

EFEITOS DO BENEFICIAMENTO DO ARROZ NA PREVALÊNCIA DE ÁCIDO FÓLICO VIA LC-MS/MS

Jander Luis Fernandes Monks¹; Moacir Cardoso Elias²; Elina Bastos Caramão³; Maria Regina Alves Rodrigues⁴; Rafael de Almeida Schiavon⁵; Maurício de Oliveira⁵ Nathan Levien Vanier⁶

Palavras-chave: Arroz, vitamina B9, polimento, cromatografia

INTRODUÇÃO

As recomendações para uma vida saudável incluem a adoção de alimentação equilibrada, com moderação no consumo de produtos de origem animal como carnes, ovos, leite e seus derivados, ao passo que frutas e legumes podem ser consumidos em maiores quantidades. Os cereais estão, também, inclusos neste último grupo, do qual faz parte o arroz, possuidor de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis no pericarpo e embrião (PARK et al., 2001; ROTH-MAIER et al., 2002).

Com destaque para as vitaminas do complexo B, atualmente, os folatos e o ácido fólico participam em funções metabólicas importantes, principalmente, na biossíntese de purinas e pirimidinas, atuando como co-fatores de enzimas que sintetizam o DNA (ácido desoxirribonucléico) e o RNA (ácido ribonucléico), aspecto indispensável ao desenvolvimento fetal (SCOTT et al., 1994; MCDONALD et al., 2003; MEZZOMO et al., 2007).

Diante da necessidade de controlar e avaliar a estabilidade dessa vitamina nos produtos fortificados, para a separação e a determinação dos folatos, os métodos de análise mais recomendados pelos laboratórios credenciados têm sido os cromatográficos e os imunológicos, já que a bioatividade é diferente entre as diferentes formas ativas dos folatos, assim como suas atuações no organismo (KONINGS et al., 2001; JASTREBOVA et al., 2003)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), utilizando colunas de fase reversa, com detecção por absorção nas regiões do ultravioleta (UV: 254 a 290nm) e/ou fluorescência (excitação: 280 a 310nm e emissão: 352 a 372nm), tem sido a mais empregada na análise de folatos e do ácido fólico, por apresentar rapidez e simplicidade na etapa de extração, reprodutibilidade, alta sensibilidade e exatidão, além de melhor separação das diferentes formas bioativas presentes nos alimentos (CATARINO; GODOY, 2004; CREPALDI; GODOY, 2005). Outra técnica que vem se destacando para a determinação de folatos em alimentos, devido à sua alta especificidade analítica, é a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-MS) (PENNEY et al., 2005) e espectrometria de massas em "Tandem" (LC-MS/MS) (SANTOS et al., 2005).

Tendo em vista a importância do arroz como alimento base da população mundial, objetivou-se verificar a influência do beneficiamento industrial na prevalência de ácido fólico contidos nos grãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de grãos de arroz da classe longo fino, com alto teor de amilose, pertencentes à coleção de amostras do Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos do Departamento de Ciência e Tecnologia

¹ Eng^o. Químico, Dr. (Professor da UCPEL), Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil, jander@ucpel.edu.br

² Eng^o. Agrônomo, Dr., Professor, Universidade Federal de Pelotas, eliasmc@ufpel.tche.br

³ Química, Dra., Professora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, elina@ufrgs.br

⁴ Química, Dra., Professora, Universidade Federal de Pelotas, mreginarodrigues@terra.com.br

⁵ Eng^o. Agrônomo, M. Sc., Doutorando, Universidade Federal de Pelotas, raschiavon@gmail.com; oliveira.mauricio@ibest.com.br

⁶ Eng^o. Agrônomo, Mestrando, Universidade Federal de Pelotas, nathanvanier@hotmail.com

Agroindustrial, na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas.

Para cada amostra de 50kg de arroz em casca foram coletadas três alíquotas de 100g, as quais foram submetidas ao beneficiamento industrial (BRASIL, 2009) em engenho de provas, modelo Zaccaria®, regulado de forma que entre 93 e 97% dos grãos descascassem na primeira passagem, obtendo-se assim o arroz integral. Para a obtenção do arroz branco utilizado, no mesmo engenho de provas foi realizada a operação de polimento, na forma convencional, utilizada pela maioria das indústrias que beneficiam este grão (ELIAS, 2007), com regulagem do equipamento para remoção de farelo na faixa de 7 a 9% de massa do grão de arroz integral, em condição operacional determinada por testes prévios.

A determinação de ácido fólico (AF), via cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), foi realizada mediante o preparo da solução padrão a partir de uma solução estoque contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ AF. Exatamente 1,0mg do padrão em pó foi dissolvido com água ultra pura, ajustando-se o pH entre 7,0 a 8,0. Após a dissolução completa, o padrão foi transferido para um balão volumétrico de 10mL e estocado a 4°C, na ausência de luz. A partir desta solução estoque, por diluição com solução $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de acetato de amônio, foi preparada uma solução padrão contendo 50 ng mL^{-1} de ácido fólico, da qual $20 \mu\text{L}$ foram injetadas no sistema LC-MS/MS (MARTINS JÚNIOR et al., 2008). A partir desta solução foram preparadas soluções padrões nas concentrações de 0,01 a $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$.

O ácido fólico foi extraído de 1,0g de arroz moído, pela imersão em mistura de 3,0mL de hidróxido de potássio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 3,0mL de acetonitrila (Synth®), por 10 minutos em banho ultra-sônico. Ao extrato foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de ácido tricloroacético 25 g L^{-1} (CREPALDI; GODOY, 2005) e o volume completado a 10mL com solução de acetato de amônio 75 mmol L^{-1} (pH 7,0). Foi injetado no sistema LC-MS/MS $20 \mu\text{L}$ do filtrado (MARTINS JÚNIOR et al., 2008). Para detectar a presença do ácido fólico (AF) foi utilizado o sistema de cromatografia líquida (Schimadzu-Bruker®). Foi utilizada coluna de separação analítica de fase reversa, Shimadzu® ($2,0 \text{ cm} \times 150 \text{ mm} \times 4,6 \mu\text{m}$), tendo como fase estacionária C18 (grupamentos octadecil). O ácido fólico foi separado em sistema de eluição isocrático, com vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, durante 5 minutos de corrida, utilizando-se uma mistura de 25% de fase móvel A (5 mmol L^{-1} de acetato de amônio em água) e de 75% de fase móvel B (5 mmol L^{-1} de acetato de amônio em metanol absoluto).

O ácido fólico foi ionizado na fonte de ionização por eletronebulização (Electrospray Ionization - ESI), no modo positivo, num analisador de massas ion trap (Bruker®), operado em modo de aquisição por Monitoramento Múltiplo de Reação (MRM), com o propósito de detectar duas transições de razão carga/massa (m/z): $442,2 > 176,1$ e $442,2 > 295,1$. O método estatístico utilizado foi a análise de variância, seguida do teste de Tukey, de comparação de médias a 5% ($p < 0,05$) de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o espectro MS_3 da solução padrão de ácido fólico. Os fragmentos selecionados para a determinação em modo Multiple Reaction Monitoring (MRM), para o íon precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$, de m/z 442, foram os produtos de m/z 313, 295 (mais intenso) e 269. O íon m/z 313 ao perder uma molécula de H_2O (massa atômica 18), produz o fragmento m/z 295 (Figura 1).

Resultados semelhantes foram encontrados por Stokes e Webb (1999), Nelson et al. (2006) e Martins Júnior et al. (2008), utilizando a técnica LC-MS/MS, no modo positivo e negativo e modo de aquisição MRM. Martins Júnior et al. (2008) encontraram duas transições mais intensas para o íon precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 442,2, para a detecção do ácido fólico em amostras de farinha de trigo. Estas foram escolhidas para confirmá-lo e quantificá-lo: m/z 176,1 e m/z 295,1 (mais intenso).

A similaridade dos cromatogramas e da intensidade dos espectros da solução padrão com amostras de arroz (Figuras 2 e 3), confirmam a presença de ácido fólico nos

grãos até a faixa de 9% de remoção de farelo.

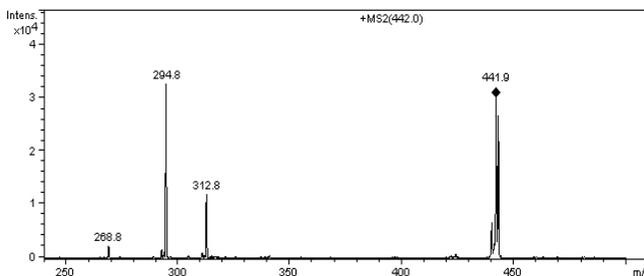


FIGURA 1 – Espectro de massas (MS₃) da solução padrão de ácido fólico, destacando o íon precursor [M + H]⁺ e seus fragmentos.

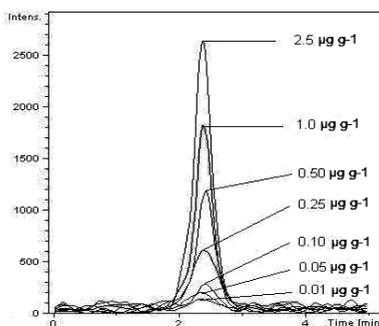


FIGURA 2 – Cromatograma do LC-MS/MS das soluções padrões de ácido fólico.

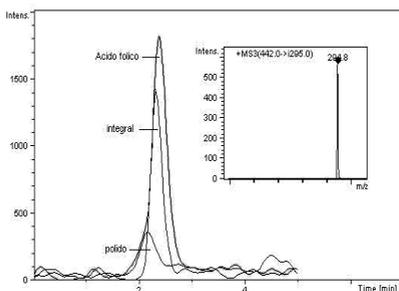


FIGURA 3 – Cromatograma do LC-MS/MS das amostras de arroz beneficiadas pelo processo integral e branco polido na faixa de 7 a 9% de intensidade de remoção de farelo

A partir da curva analítica calculada por meio da Figura 2, foi possível determinar que as amostras de arroz integral apresentaram $0,92 \mu\text{g g}^{-1}$ de ácido fólico e a de arroz branco, $0,14 \mu\text{g g}^{-1}$. Tal fato indica uma perda média de 85% desta vitamina quando a operação de polimento o intensifica até 9% de remoção de farelo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Monks (2010), em amostras de arroz, utilizando método de quantificação de ácido fólico desenvolvido por Crepaldi e Godoy (2005), em cromatografia de alta eficiência (HPLC-UV).

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que polimentos até uma faixa de 9% de remoção de farelo reduzem os teores de ácido fólico, em média, até 85% em relação aos grãos integrais.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPERGS, SCT-RS (Pólos Tecnológicos), IRGA e ZACCARIA Equipamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 6, de 16 de fevereiro de 2009. Regulamento Técnico do Arroz, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, p.3, 17 fev. de 2009.
- CATHARINO, R. R.; VISENTAINER, J. V.; GODOY, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, v.23, n.3, p.389-395, 2003.
- CREPALDI, P. F.; GODOY, H. T. Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ácido fólico em arroz enriquecido. 6o. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, São Paulo: Campinas, 2005. 1 CD-ROM.
- ELIAS, M.C. **Pós-colheita de arroz: secagem, armazenamento e qualidade**. 1 ed. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2007.422p.
- JASTREBOVA, J.; WITTHÖFT, C.; GRAHN, A.; SVENSSON, U.; JAGERSTAD, M.; *Food Chemistry*. n.80, p.579, 2003.
- KONINGS, E. J. M., ROOMANS, H. H. S., DORANT, E., GOLDBOHN, R. A. SARIS, W. H. M. Folate intake of the dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.765-776, 2001.
- MARTINS JÚNIOR, H. A. WANG, A. Y.; ALABOURDA, J.; PIRES, M. A. F.; VEGA, O. B.; LEBRE, D.T. A Validated method to quantify folic in wheat flour samples using liquid chromatography – Tandem mass spectrometry. *Journal Brazilian Chemistry Society*. v.19, n.5, p. 971-977, 2008.
- MCDONALD, S. D. et al. The prevention of congenital anomalies with periconceptional folic acid supplementation. *Journal of Obstetrics Gynecology*. v.25, n.2, p.115–121, 2003.
- MEZZOMO, C. L. S. et al. Prevenção de defeitos do tubo neural: prevalência do uso da suplementação de ácido fólico associados em gestantes na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.23, n.11, p.2716-2726, 2007.
- MONKS, J.L.F. Efeitos da intensidade do polimento sobre parâmetros de avaliação tecnológica e bioquímica, perfil lipídico e conteúdo de ácido fólico em grãos de arroz. 115p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- NELSON, B. C.; SHARPLESS, K. E.; SANDER, L. C. Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. n.1135, p.203–211, 2006.
- PARK, J. K.; KIM, S. S.; KIM, K. O. Effect of Milling Ratio on Sensory Properties of Cooked Rice and on Physicochemical Properties of Milled and Cooked Rice. **Cereal Chemistry**. v.78, n.2, p.151-156, 2001.
- PENNEY, L.; SMITH, A.; COATES, B.; WIJEWICKREME, A. Determination of Chloramphenicol Residues in Milk, Eggs, and Tissues by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal AOAC International*. v.88, p.645, 2005.
- ROTH-MAIER, D. A.; KETTLER, S. I.; KIRCHGESSNER, M. Availability of vitamin B6 from different food sources. **International Journal of Food Sciences Nutrition**. v.53, n.2, p.171-179, 2002.
- SANTOS, L.; BARBOSA, J.; CASTILHO, M. C.; RAMOS, F.; RIBEIRO, C. A. F.; SILVEIRA, M. I. N. Determination of chloramphenicol residues in rainbow trouts by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. n.529, p.249, 2005.
- SCOTT, J. et al. The role of folate in the prevention of neural-tube defects. *Proceedings of Nutrition Society*. v.53, p.631– 636, 1994.
- STOKES, P.; WEBB, K. Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.864, p.59-57, 1999.