuição dos dados obtidos no presente estudo.

Estudo sobre a retenção de folatos em hortaliças, conduzido por Hoppner e Lampi (1993), indicou baixa retenção dessa vitamina durante a cocção, possivelmente devido à lixiviação. Batatas fatiadas, congeladas e fritas apresentaram metade da concentração de folato das batatas cruas (dados em base seca). Cenoura fatiada perdeu aproximadamente 40% de sua concentração de folato durante a cocção úmida. Embora as hortaliças analisadas por esses autores não sejam as mesmas do presente estudo, os dados sugerem a preocupação com a retenção de folatos após diferentes métodos de cocção.

Outro trabalho revelou perdas importantes de folato em batata após as condições manipulação em Serviços de Alimentação. A maior retenção ocorreu com o método *sous-vide* (103%), seguido pela cocção úmida (72-59%) e, por fim, pela cocção com calor seco (63%) (STEA et al, 2006). No presente estudo, a cocção úmida (sob imersão em água) não se mostrou eficaz na preservação de folatos nas hortaliças.

Os altos valores de desvio-padrão observados neste estudo (Tabela 1) são comuns em trabalhos que envolvem análise de vitaminas em matrizes alimentares. Como existe grande variabilidade biológica entre esses alimentos, é esperado que haja ampla faixa de variação entre os dados, mesmo que o

pesquisador tente reduzir a heterogeneidade amostral, coletando amostras da mesma variedade, mesmo local de cultivo, no mesmo estágio de maturação, em pontos de coleta aleatórios e homogeneizando completamente a hortaliça antes do procedimento de extração.

O percentual de retenção de cada isoforma de folatos após diferentes métodos de cocção das hortaliças está demonstrado na Figura 2.

A retenção dos isômeros nas hortaliças após cocção variou de 17,01% a 87,21% para THF, 53,41 a 94,07% para 5-MTHF e 39,04 a 107,9% para 5-FTHF. O THF mostrou-se como o isômero menos estável, enquanto o 5-MTHF foi considerado o mais estável aos processos de cocção.

Verifica-se que o menor percentual de retenção ocorreu em floretes de brócolis cozidos sob imersão, os quais só preservaram cerca de 17% da concentração de THF após a cocção. Aparentemente, houve redução importante do percentual de retenção de folatos, mesmo naquelas hortaliças que não mostraram diferenças estatisticamente significativas após serem cozidas. Por exemplo, a couve fatiada apresentou percentuais de retenção iguais a 71,81%; 79,01% e 79,4% de THF, 5-MTHF e 5-FTHF após ser refogada em óleo, enquanto a mostarda refogada apresentou retenção da ordem de 64,35% para THF; 66,23% para 5-MTHF e 39,04% para 5-FTHF.

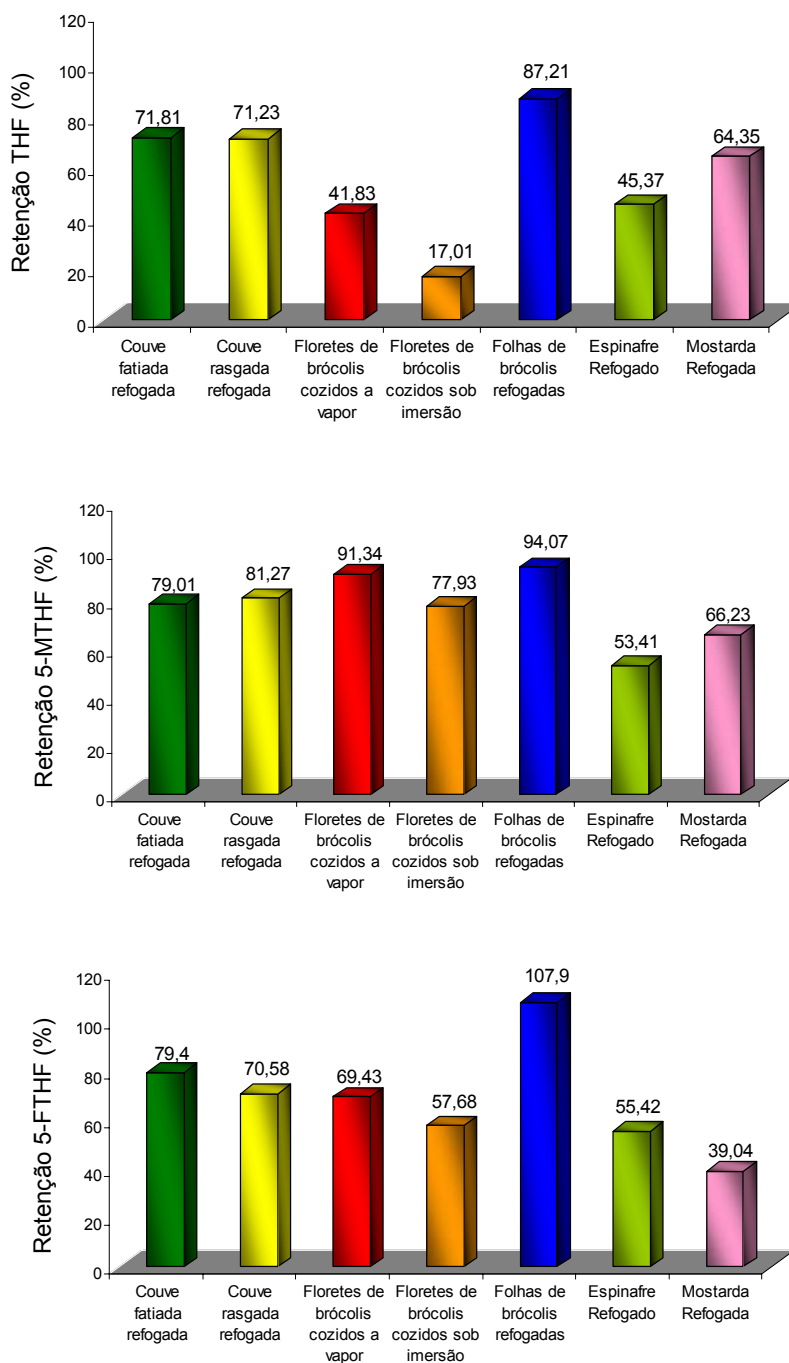


Figura 2. Retenção dos isômeros de folatos em hortaliças submetidas à cocção.

Em trabalho realizado por Lima-Pallone (2008a), somente os isômeros 5-MTHF e 5-FTHF foram encontrados em floretes de brócolis. A perda desses isômeros após a cocção em água foi de aproximadamente 68%, sendo que 53% da concentração perdida foram encontrados na água de cocção, o que sugere que as perdas foram ocasionadas principalmente por lixiviação. Em contrapartida, Stea et al. (2006) observaram menores perdas de folatos em

brócolis após a cocção em água, sendo estas de aproximadamente 24,5%. Nosso estudo apontou perdas intermediárias de 5-FTHF em relação aos dois trabalhos citados anteriormente após cocção de floretes de brócolis em água em água (retenção de 57,68%).

Outro estudo detectou perdas de folatos por lixiviação em espinafre após a cocção em água de aproximadamente 74% para o 5-MTHF e 56% para o 5-FTHF (LIMA-PALLONE et al., 2008b). Aproximadamente 58% da concentração de 5-MTHF e cerca de 39% de 5-FTHF migraram para a água de cocção. Os autores relatam que 20% dos folatos totais provavelmente foram degradados durante o processamento caseiro (lavagem, fatiamento e perdas pelo calor). Em nosso trabalho, o espinafre não foi analisado sob a forma cozida em água, mas refogado, apresentando menores perdas dos isômeros de folatos.

Diferenças na retenção de folatos em diversas hortaliças submetidas à cocção em água foram observadas por Holasová et al. (2008). A maior retenção foi encontrada em couve-de-bruxellas, couve-flor e brócolis. Depois de 8 minutos de cozimento, mais de 75% da concentração inicial de 5-MTHF permaneceu nessas hortaliças. Valores menores de retenção desse isômero foram encontrados em espinafre, repolho e cenoura, variando entre 37 e 52% de sua concentração inicial. Nosso trabalho também mostrou preservação de 5-MTHF, entretanto esse resultado foi semelhante para todas as hortaliças estudadas, diferentemente do trabalho desses autores.

Segundo alguns autores, outros métodos de cocção, não avaliados nesse estudo, também promovem boa retenção (aproximadamente 80%) de folatos em hortaliças, tais como a cocção sob pressão e em forno de microondas (DANG et al., 2000; CHEN et al. 1983).

A forte relação entre as perdas de folato e a duração da cocção pode em parte explicar as perdas vitamínicas encontradas nesse estudo e em trabalhos de outros autores. Por exemplo, Leichter et al. (1978) encontraram perdas de até 78% de folatos em espinafre depois de 10 minutos de cocção em água, enquanto que McKillop et al. (2002) relataram 51% de perdas de folatos depois de 3 minutos de cocção em água. No presente trabalho, o espinafre não foi analisado sob a forma cozida em água, entretanto, em floretes de brócolis cozidos sob imersão, foram verificadas perdas significativas. Isso pode ser pelo fato da hortaliça ter permanecido por cerca de 6 minutos em contato com a

água, em comparação aos 2 minutos em que as hortaliças refogadas ficaram em contato com o óleo.

A solubilidade dos folatos em água é uma característica que influencia de maneira considerável sua perda, principalmente por lixiviação, quando ocorre contato direto do vegetal com a água em ebulição (LIMA-PALLONE et al., 2008b). Mesmo que, nesse estudo, as hortaliças tenham apresentado alta concentração de folatos, as perdas ocorridas durante o processo de cocção em água devem ser consideradas em inquéritos de consumo alimentar.

3.3. Atendimento às recomendações de folatos

Em 1992, o *U.S. Public Health Service* estabeleceu uma recomendação de que todas as mulheres em idade fértil devem consumir 400 µg de ácido fólico/dia, para reduzir o risco de desenvolvimento de doenças do tubo neural durante a gravidez (CHOUMENKOVITCH et al., 2002; MARTINEZ et al., 2005), enquanto a recomendação para gestantes foi definida em 600 µg de ácido fólico/dia. Em 1998, a *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu que todos os produtos derivados de cereais deveriam ser enriquecidos com ácido fólico na proporção de 140 µg/100g do produto (CHOUMENKOVITCH et al., 2002). No Brasil, a RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, prevê a adição de 150 µg de ácido fólico por 100g de farinha de trigo e de milho, desde que a adição dessa vitamina não cause interferências no produto, com modificação de cor e sabor.

Nos últimos anos, o consumo de hortaliças tem diminuído entre os brasileiros. Segundo dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo total de hortaliças no Brasil durante o período de 1995 a 1996 foi de aproximadamente 34,42 kg per capita/ano (94,04 g/pessoa/dia). Comparando com os dados obtidos no período de 2002 a 2003, observa-se que houve redução no consumo, passando este a ser de aproximadamente 29,00 kg per capita/ano (79,24 g/pessoa/dia), sendo que para hortaliças folhosas o consumo foi de 2,5 kg per capita/ano (6,83 g/pessoa/dia). Esses dados demonstram que o consumo de hortaliças encontra-se muito aquém da recomendação diária que, de acordo com a Pirâmide Alimentar Adaptada à População Brasileira (PHILIPPI et al., 1999), deveria ser de 4 a 5 porções, o equivalente a 300 g/dia em uma dieta de 2200 kcal/dia.

Avaliando o percentual de adequação da ingestão de folatos nas hortaliças estudadas (Tabela 2), pode-se verificar que a ingestão de uma porção média de 70 g de três das hortaliças estudadas (floretes de brócolis crus, folhas de brócolis cruas e refogadas) é capaz de atingir mais de 100% das recomendações de folatos para mulheres em idade fértil, enquanto a ingestão de 2 porções (140 g) de todas as hortaliças, com exceção do espinafre cru e refogado, já atinge tais recomendações.

Ressalta-se, entretanto, que o consumo de floretes e folhas de brócolis crus é bastante incomum em nosso meio, devendo ser estimulado. Embora as hortaliças estudadas possam ser consideradas excelentes fontes dessa vitamina, o atendimento às recomendações nutricionais de folato pode ser comprometido com as perdas ocorridas durante os processos de cocção.

Por outro lado, o procedimento de cocção é comprovadamente capaz de aumentar a biodisponibilidade de nutrientes entre eles, as vitaminas. Assim, mesmo que perdas possam ser detectadas, o aproveitamento desses compostos pelo organismo é aumentado, melhorando seu aproveitamento. Dessa forma, a cocção não deve ser evitada, mas recomenda-se maior controle em relação à escolha do método e ao tempo de cocção das hortaliças, visando à maior preservação vitamínica.

Os resultados desse estudo demonstram a grande contribuição do adequado consumo de alimentos fontes de folatos ao atendimento às recomendações dessa vitamina, especialmente levando-se em consideração grupos populacionais vulneráveis, como é o caso de mulheres em idade fértil e gestantes.

Tabela 2. Adequação da ingestão de folatos por hortaliças para mulheres em idade fértil e gestantes.

Hortaliça	Soma de Folatos		Adequação da Ingestão de folatos (%)	
	1 porção de hortaliça (70 g)	2 porções de hortaliça (140 g)	Mulheres em idade fértil * 1 porção - 2 porções	Gestantes** 1 porção - 2 porções
Couve crua	384,80	769,60	96,20 – 192,40	64,13 – 128,26
Couve fatiada refogada	322,15	644,3	80,54 – 161,08	53,69 – 107,38
Couve rasgada refogada	287,29	574,58	71,82 – 143,64	47,88 – 95,76
Floretes de brócolis crus	528,21	1056,42	132,05 – 264,10	88,03 – 176,06
Floretes de brócolis cozidos a vapor	338,20	676,40	84,55 – 169,10	56,37 – 112,74
Floretes de brócolis cozidos sob imersão	277,28	554,56	69,32 – 138,64	46,21 – 92,42
Folhas de brócolis cruas	512,06	1024,12	128,01 – 256,02	85,34 – 170,68
Folhas de brócolis refogadas	562,62	1125,24	140,65 – 281,30	93,77 – 187,54
Espinafre cru	168,74	337,48	42,18 – 84,36	28,12 – 56,24
Espinafre refogado	108,35	216,70	27,08 – 54,16	18,06 – 36,12
Mostarda crua	395,07	790,14	98,77 – 197,54	65,84 – 131,68
Mostarda refogada	200,65	401,30	50,16 – 100,32	33,44 – 66,88

* *Recommended Dietary Allowances* (RDA): 400 µg/dia (IOM, 2004)

** *Recommended Dietary Allowances* (RDA): 600 µg/dia (IOM, 2004)

4. CONCLUSÕES

Não foram detectadas diferenças significativas quanto à concentração de folatos entre as duas estações do ano avaliadas (inverno e primavera) para nenhuma das hortaliças

As hortaliças estudadas demonstraram ser excelentes fontes de folato na alimentação, atingindo grande parte das recomendações dessa vitamina para mulheres em idade fértil, grupo vulnerável à deficiência de folatos.

A retenção de folatos nas hortaliças folhosas mostrou-se fortemente dependente de cada hortaliça, do método de cocção e da forma isomérica. O método de cocção por refogamento em óleo preservou a concentração dessa vitamina nas hortaliças, enquanto a cocção sob imersão em água foi o método que causou as maiores perdas de THF e 5-FTHF.

Como as análises foram conduzidas em escala laboratorial, simulando a preparação doméstica, torna-se necessária a realização de mais estudos que avaliem as perdas de folatos após as etapas de manipulação e preparo em serviços de larga escala, como as Unidades de Alimentação e Nutrição, aumentando as informações a respeito da qualidade nutricional de hortaliças rotineiramente consumidas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e à FAPEMIG pela bolsa de iniciação científica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISO, K.; TAMURA, T. Trienzyme treatment for food folate analysis: Optimal pH and incubation time for α -amilase and protease treatment. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.44, p.361-370, 1998.

BALL, G.F.M. Folate. In: BALL, G.F.M. **Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods**. 1ª Edition. Ed. Chapman & Hall, London, UK. 1998, p. 439 - 487.

BLAKELY, R.L. The biochemistry of folic acid and related pteridines. In: NEUBERGER A.; TATUM, E.L. **Frontiers of Biology**. Amsterdam: North Holland Publishing Company, p. 92-94, 1969.

BRASIL. Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento Técnico para a Fortificação de Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico**. Diário Oficial da União, 14 de dezembro de 2002.

CAMPOS, F.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; SOUZA, P.M.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J.B.P. Pró-vitaminas A em hortaliças comercializadas no mercado formal e informal de Viçosa (MG), em três estações do ano. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.33-40, 2006.

CHAGAS, C.S.; VIEIRA, C.A.O.; FILHO, E.I.F.; JUNIOR, W.C. Comparação entre imagens Áster e Landstat 7 na classificação de níveis de degradação de pastagens utilizando redes neurais artificiais. **Revista Brasileira de Cartografia**, n.60, p. 243-252, 2008.

CHEN, T.S.; SONG, Y.O.; KIRSCH, A.J. Effects of blanching, freezing and storage on folacin contents of spinach. **Nutrition Reports International**, v.28, p.317-321, 1983.

CHOUMENKOVITCH, S.F.; SELHUB, J.; WILSON, P.W.F.; RADER, J.I.; ROSEMBERG, I.H.; JACQUES, P.F. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. **Journal of Nutrition**, v.132, p.2792-2798, 2002.

DANG, J.; ARCOT, J.; SHRESTHA A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chemistry**, v 68, p.295-298, 2000.

DELLA LUCIA, C.M. Otimização de metodologia para análise de folatos em hortaliças folhosas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2009, 85p.

DE SOUZA, S.C.; EITENMILLER, R.R. Effects of procesing and storage on the folate content of spinach and broccoli. **Journal of Food Science**, v.51, p. 526-628, 1986.

EITENMILLER, R.R.; LANDEN, W.O. Folate. In: **Vitamin Analysis for the Health and Food Science**. p. 411-465, 1999.

GREGORY, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research, analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavaility of dietary folates. **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 33. p. 1-101, 1989.

HAWKES, G.G.; VILLOTA, R. Folates in foods: reactivity, stability during processing and nutritional implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 28. p. 439-538, 1989.

HOLASOVÁ M., FIEDLEROVÁ V., VAVREINOVÁ S. Determination of folates in vegetables and their retention during boiling. **Czech Journal of Food Sciences**, v.26, p. 31–37, 2008.

HOPPNER, K.; LAMPI, B. Folate retention in dried legumes after different methods of meal preparation. **Food Research International**, v.26, p.45-48, 1993.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM-U.S.). (2000). Food and Nutrition Board. *Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes*. Dietary Reference Intakes for vitamins. Washington, D.C., National Academy Press, 2004.

- IWATANY, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A.K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 37-48, 2003.
- JASTREBOVA, J.; WITTHÖFT, C.; GRAHN, A.; SVENSSON, U.; JÄGERSTAD, M. HPLC determination in raw and processed beetroots. **Food Chemistry**, v.80, p. 579-588, 2003.
- LEICHTER, J.; SWITZER, V.P.; LANDYMORE, A.F. Effect of cooking on folate content of vegetables. **Nutrition Reports International**, v. 18, p.475-479, 1978.
- LIMA-PALLONE, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Química Nova** (no prelo), 2008a.
- LIMA-PALLONE, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Determinação de folatos em espinafre – avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.58, n.1, p.81-86, 2008b.
- LIN, B.F.; LIN, R.F. Effect of Chinese stir-fry cooking on folate contents of vegetables. **Journal of Chinese Agricultural and Chemical Society**, v.37, p.443-454, 1999.
- MALIN, J.D. Total folate activity in Brussel sprouts: the effects of storage, processing, cooking and ascorbic content. **Journal of Food Technology**, v.12, p.623-632, 1977.
- MARTINEZ, A.B.O.; BERRUEZO, G.R.; CAVA, M.J.B.; GRACIÁ, C.M.; CASTÓN, M.J.P. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.55, n.1, p.5-14, 2005.
- MCKILLOP, D.J.; PENTIEVA, K.; DALY, D.; MCPARTLIN, J.M.; HUGHES, J.; STRAIN, J.J.; SCOTT, J.M.; MCNULTY, H. The effect of different cooking methods on folate retention in various food that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. **British Journal of Nutrition**, v.88, p. 681-688, 2002.
- MCNULTY, H. Folate requirements for health in different population groups. **British Journal Biomedical Science**. v. 52. p. 110–119, 1995.

MCKILLOP, D.J.; PENTIEVA, K.; DALY, D.; MCPARTLIN, J.M.; HUGHES, J.; STRAIN, J.J.; SCOTT, J.M.; MCNULTY, H. The effect of different cooking methods on folate retention in various food that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. **British Journal of Nutrition**, v.88, p. 681-688, 2002.

MULLIN, W.J.; WOOD, D.F.; HOWSAM, S.G. Some factors affecting folacin content of spinach, Swiss chard, broccoli and Brussels sprouts. **Nutrient Reports International**. v.26. p. 7-19, 1982.

MURPHY, E.W.; CRINER, P.E.; GRAY, B.C. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, n.6, p.1153-1157, 1975.

PATRING, J.D.M.; JOHANSSON, M.S.; YAZYNINA, E., JASTREBOVA, J.A. Evaluation of impact of different antioxidants on stability of dietary folates during food sample preparation and storage of extracts prior to analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.553, p. 36-42, 2005.

PHILIPPI, S.T.; LATTERZA, A.R.; CRUZ, A.T.R.; RIBEIRO, L.C. Pirâmide alimentar adaptada: guia para a escolha dos alimentos. **Revista de Nutrição**, v.12, n.3, p.65-80, 1999.

PUUPPONEM-PIMIA, R.; HAKKINEN, S.T.; AARNI, M.; SUORTTI, T.; LAMPI, A-M, EUROLA, M; PIIRONEN, V.; NUUTILA, A.M.; OKSMAN-CALDENTHEY, K-M. Blanching and long-term freezing effect various bioactive compounds of vegetables in different ways. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p.1389-1402, 2003.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p;1389-1402, 2000.

SHRESTHA, A.K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**, v.71, p.545-552, 2000.

STEA, T.H; JOHANSSON, M.; JÄGERSTAD, M.; FROLISH, W. Retention of folates in cooked and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. **Food Chemistry**, v.101, p.1095-1107, 2006.

USDA. United States Department of Agriculture. **National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 21, 2009. Nutrient Data Laboratory Home Page. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>. Acesso: 23 Feb 2009.

VAHTERISTO, L.; LEHIKONEN, K.; OLLILAINEN, V.; VARO, P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. **Food Chemistry**, v.59, n.4, p.589–597, 1997.

VARELA-MOREIRAS, G.; APERTE, E.A.; PRIETO, R.P. **La determinación “in vitro/in vivo” de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza**. 2000. [Dissertação de mestrado]. Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo-CEU, Madrid.

5. CONCLUSÕES GERAIS

As hortaliças analisadas constituem fontes importantes de folatos para a alimentação, sendo que seu consumo deve ser estimulado, especialmente para mulheres de idade fértil, que constituem grupo de risco para a deficiência dessa vitamina.

Dentre as três isoformas de folatos analisadas, o 5-formiltetraidrofolato (5-FTHF) foi a encontrada em maior quantidade. Sua concentração diferiu entre as hortaliças, sendo que os floretes e as folhas de brócolis apresentaram as maiores concentrações, e o espinafre, as menores.

Devido ao caráter hidrossolúvel dos folatos e por serem facilmente perdidos na água de cocção, observou-se que as perdas de 5-FTHF e THF foram significativas quando utilizada a cocção sob imersão em água em floretes de brócolis. A cocção a vapor também não se mostrou eficiente na preservação de THF na mesma hortaliça. O método de refogamento em óleo não ocasionou perdas significativas de folatos, provavelmente devido ao curto tempo de cocção.

Quando analisadas entre duas épocas do ano distintas (inverno e primavera), não foram encontradas diferenças em relação à concentração de folatos nas hortaliças, provavelmente devido à semelhança de condições climáticas entre essas duas estações.

A metodologia utilizada no presente estudo mostrou-se confiável para predição da concentração de folatos nesse tipo de matriz alimentar. Os testes de validação demonstraram alta recuperação dos padrões vitamínicos ao longo dos procedimentos de extração e análise, boa repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação.

Ressalta-se que as hortaliças analisadas, devido ao seu baixo custo, facilidade de aquisição e ampla disponibilidade na região devem ser escolhidas para utilização em programas de alimentação, como é o caso do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), visando a atender as necessidades de folatos da população em geral.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que a análise de folatos envolve uma série de desafios, devido a sua instabilidade, dificuldade das técnicas de extração e análise e presença em baixas concentrações nos alimentos, sugere-se mais estudos que possibilitem a otimização e a validação de metodologias de análise dessa vitamina em outros alimentos tipicamente brasileiros, e também em outras matrizes alimentares como as frutas.

Os métodos de cocção avaliados no presente estudo foram realizados em escala laboratorial, simulando a preparação doméstica das hortaliças. Assim, verifica-se a necessidade da realização de trabalhos que avaliem a influência do processo de cocção em serviços de alimentação, em condições reais de preparação e consumo, aumentando os dados na literatura a respeito da estabilidade de folatos em alimentos.

Outros estudos com maior tempo de duração, que possibilitem a coleta de hortaliças nas quatro diferentes estações do ano, poderão avaliar melhor a variação da concentração de folatos ao longo do ano.

APÊNDICE A - (Artigo 2) - Concentração e teste de médias de tetraidrofolato (THF) em hortaliças cruas e submetidas a diferentes métodos de cocção.

	Hortaliça	Tratamento	Teste de médias				
			x	S(x)	CV	Valor de t	Probabilidade
THF (µg/100g MF)	Couve	Crua	72,91	46,05	63,16		
		Fatiada Refogada	56,23	30,12	53,56	0,93	0,3820 ^{ns}
		Rasgada Refogada	53,63	22,93	42,75	1,52	0,1723 ^{ns}
	Florete de Brócolis	Cru	69,46	57,67	83,02		
		Cozido a Vapor	26,40	18,37	69,58	2,85	0,0245 *
		Cozido sob Imersão	10,83	5,07	46,81	2,74	0,0289 *
	Folha de Brócolis	Crua	60,71	32,42	53,40		
		Refogada	56,61	35,63	62,94	0,25	0,8111 ^{ns}
	Espinafre	Cru	24,57	21,89	89,09		
		Refogado	13,25	12,97	97,89	1,53	0,1688 ^{ns}
Mostarda	Crua	71,67	60,85	84,90			
	Refogada	44,13	38,40	87,01	1,16	0,2845 ^{ns}	

x: Média de 8 repetições; S(x): Desvio-padrão; CV: Coeficiente de variação (%) = $S(x)/x * 100$; Probabilidade: $P > 0,05$: não significativo (ns) ou *: significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste t pareado.

APÊNDICE B - (Artigo 2) - Concentração e teste de médias de 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) em hortaliças cruas e submetidas a diferentes métodos de cocção.

	Hortaliça	Tratamento	Teste de médias				
			x	S(x)	CV	Valor de t	Probabilidade
5-MTHF (µg/100g MF)	Couve	Crua	67,02	41,63	62,11		
		Fatiada Refogada	56,84	30,00	52,78	0,85	0,4209 ^{ns}
		Rasgada Refogada	56,22	30,93	55,02	1,15	0,2870 ^{ns}
	Florete de Brócolis	Cru	123,12	91,29	74,15		
		Cozido a Vapor	102,19	87,60	85,72	1,65	0,1432 ^{ns}
		Cozido sob Imersão	87,99	65,53	74,47	1,49	0,1800 ^{ns}
	Folha de Brócolis	Crua	219,40	87,47	39,87		
		Refogada	220,71	68,80	31,17	0,11	0,9129 ^{ns}
	Espinafre	Cru	42,72	26,59	62,24		
		Refogado	27,11	15,92	58,72	1,25	0,2521 ^{ns}
Mostarda	Crua	164,93	32,41	19,65			
	Refogada	112,67	30,10	26,71	1,33	0,2244 ^{ns}	

x: Média de 8 repetições; S(x): Desvio-padrão; CV: Coeficiente de variação (%) = $S(x)/x * 100$; Probabilidade: $P > 0,05$: não significativo (ns) ou *: significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste t pareado.

APÊNDICE C - (Artigo 2) - Concentração e teste de médias de 5-formiltetraidrofolato (5-FTHF) em hortaliças cruas e submetidas a diferentes métodos de cocção.

	Hortaliça	Tratamento	Teste de médias				
			x	S(x)	CV	Valor de t	Probabilidade
5-FTHF (µg/100g MF)	Couve	Crua	409,79	379,39	92,58		
		Fatiada Refogada	347,16	285,00	82,09	0,96	0,3688 ^{ns}
		Rasgada Refogada	300,56	260,41	86,64	1,34	0,2218 ^{ns}
	Florete de Brócolis	Cru	562,01	415,20	73,93		
		Cozido a Vapor	354,55	96,67	27,26	1,67	0,1393 ^{ns}
		Cozido sob Imersão	297,29	138,25	46,50	4,76	0,0021 *
	Folha de Brócolis	Crua	451,40	264,12	58,51		
		Refogada	520,82	381,18	73,19	0,64	0,5433 ^{ns}
	Espinafre	Cru	173,77	73,22	42,14		
		Refogado	114,43	69,49	60,73	2,10	0,0739 ^{ns}
	Mostarda	Crua	327,78	289,94	88,45		
		Refogada	129,84	65,91	50,76	2,00	0,0858 ^{ns}

x: Média de 8 repetições; S(x): Desvio-padrão; CV: Coeficiente de variação (%) = $S(x)/x * 100$; Probabilidade: $P > 0,05$: não significativo (ns) ou *: significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste t pareado.

APÊNDICE D - (Artigo 3) - Concentração e teste de médias de tetraidrofolato (THF) em hortaliças cruas e cozidas, coletadas no inverno e na primavera.

	Hortaliça	Tratamento	Teste de Médias				
			x	S(x)	CV	Valor de f	Probabilidade
THF (µg/100 MF)	CC	Inverno	65,72	30,10	45,80	0,17	0,6927 ^{ns}
		Primavera	80,11	62,49	78,00		
	CFR	Inverno	50,09	34,58	69,03	0,30	0,6043 ^{ns}
		Primavera	62,36	28,65	45,94		
	CRR	Inverno	54,12	24,76	45,75	0,00	0,9571 ^{ns}
		Primavera	53,14	24,77	46,61		
	FLBC	Inverno	58,53	48,91	83,56	0,26	0,6303 ^{ns}
		Primavera	80,39	61,05	75,94		
	FLBV	Inverno	24,93	12,28	49,26	0,04	0,8405 ^{ns}
		Primavera	27,87	15,12	54,25		
	FLBCOZ	Inverno	12,71	4,47	35,17	1,11	0,3317 ^{ns}
		Primavera	8,96	5,53	61,72		
	FOBC	Inverno	62,38	31,78	50,94	0,02	0,8974 ^{ns}
		Primavera	59,05	37,89	64,16		
	FOBR	Inverno	67,88	34,34	50,59	0,77	0,4126 ^{ns}
		Primavera	45,34	38,00	83,81		
	EC	Inverno	49,49	10,34	20,89	0,66	0,4470 ^{ns}
		Primavera	24,69	6,53	26,45		
	ER	Inverno	4,59	0,81	17,65	4,23	0,0568 ^{ns}
		Primavera	21,90	13,85	63,24		
MC	Inverno	70,83	29,14	41,14	0,00	0,9720 ^{ns}	
	Primavera	72,53	18,25	24,16			
MR	Inverno	64,47	46,81	72,61	2,83	0,1433 ^{ns}	
	Primavera	23,77	12,05	50,69			

CC: Couve crua; CFR: Couve fatiada refogada; CRR: Couve rasgada refogada; FLBC: Floretes de brócolis crus; FLBV: Floretes de brócolis cozidos a vapor; FLBCOZ: Floretes de brócolis cozidos sob imersão; FOBC: Folhas de brócolis cruas; FOBR: Folhas de brócolis refogadas; EC: Espinafre cru; ER: Espinafre refogado; MC: Mostarda crua; MR: Mostarda refogada.
x: Média de 4 repetições; S(x): Desvio-padrão; CV: Coeficiente de variação (%) = $S(x)/x * 100$;
Probabilidade: $P > 0,05$: não significativo (ns) ou *: significativo, a 5% de probabilidade, pela Análise de Variância.

APÊNDICE E - (Artigo 3) - Concentração e teste de médias de 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) em hortaliças cruas e cozidas, coletadas no inverno e na primavera.

	Hortaliça	Tratamento	Teste de médias				
			x	S(x)	CV	Valor de f	Probabilidade
5-MTHF (µg/100g MF)	CC	Inverno	59,62	18,00	30,19	0,22	0,6521 ^{ns}
		Primavera	74,42	59,78	80,33		
	CFR	Inverno	52,76	24,03	45,54	0,13	0,7312 ^{ns}
		Primavera	60,92	38,46	63,13		
	CRR	Inverno	50,36	13,55	26,91	0,26	0,6304 ^{ns}
		Primavera	62,08	44,24	71,26		
	FLBC	Inverno	83,43	9,98	11,96	1,54	0,2616 ^{ns}
		Primavera	162,80	23,06	14,16		
	FLBV	Inverno	56,45	26,37	46,71	2,06	0,2010 ^{ns}
		Primavera	147,92	61,24	41,40		
	FLBCOZ	Inverno	37,91	19,19	50,62	1,35	0,2891 ^{ns}
		Primavera	138,07	19,33	14,00		
	FOBC	Inverno	60,66	22,25	36,68	1,42	0,2778 ^{ns}
		Primavera	378,15	31,61	8,36		
	FOBR	Inverno	74,47	22,46	30,16	1,31	0,2952 ^{ns}
		Primavera	378,15	59,74	15,80		
	EC	Inverno	50,40	35,37	70,18	0,63	0,4566 ^{ns}
		Primavera	35,03	15,56	44,42		
	ER	Inverno	15,11	2,67	17,67	0,26	0,6303 ^{ns}
		Primavera	39,12	14,15	36,17		
MC	Inverno	55,15	38,49	69,79	1,99	0,2079 ^{ns}	
	Primavera	274,71	30,30	11,03			
MR	Inverno	69,52	27,83	40,02	0,86	0,3888 ^{ns}	
	Primavera	155,83	83,71	53,72			

CC: Couve crua; CFR: Couve fatiada refogada; CRR: Couve rasgada refogada; FLBC: Floretes de brócolis crus; FLBV: Floretes de brócolis cozidos a vapor; FLBCOZ: Floretes de brócolis cozidos sob imersão; FOBC: Folhas de brócolis cruas; FOBR: Folhas de brócolis refogadas; EC: Espinafre cru; ER: Espinafre refogado; MC: Mostarda crua; MR: Mostarda refogada.

x: Média de 4 repetições; S(x): Desvio-padrão; CV: Coeficiente de variação (%) = $S(x)/x * 100$; Probabilidade: $P > 0,05$: não significativo (ns) ou *: significativo, a 5% de probabilidade, pela Análise de Variância.

APÊNDICE F - (Artigo 3) - Concentração e teste de médias de 5-formiltetraidrofolato (5-FTHF) em hortaliças cruas e cozidas, coletadas no inverno e na primavera.

	Hortaliça	Tratamento	Teste de médias				
			x	S(x)	CV	Valor de f	Probabilidade
05-FTHF (µg/100g MF)	CC	Inverno	396,94	58,64	14,77	0,01	0,9322 ^{ns}
		Primavera	422,63	212,76	50,34		
	CFR	Inverno	330,70	50,40	15,24	0,02	0,8847 ^{ns}
		Primavera	363,62	58,24	16,02		
	CRR	Inverno	359,60	42,65	11,86	0,37	0,5631 ^{ns}
		Primavera	241,54	77,59	32,12		
	FLBC	Inverno	382,31	280,25	73,30	1,63	0,2483 ^{ns}
		Primavera	741,71	487,42	65,71		
	FLBV	Inverno	170,76	95,75	56,07	0,56	0,3894 ^{ns}
		Primavera	538,34	68,69	12,76		
	FLBCOZ	Inverno	131,45	92,46	70,34	2,81	0,1445 ^{ns}
		Primavera	463,14	84,59	18,26		
	FOBC	Inverno	294,17	224,71	76,38	4,08	0,0898 ^{ns}
		Primavera	608,63	215,30	35,37		
	FOBR	Inverno	439,79	50,60	11,50	0,31	0,5982 ^{ns}
		Primavera	611,86	190,74	31,17		
	EC	Inverno	126,69	52,32	41,30	5,35	0,0601 ^{ns}
		Primavera	220,85	62,43	28,27		
	ER	Inverno	72,23	49,17	68,07	4,37	0,0815 ^{ns}
		Primavera	156,63	64,05	40,89		
MC	Inverno	156,76	80,26	51,20	3,96	0,0937 ^{ns}	
	Primavera	498,80	342,34	68,63			
MR	Inverno	136,89	44,14	32,24	0,08	0,7873 ^{ns}	
	Primavera	122,79	89,75	73,09			

CC: Couve crua; CFR: Couve fatiada refogada; CRR: Couve rasgada refogada; FLBC: Floretes de brócolis crus; FLBV: Floretes de brócolis cozidos a vapor; FLBCOZ: Floretes de brócolis cozidos sob imersão; FOBC: Folhas de brócolis cruas; FOBR: Folhas de brócolis refogadas; EC: Espinafre cru; ER: Espinafre refogado; MC: Mostarda crua; MR: Mostarda refogada.

x: Média de 4 repetições; S(x): Desvio-padrão; CV: Coeficiente de variação (%) = $S(x)/x * 100$; Probabilidade: $P > 0,05$: não significativo (ns) ou *: significativo, a 5% de probabilidade, pela Análise de Variância

APÊNDICE G - Fôlder – A importância do folato na manutenção da saúde.