

Determinação de Tiamina em Grãos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Derivatização Pós-Coluna

Jeane Santos da Rosa¹

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy²

João Oiano Neto³

Manuela Cristina Pessanha de Araujo⁴

Vanessa Tavares da Silva Souza⁵

Renata Galhardo Borguini⁶

Sidney Pacheco⁷

José Luiz Viana de Carvalho⁸

A vitamina B1 ou Tiamina é uma vitamina hidrossolúvel essencial para o bem-estar dos seres humanos e animais, havendo necessidades adicionais da mesma em estágios da vida como crescimento, gravidez e lactação. A maioria das vitaminas B estão associadas à utilização do alimento e à produção ou interconversão de energia no organismo. A tiamina é uma substância sulfurada e, sob a forma de pirofosfato, participa como coenzima em vários caminhos metabólicos, como o ciclo do ácido cítrico, a glicólise e a produção de pentose fosfato (GOLDA et al., 2004). Está especialmente envolvida em várias etapas do metabolismo dos carboidratos e seu requerimento diário depende dos teores dos carboidratos presentes na dieta (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2000).

A determinação de tiamina em alimentos é bastante complexa, pois, devido aos baixos níveis, torna-se necessário utilizar detectores de fluorescência, mais sensíveis que os usuais detectores de UV, ou até mesmo arranjo de diodo (PDA). A Tiamina, porém, não

fluoresce naturalmente, sendo necessário, ainda, realizar uma reação de derivatização que pode ser pré ou pós-coluna.

Em geral, métodos aplicáveis para formulações farmacêuticas ou alimentos fortificados não são úteis para dosar vitaminas presentes naturalmente nos alimentos. O mesmo pode ser dito para métodos tipo multianálitos (multivitaminas) que, devido à natureza complexa e estruturas químicas diferentes destas substâncias, produzem picos mal separados e de baixa sensibilidade.

A derivatização pós-coluna com ferricianeto de potássio alcalino (Figura 1) permite a detecção por fluorescência da vitamina B1 sob a forma de tiocromo (GUBLER, 1991). A derivatização pós-coluna garante que a presença de substâncias redutoras como polifenóis, por exemplo, não prejudiquem a conversão oxidativa da tiamina em tiocromo, pois a reação ocorrerá seqüencialmente com a vitamina B1 já separada dos interferentes.

¹ Química, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, jeane@ctaa.embrapa.br

² Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, ronoel@ctaa.embrapa.br

³ Químico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, oiano@ctaa.embrapa.br

⁴ Engenheira Química, M.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, manuela@ctaa.embrapa.br

⁵ Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, vanessinhasouzarj@bol.com.br

⁶ Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, renata@ctaa.embrapa.br

⁷ Químico, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sidney@ctaa.embrapa.br

⁸ Engenheiro Agrônomo, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, jlvc@ctaa.embrapa.br

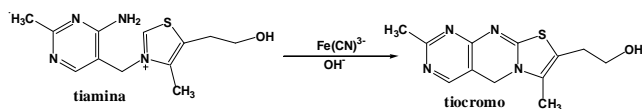


Figura 1: Reação de derivatização da tiamina com ferricianeto de potássio alcalino.

O objetivo deste trabalho foi adaptar o método oficial para determinação de tiamina em alimentos do European Committee for Standardization (2003) para amostras de grãos (feijão, arroz e milho).

Material e Métodos

As amostras estudadas, inicialmente, foram feijão preto, arroz e milho, oriundos de diversos projetos desenvolvidos na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

A metodologia em questão foi adaptada a partir do método oficial EN 14122 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003), que se baseia na extração da vitamina B1 da matriz do grão finamente moído por hidrólise ácida com HCl 0,1M em autoclave a 121°C. Após a hidrólise ácida, a amostra foi resfriada, o pH ajustado para aproximadamente 4 com acetato de sódio 2,5M; foram, então, adicionados 150mg de enzima takadiastase (Sigma-Aldrich[®]). As amostras foram levadas ao banho termostatizado por 18 horas a 37°C, filtradas em papel de filtro e analisadas. Utilizou-se um cromatógrafo líquido Waters Alliance[®] 2695 previamente calibrado, equipado com filtro de linha, detector de fluorescência Waters[®] 2475, sistema de reação pós-coluna Waters[®] à temperatura ambiente (Figura 2), fase móvel isocrática 40:60 metanol:ácido heptanossulfônico (v/v) e coluna X-Terra[®] (100x3,2mm, 3,5 μm) com filtro de linha.

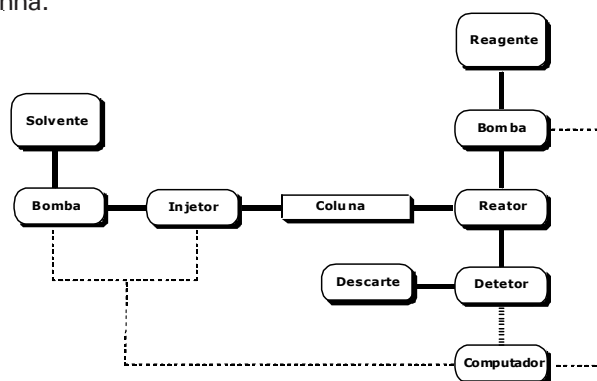


Figura 2: Fluxograma do sistema cromatográfico utilizado na determinação de vitamina B1 em alimentos com derivatização pós-coluna.

Resultados e Discussão

A determinação desta vitamina em alimentos consiste basicamente em duas etapas: a extração por hidrólise ácida e hidrólise enzimática e a análise cromatográfica. A hidrólise ácida foi utilizada para inativar as proteínas e liberar a vitamina destas associações, assim como converter boa parte dos polissacarídeos em açúcares solúveis. A hidrólise enzimática permite a desfosforilação completa da vitamina B1 pela enzima takadiastase (Sigma-Aldrich[®]), que possui atividade fosfatásica e proteásica (NDAW et al., 2000). O método descrito aqui consistiu de uma modificação do método oficial do European Committee for Standardization (2003). Foi utilizada uma fase móvel com regente de pareamento iônico (ácido heptanossulfônico) em ácido fosfórico (pH = 3) com concentração 25mM, que possibilitou a não utilização de soluções tampão. Também foi diminuído o teor de solvente orgânico (metanol) em aproximadamente 50%, o que permitiu, além de uma substancial economia de solvente, uma separação mais eficiente com picos em formato gaussiano e boa resolução, sem, no entanto, aumentar a retenção da tiamina (aproximadamente seis minutos), pois utilizou-se uma coluna C18 de 150x4,6 mm e 3,5 μm .

O sistema de derivatização pós-coluna foi adaptado de um antigo sistema para derivatização de aminoácidos por ninhidrina e ofereceu algumas dificuldades no que diz respeito à sua inércia em relação à solução derivatizante de pH 14. Cuidados extras, como lavagem exaustiva com água, foram tomados para que bomba e reator não ficassem com esta solução parada em seu interior, mas, mesmo assim, problemas de corrosão ocorreram. Uma saída foi fazer outra adaptação com uma válvula de troca de solvente que permite a programação de entrada de água para lavagem do sistema ao final das injeções que normalmente ocorrem à noite.

Os cromatogramas produzidos demonstraram boa separação cromatográfica e reprodutibilidade de tempo de retenção em relação ao padrão (Figura 3). As curvas de calibração (Figura 4) estabeleceram excelente correlação entre os pontos, demonstrando linearidade na faixa de trabalho.

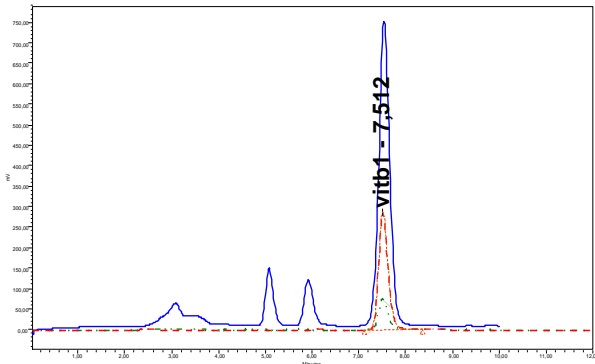


Figura 3: Cromatogramas sobrepostos de dois pontos da curva de calibração e uma amostra de feijão.

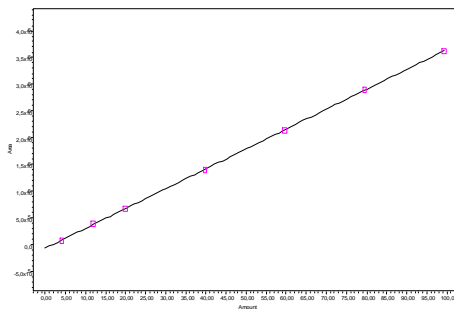


Figura 4: Exemplo de uma curva de calibração obtida ($R^2 = 0,999949$) para a faixa de concentração estudada.

Os níveis de vitamina B1 encontrados estão dentro do reportado em tabelas nutricionais (IBGE, 1999) para feijão, arroz e milho. As variedades e fatores edafoclimáticos associados às amostras não foram levados em consideração para avaliação dos resultados, mas, ainda assim, observa-se que os resultados descritos na Tabela 1 indicam baixo desvio padrão entre as amostras analisadas.

Amostra	Milho	Feijão Preto	Arroz
1.1	0,310	0,869	0,215
1.2	0,340	0,903	0,231
2.1	0,340	0,687	0,210
2.2	0,340	0,669	0,207
3.1	0,250	0,538	0,190
3.2	0,240	0,587	0,214
4.1	0,330	0,619	0,220
4.2	0,360	0,643	0,241
5.1	0,260	0,725	0,243
5.2	0,270	0,722	0,262
6.1	0,340	0,694	0,268
6.2	0,320	0,627	0,261
7.1	0,290	0,601	0,210
7.2	0,290	0,602	0,226
8.1	0,280	0,647	0,151
8.2	0,270	0,618	0,158
9.1	0,260	0,607	0,221
9.2	0,280	0,613	0,213
10.1	0,250	0,605	
10.2	0,250	0,855	
11.1	0,250		
11.2	0,250		
12.1	0,240		
12.2	0,240		
Média	0,285	0,672	0,219
Desv. Pad	0,0393	0,0995	0,0315
CV(%)	13,783	14,821	14,376

Tabela 1: Teores de vitamina B1 (mg/100g) encontrados em amostras de arroz, feijão e milho que foram estudadas.

Conclusões

A separação cromatográfica obtida produziu picos com resolução de linha base, com boa simetria e magnitude considerada excelente, apesar do volume morto agregado ao sistema cromatográfico devido ao reator (volume nominal de 1mL, além das tubulações).

O método mostrou-se bastante robusto, adaptando-se bem às modificações realizadas que permitiram menor tempo de corrida e menor gasto de solventes sem prejudicar a separação cromatográfica.

Os resultados obtidos mostraram pequena variação, estando de acordo com os dados de composição descritos na literatura.

Referências

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **European standard EN 14122:** foodstuffs: determination of vitamin B1 by HPLC. Brussels, 2003.

GOLDA, A.; SZYNIAROWSKI, P.; OSTROWSKA, K.; KOZIK, A; RAPALA-KOZIK, M. Thiamine binding and metabolism in germinating seeds of selected cereals and legumes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 187-195, 2004.

GUBLER, C. J. Thiamin. In: MACHLIN, L. J. (Ed.).

Handbook of vitamins. 1st ed. New York: M. Dekker, 1991. p. 233-277.

IBGE. **Tabelas de composição de alimentos.** 5. ed. Rio de Janeiro, 1999. 137 p.

NDAW, S.; BERGAENTZLÉ, M.; AOUDE-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 129-138, oct. 2000.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (Grã-Bretanha). Analytical Methods Committee. Determination of thiamine and riboflavin in pet foods and animal feedingstuffs. **Analyst**, v. 125, n. 2, p. 353-360, 2000.

Comunicado Técnico, 153

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de O. Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes*
Secretária: *Michele Belas Coutinho*
Supervisão editorial: *Comitê de Publicações*
Revisão de texto: *Edson Watanabe*
Normatização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *André Luis do N. Gomes*

Expediente