

## Comparação de métodos de análise para o ácido pantotênico em alimentos

Elaine Cristina Pinto Moreschi, Ligia Bicudo de Almeida-Muradian\*

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Universidade de São Paulo

\* Correspondência:

L. B. Almeida-Muradian  
Departamento de Alimentos e  
Nutrição Experimental  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo  
Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 14  
05508-900 - São Paulo - SP, Brasil  
E-mail: ligiabi@usp.br

*A análise do ácido pantotênico em alimentos é realizada de forma rotineira através do método microbiológico, o qual é trabalhoso e demorado. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) tem se mostrado um método alternativo para a análise de vitaminas em alimentos. Neste trabalho foram analisadas amostras de fórmulas infantis em pó pelos dois métodos e os resultados médios foram comparados. Através de análise estatística dos resultados observou-se que os dois métodos apresentaram-se equivalentes.*

**Unitermos**

- Ácido pantotênico
- Vitamina B5
- Alimentos/análise

### INTRODUÇÃO

O ácido pantotênico, também conhecido como vitamina B<sub>5</sub>, tem importância metabólica por ser parte da coenzima A (CoA) e da proteína carreadora de grupos acila (ACP). A deficiência desta vitamina está associada às desordens metabólicas e energéticas em seres humanos (Almeida-Muradian, 2003; Mittermayr *et al.*, 2004; Ottaway, 1993).

O ácido pantotênico é formado por um hidróxi-ácido complexo, o ácido pantóico, e molécula de beta-alanina unidos por um grupo amina ligado à carboxila do ácido (Almeida-Muradian, 2003; Song, 1990).

A estrutura química do ácido pantotênico está mostrada na Figura 1.

Como parte da CoA, o ácido pantotênico, atua em mais de setenta vias enzimáticas como mediador na transferência de grupos acetil, funcionando como doador ou receptor de prótons. Está envolvido no metabolismo de ácidos graxos, aminoácidos e carboidratos, na síntese de colesterol, hormônios esteróides, neurotransmissores, porfirinas e hemoglobina, participando da oxidação de

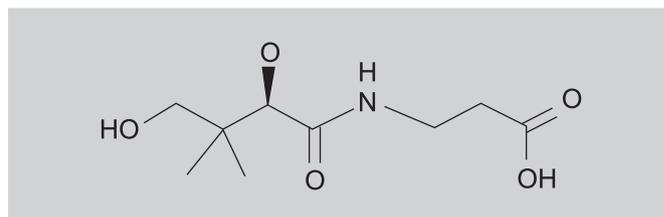


FIGURA 1- Estrutura química do ácido pantotênico

ácidos graxos, piruvato e alfa-cetoglutarato, além de ser responsável pela acetilação de fármacos como a sulfadimida e isoniazida (Almeida-Muradian, 2003; Bender, 1999; Fox, 1990; Smith, Song, 1996; Song, 1990).

O ácido pantotênico está amplamente distribuído na natureza na forma livre ou ligado. Na forma livre é encontrado na gema de ovo, leite, leveduras, alguns cereais e legumes. Na forma ligada, como CoA, está presente no tecido muscular, fígado e rins de animais. Em alimentos refinados, como açúcar, gorduras e óleos e amido de milho, não se encontram teores significativos de ácido pantotênico (Almeida-Muradian, 2003; Fox, 1990; Ottaway, 1993).

O método oficial da AOAC para determinação de ácido pantotênico é o microbiológico utilizando o *Lactobacillus plantarum*. Além deste microorganismo, pode-se utilizar também o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Proteus morgannii* e *Pediococcus acidilacti*. Independente do microorganismo utilizado, o método microbiológico de análise é pouco seletivo para amostras complexas, já que os constituintes da matriz podem influenciar o crescimento do microorganismo, além de ser demorado e trabalhoso (Fox, 1990; Mittermayr *et al.*, 2004; Song, 1990).

Outras técnicas analíticas têm sido utilizadas por diversos autores para a análise do ácido pantotênico em alimentos tais como a colorimetria, a fluorimetria, a espectrofotometria, a radiometria, o radioimunoensaio (RIA), a cromatografia gasosa ou líquida (CG e CLAE), a técnica de imunoafinidade (ELISA) e o método enzimático (Almeida-Muradian, 2003; Fox, 1990; Mittermayr *et al.*, 2004; Song, 1990).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em UV apresenta boa sensibilidade para o ácido pantotênico, porém tem pouca seletividade devido ao baixo comprimento de onda utilizado na detecção. Atualmente, a detecção de massas acoplada à cromatografia a líquido com interface ESI tem sido estudada (Mittermayr *et al.*, 2004; Pakin *et al.*, 2004; Romera *et al.*, 1995).

O objetivo do presente trabalho é comparar os resultados da análise de ácido pantotênico obtidos por dois métodos, microbiológico e cromatográfico, em amostras de fórmulas infantis.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisadas dezessete amostras de quatro fórmulas infantis industrializadas que em seus rótulos estão declarados adição de complexo vitamínico. As fórmulas infantis pertencem a dois tipos de produtos, a saber, indicados para recém-nascidos e para crianças a partir de seis meses de idade. As amostras foram adquiridas em mercado local da Cidade de São Paulo, SP, Brasil.

As amostras foram mantidas na embalagem original e estocadas à temperatura ambiente, protegidas da luz até o momento da análise.

### Reagentes

Os reagentes utilizados foram: Acetonitrila grau HPLC, ácido orto-fosfórico 85%, diidrogenofosfato de potássio P.A., hidrogenofosfato de di-potássio P.A., cloreto

de sódio P.A., ácido acético P.A., hidróxido de sódio P.A., papaína e alfa-amilase. Foi utilizado padrão de D(+) – pantotenato de cálcio, da marca Merck.

Os meios de cultura para determinação microbiológica foram Lactobacilli Agar, Micro Inoculum Broth e Pantothenate Assay Medium, todos da marca Difco. O microorganismo utilizado na inoculação da análise é *Lactobacillus plantarum* – ATCC 8014.

Material de referência DDP (amostra de fórmula infantil em pó preparada para o teste de proficiência) foi obtido junto ao Centrê Nestlé de Reserche-Suíça.

A fase móvel e amostras injetadas no sistema cromatográfico foram filtradas em filtro em membrana de celulose de 0,45 µm de tamanho de poro.

### Preparação dos padrões

A solução padrão concentrada de pantotenato de cálcio foi preparada dissolvendo-se 25 mg deste sal em 250 mL de água desionizada. Esta solução foi preparada no dia da análise. A partir da solução concentrada foram preparadas, por diluição em água desionizada, soluções de trabalho de concentrações 1, 2, 5, 10 e 50 µg/mL.

### Equipamentos

Para extração das amostras, foi utilizado banho de água marca Heraeus® (Suíça), ultrassom, estufa incubadora marca Incotemp (Fischer Scientific® - USA), balanças analítica e semi-analítica marca Mettler® (USA).

A esterilização dos extratos diluídos para análise microbiológica foi realizada em autoclave, marca AMSCO® (American Sterilizer Co - USA) e a inoculação realizada em capela de fluxo laminar, marca VECO® (Brasil). A incubação foi realizada na estufa incubadora marca Incotemp (Fischer Scientific® - USA).

Foi utilizado um sistema cromatográfico Waters® (USA) composto de duas bombas modelo 510, um injetor automático modelo WISP 717+, detector UV modelo 486 e um sistema de coleta de dados Millenium da marca Waters® (USA).

### Extrações das amostras

As amostras destinadas à análise microbiológica sofreram digestão enzimática com papaína (0,2 g) e diastase (0,5 g) a 37 °C em solução tampão fosfato pH = 4,6 por uma noite. Após esta etapa as amostras foram transferidas para balão volumétrico completando-se o volume com água desionizada e filtrando-se em papel de filtro.

As amostras destinadas à análise cromatográfica

foram extraídas com solução tampão fosfato com pH = 4,6 por 15 minutos em ultrassom. Após esta etapa foi realizada uma filtração em papel de filtro e posteriormente foi feita a filtração em filtro de membrana de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro.

### Método cromatográfico

O método cromatográfico foi adaptado de Woolard *et al.* (2000), com as seguintes modificações:

- O processo de extração descrito por Woolard *et al.* (2000) utiliza solução ácida com aplicação de vórtex por duas vezes (20 min. cada vez) seguido de centrifugação de 15 minutos. Utilizou-se neste trabalho a extração de amostra por 15 minutos em ultra-som com solução tampão fosfato, simplificando esta etapa.
- A segunda modificação foi realizada no procedimento cromatográfico, originalmente realizado com coluna C18 numa corrida de modo isocrático com fase móvel composta de solução tampão/acetonitrila (97:3 v/v). O procedimento foi substituído por uma corrida em gradiente com fase móvel composta de solução tampão com pHs diferentes. Esta alteração mostrou-se necessária uma vez que os cromatogramas obtidos com as condições originais não apresentaram separação adequada da vitamina em questão na amostra.

Assim sendo, para o método cromatográfico utilizado neste trabalho, preparou-se uma fase móvel A dissolvendo-se 13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em aproximadamente 700 mL de água desionizada, ajustando-se o pH desta solução a 2,25 com ácido orto-fosfórico P.A., e completou-se o volume para 1000 mL com água deionizada. A fase móvel B foi preparada dissolvendo-se, também, 13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em, aproximadamente, 700 mL de água desionizada e ajustando-se o pH desta solução a 5,0 com ácido orto-fosfórico P.A. e completou-se o volume para 1000 mL com água desionizada. Ambas as fases móveis foram filtradas em filtro de membrana de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro.

A separação cromatográfica foi realizada à temperatura ambiente utilizando-se fluxo de 1mL/min. A programação do gradiente utilizado foi a seguinte:

- 0 min – 100% fase móvel A
- 9 min – 100% fase móvel A
- 10 min – 100% fase móvel B
- 35 min – 100% fase móvel B
- 36 min – 100% fase móvel A
- 50 min – 100% fase móvel A

A detecção da vitamina B<sub>5</sub> foi realizada em detector ultravioleta (UV) a 205 nm de comprimento de onda. O volume de injeção utilizado foi 20 µL e a vitamina foi

identificada por seu tempo de retenção e os cálculos foram realizados com as unidades de área dos picos, por comparação com padrão externo; os resultados foram emitidos em ácido pantotênico.

### Método microbiológico

O método microbiológico foi realizado segundo procedimento descrito pela Nestlé (2004). Após a extração os extratos da amostra e as soluções padrão foram diluídos em meio de cultura específico (Pantothenate Assay Medium DIFCO®). Depois da esterilização do meio de cultura contendo amostra ou padrão, foi realizada inoculação com *Lactobacillus plantarum* e os tubos foram incubados por uma noite a 37 °C.

Com o crescimento do microrganismo devido à presença da vitamina, o meio de cultura torna-se turvo e a absorvância deste meio é lida em espectrofotômetro a 375 nm. Por comparação com os valores obtidos para os padrões, o teor de ácido pantotênico na amostra pode ser calculado, levando-se em conta a diluição da amostra.

### Análise estatística

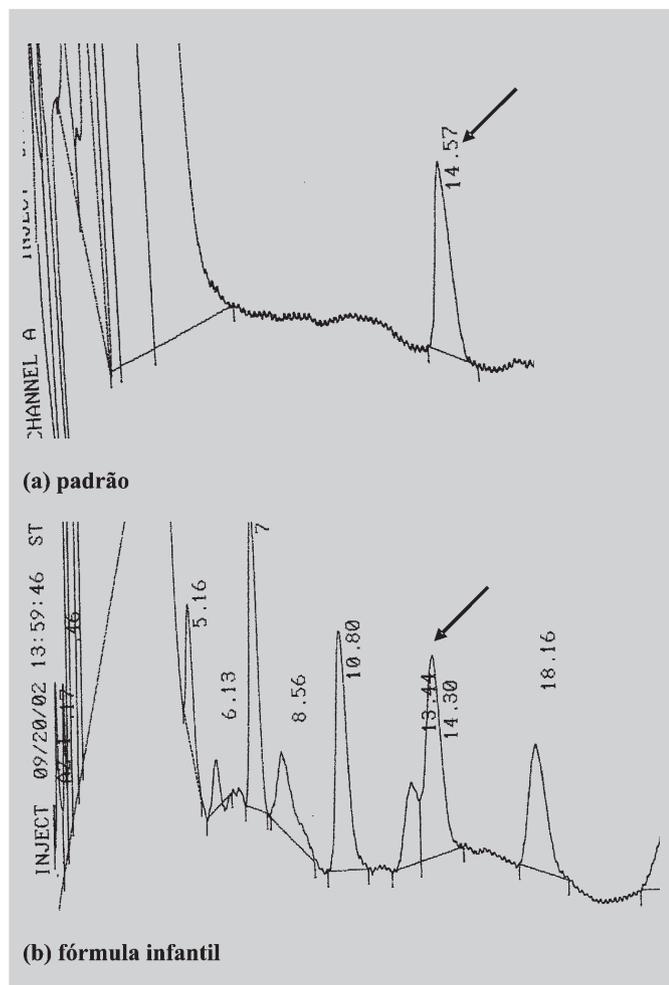
Para a verificação do método cromatográfico, foram avaliadas a precisão e exatidão realizando-se seis determinações em condições de repetibilidade em material de referência DDP. Para esta avaliação foram calculadas médias e desvios padrão dos dados obtidos. O limite de repetibilidade foi calculado como  $(2 \times 2^{1/2} \times \text{DP})$  onde DP = desvio padrão.

Na comparação de resultados obtidos pelos diferentes métodos, as amostras dos produtos foram analisadas pelo método cromatográfico e pelo método microbiológico. Estes resultados foram comparados utilizando-se a diferença entre eles. A média das diferenças de todos os pares foi calculada e foi aplicado o teste t-Student para verificação da existência de diferença estatística entre a média obtida e o valor zero (inexistência de diferença entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos). A correlação entre os resultados dos diferentes métodos foi avaliada utilizando-se o modelo de regressão linear (Girard, 2002).

## RESULTADOS

### Adaptação e verificação do método cromatográfico

A Figura 2 mostra um cromatograma de padrão e amostra obtido nas condições descritas no método original (Woolard *et al.*, 2000).



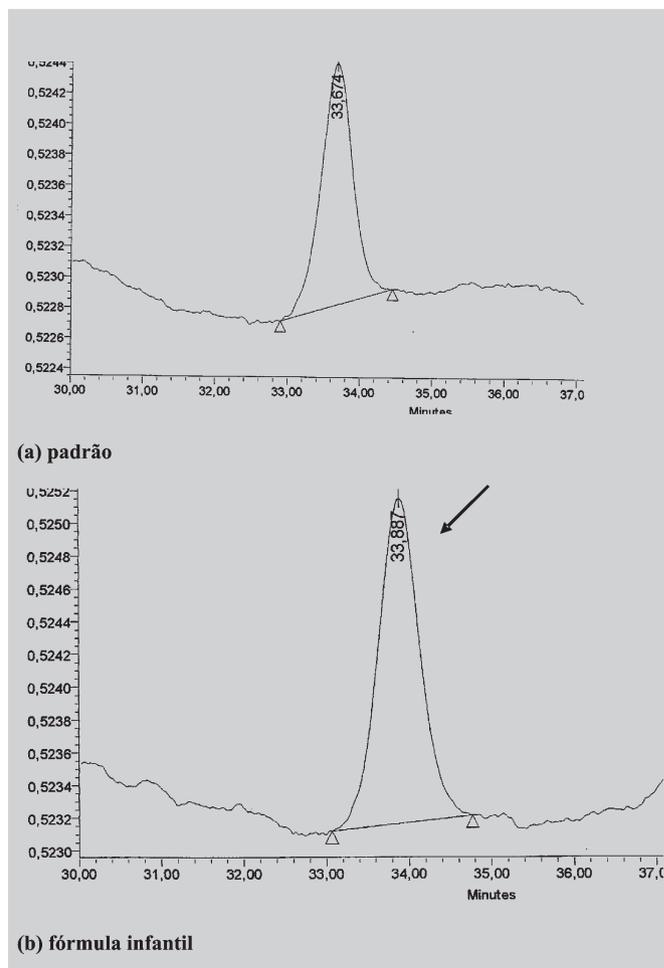
**FIGURA 2-** Cromatograma característico da análise de ácido pantotênico em (a) padrão e (b) amostra de fórmula infantil, segundo as condições propostas por Woolard *et al.* (2000).

### Análise cromatográfica

A Figura 3 mostra os cromatogramas obtidos nas condições otimizadas para a análise do ácido pantotênico em padrão e amostra de fórmulas infantis.

Os resultados obtidos para os materiais de referência utilizados para a verificação da exatidão e precisão do método encontram-se na Tabela I.

Os resultados obtidos pelos dois métodos de análise



**FIGURA 3 -** Cromatograma característico da análise de ácido pantotênico em (a) padrão e (b) amostra de fórmula infantil, segundo as condições otimizadas.

encontram-se na Tabela II. Esses resultados foram obtidos analisando-se 17 amostras que representam quatro produtos lácteos com diferentes formulações, sendo que cada amostra individual foi analisada pelos dois métodos, em duplicata.

A Figura 5 mostra os gráficos da diferença e de correlação entre os resultados obtidos pelo método microbiológico e o método cromatográfico.

### DISCUSSÃO

**TABELA I -** Resultados obtidos para ácido pantotênico em materiais de referência

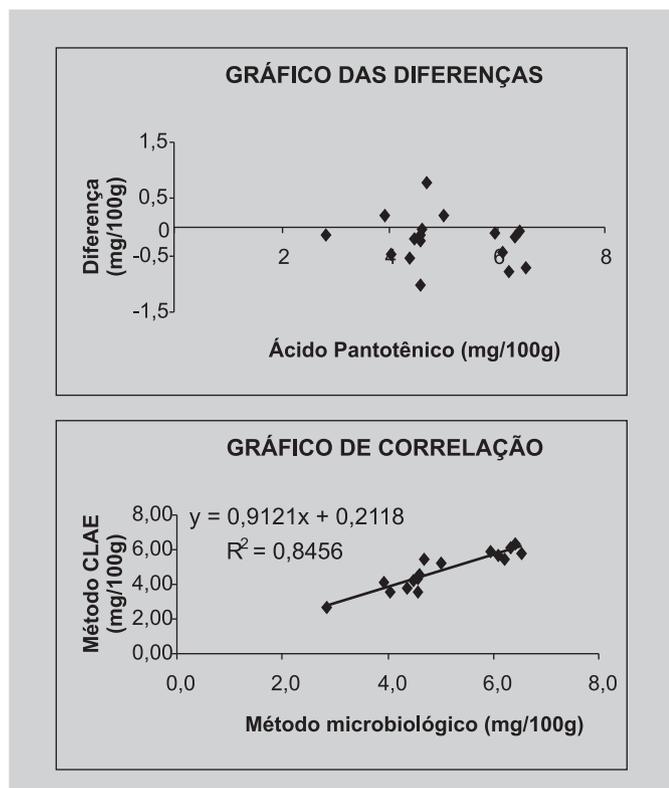
Material de Referência	Ácido Pantotênico (mg/100g)*	Exatidão
DDP 4/01 - Valor Referência = 3,87 mg/100 g	3,12 ± 0,12	81%
DDP 4/02 - Valor Referência = 5,04 mg/100 g	4,25 ± 0,17	84%

\* média ± desvio padrão de seis determinações

**TABELA II** - Resultados obtidos para ácido pantotênico pelo método CLAE e microbiológico

Produtos	Ácido Pantotênico*(mg/100g)	
	Método Microbiológico	Método CLAE
Fórmula infantil em pó	4,59	4,56
	5,01	5,20
	5,96	5,85
	4,03	3,56
	4,58	4,43
	4,58	3,57
	4,36	3,80
	4,47	4,25
	3,92	4,14
	2,83	2,71
	4,58	4,33
	6,54	5,83
	6,10	5,65
	6,43	6,37
	6,21	5,43
6,32	6,15	
4,69	5,48	

\* média de duplicatas



**FIGURA 5** - Gráfico das diferenças e da correlação entre resultados de ácido pantotênico obtidos pelo método microbiológico e CLAE.

Utilizando-se as condições cromatográficas propostas por Woolard *et al.* (2000) não foi possível a adequada separação do ácido pantotênico nas amostras, conforme indicado na Figura 2b.

Após avaliações de diferentes fases móveis e condições cromatográficas, decidiu-se utilizar a cromatografia em gradiente com fases móveis em diferentes pHs conforme descrito no item material e métodos. A melhor separação pode ser visualizada na Figura 3b

Após a adaptação da metodologia por cromatografia líquida pode ser observado que o método proposto apresenta uma adequada exatidão (aproximadamente 85% de recuperação no material de referência – Tabela I) e boa precisão (limite de repetibilidade = 10% - Tabela I)

O método cromatográfico modificado mostrou-se adequado para a análise das fórmulas infantis enriquecidas com ácido pantotênico. A comparação estatística deste método com o método microbiológico, atualmente aceito como oficial para esta vitamina, mostrou que os resultados são equivalentes. A avaliação estatística mostra que a diferença média obtida não é significativamente diferente de zero ( $-0,17 \pm 0,394$  mg/100g) e o modelo linear mostra boa correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos (coeficiente de determinação = 0,8467).

Mittermayr *et al.* (2004) compararam o mesmo método microbiológico com o de cromatografia líquida com detecção de massas, analisando alimentos fortificados e concluíram que os dois métodos foram também equivalentes.

## CONCLUSÕES

O método de determinação de ácido pantotênico por CLAE produz resultados que podem ser considerados estatisticamente iguais aos obtidos pelo método microbiológico, podendo ser recomendado como método de rotina para o controle de qualidade de alimentos enriquecidos com o ácido pantotênico.

## ABSTRACT

### Comparison of methods for pantothenic acid analysis in foods

*The analysis of pantothenic acid in foods is routinely performed by microbiological methods, which are very tedious and take too long time of well-trained and experienced analyst. The high performance liquid chromatography (HPLC) is an alternative technique for vitamin analysis in foods. In this paper infant formulae*

were analyzed by HPLC and microbiological methods and the average results obtained were compared statistically. The difference between the two methods showed no statistical difference.

UNITERMS: *Panhotenic acid. Vitamin B5. Food/analysis.*

## AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao Centro Nestlé de Garantia da Qualidade – São Paulo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Ácido pantotênico. In: PENTEADO, M.V.C. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. Barueri: Manole, 2003. cap.12, p. 465-481.
- BENDER, D.A. Optimum nutrition: thiamin, biotin and pantothenate. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 58, p.427-433, 1999.
- FOX, H.M. Pantothenic acid. In: MACHLIN, J. *Handbook of Vitamins*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1990. cap.11, p.437-458.
- GIRARD, P. User Guide of ESTER 2.0., Lausanne: Nestlé Research Center, 2002. 150 p.
- MITTERMAYR, R.; KALMAN, A.; TRISCONI, M.J.; HEUDI, O. Determination of vitamin B<sub>5</sub> in a range of fortified food products by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. *J. Chromatogr. A*, v.1032, p.1-6, 2004.
- NESTLÉ Co. *Pantothenic acid by microbiological assay*. Lausanne: Nestlé Research Center, 2005. 19 p.
- OTTAWAY, P.B. *The technology of vitamins in food*. London; New York: Blackie Academic & Professional, 1993. 265p.
- PAKIN, C.; BERGAENTZLÉ, M.; HUBSCHER, V.; AOUDÉ-WERNER, D.; HASSELMANN, C. Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization. *J. Chromatogr. A*, v. 1035, p. 87-95, 2004.
- ROMERA, J.M.; RAMIREZ, M.; GIL, A. Determination of pantothenic acid in infant formulas by high performance liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.523-526, 1995.
- SMITH, C.M.; SONG, W.O. Comparative nutrition of pantothenic acid. *Nutr. Biochem.*, v.7, p.312-321, 1996.
- SONG, W.O. Pantothenic acid : how much do we know about this B-complex vitamin ? *Nutr. Today*, v.25, p.1-5, 1990.
- WOOLARD, D.C.; INDYK, H.E.; CHRISTIANSEN, S.K. The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chem.*, v. 69, p.201-208, 2000.

Recebido para publicação em 23 de novembro de 2005.  
Aceito para publicação em 17 de abril de 2007.