



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Pedro Ivo Pinheiro Fuchs

Determinação de ácido fólico em suplemento alimentar por microextração líquido-
líquido dispersiva com solvente eutético profundo

Florianópolis

2024

Pedro Ivo Pinheiro Fuchs

Determinação de ácido fólico em suplemento alimentar por microextração líquido-líquido dispersiva com solvente eutético profundo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos
Orientadora: Profa. Vívian Maria Burin Dra.

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fuchs, Pedro Ivo Pinheiro

Determinação de ácido fólico em suplemento alimentar
por microextração líquido-líquido dispersiva com solvente
eutético profundo / Pedro Ivo Pinheiro Fuchs ;
orientadora, Vivian Maria Burin, 2024.

144 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Ácido fólico. 3. Solvente
eutético profundo. 4. Microextração líquido-líquido
dispersiva. 5. Espectrofotometria. I. Burin, Vivian Maria.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Pedro Ivo Pinheiro Fuchs

Determinação de ácido fólico em suplemento alimentar por microextração líquido-líquido dispersiva com solvente eutético profundo

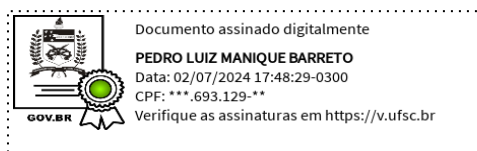
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 16 de abril de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Ana Carolina de Oliveira Costa Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

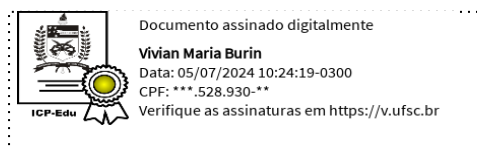
Profa. Isabela Maia Toaldo Fedrigo Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luciano Vitali, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos



Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto
Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Profa. Vívian Maria Burin Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho ao meu Parceiro Aloísio, sem o qual este trabalho não teria sido concluído e a mim mesmo, por ter tido a coragem de encarar esta jornada e por todo o esforço aplicado em concluir o projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Marilú e Osni, por me colocarem no caminho do estudo, pelos esforços que fizeram para que eu pudesse ocupar este espaço e por me inspirarem a seguir sempre em frente.

Ao meu parceiro de vida, Aloísio, que esteve comigo em todos os momentos deste trabalho, me guiando pelo caminho, compartilhando conhecimento, me desafiando a ultrapassar obstáculos e destruir barreiras além de manter a minha xícara de café sempre cheia e simplesmente por acreditar em mim.

À Professora Dra. Vívian, a qual aceitou a tarefa de me orientar, me colocar nos eixos quando eu precisei e por permitir que trilhasse esse caminho junto dela. Foi um orgulho ter tido a sua orientação.

À Denise, colega de trabalho e Gerente de Meio Ambiente e Produtos do Lacen/SC, por todo apoio durante a realização deste trabalho, por ouvir as minhas frustrações e alegrias durante o decorrer da pesquisa.

À Diretora do Lacen/SC, Marlei, por ter colaborado para que eu embarcasse nessa jornada.

As colegas da UO SERAM Criciane, Inês, Ivanilda, Rita, Pamela, Francine, Gisele e Neusa, que acompanharam de perto esta jornada e me incentivaram muito a nunca desistir.

Aos colegas do Laboratório de Físico-química de Medicamentos do Lacen/SC Amistron, Andréia, Alessandra Schinaider, Alessandra Leite e Sandra, que acompanharam de perto os dias a fio que passei na bancada, pelos momentos de descontração e pelas conversas que me ajudaram a compreender este trabalho (e por arrumar a bagunça que eu deixava no laboratório também).

À amiga Kida, por todas as palavras de incentivo, pela orientação, pela força e por acreditar em mim.

A toda a equipe do Lacen/SC que de uma forma ou outra contribuiu para a realização deste trabalho, em especial a equipe de segurança, que por noites e madrugadas intermináveis acompanharam a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do CAL/UFSC, obrigado pelo companheirismo.

Ao Luciano e estagiários do Laboratório de Bromatologia do CAL/UFSC pelo auxílio prestado.

Ao professor Dr. Eduardo Caraseck que doou o volume inicial do reagente que utilizei nos testes iniciais de extração com o DES.

Aos Professores e Mestres que durante a Pós-Graduação compartilharam de seus conhecimentos e tornaram esta etapa um desafio agradável de se cumprir.

À Universidade Federal de Santa Catarina por mais uma vez me abrigar durante mais estes últimos anos. Foi um prazer retornar à casa.

A todos que mesmo não mencionados foram importantes para a realização deste trabalho.

Science needs a solution for the temptation of positive results.

(Aaron E. Carroll, 2017, *The New York Times*)

RESUMO

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel que desempenha um papel biológico importante no metabolismo humano. Uma das estratégias de saúde pública utilizadas para garantir a ingestão de micronutrientes é a ingestão de ácido fólico na forma de suplementos alimentares. No Brasil o método oficial para suplementos alimentares contendo ácido fólico em comprimidos é o método cromatográfico, que embora apresente alta precisão e sensibilidade, tem elevado custo a alta produção de resíduos que impõem limitações socioeconômicas e ambientais. Neste trabalho foi desenvolvido um método para quantificação de ácido fólico em suplemento alimentar, norteado pelos parâmetros da química verde utilizando a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva com auxílio de agitação por vórtex, solvente eutético profundo a base de cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico e detecção por espectrofotometria UV-Vis. O meio de extração com solvente eutético profundo exibiu aumento da absorvidade molar do ácido fólico a 370 nm e aumento da sensibilidade analítica devido as propriedades de concentração do ácido fólico pelo solvente eutético profundo. O método desenvolvido apresentou faixa de trabalho de 1,0 a 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, coeficiente de correlação (r) de 0,9991, homocedasticidade avaliada pelo teste de Cochran e distribuição normal dos resíduos de acordo com o teste de Shapiro Wilk. A análise das variâncias entre as curvas com e sem matriz, pelo teste F , demonstrou a seletividade do método, por não haver efeito de matriz. O limite de detecção foi de 0,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o de quantificação foi de 0,79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores de exatidão variaram de 82 a 103 % e a precisão variou de 0,3 a 1,2 %. O método desenvolvido utilizando microextração líquido-líquido dispersiva com solvente eutético profundo apresentou recuperação relativa de 96,87% em comparação com o método de referência cromatográfico para análise de ácido fólico em suplemento alimentar e não apresentou diferença estatística quando verificado pelos testes F e t (*Student*) com 95% de confiabilidade. A ferramenta AGREE, permitiu classificar o método como verde estando em acordo com os princípios da química verde, sendo classificado como um método sustentável e de baixo risco para o meio ambiente e o analista.

Palavras-chave: ácido fólico; microextração líquido-líquido dispersiva; solvente eutético profundo

ABSTRACT

Folic acid is a water-soluble vitamin that plays an important biological role in human metabolism, especially during pregnancy, reducing the occurrence of congenital malformations related to the closure of the neural tube. One of the public health strategies used to ensure micronutrient intake is folic acid ingestion in the form of dietary supplements. In Brazil, the official method for food supplements in tablets containing folic acid is the chromatographic method which, although it has high precision and sensitivity, has a high cost and produces a lot of waste which imposes socio-economic and environmental limitations. In this work, a method was developed for the quantification of folic acid in dietary supplements, guided by the parameters of green chemistry using a vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction technique and a deep eutectic solvent based on trioctylmethylammonium chloride and isoamyl alcohol with detection by UV-Vis spectrophotometry. The extraction medium with deep eutectic solvent showed an increase in the molar absorptivity of folic acid at 370 nm and increased analytical sensitivity due to the concentration properties of folic acid by the deep eutectic solvent. The developed method showed a working range of 1.0 to 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a correlation coefficient (r) of 0.9991, homoscedasticity evaluated by the Cochran test and normal distribution of the residues according to the Shapiro Wilk test. The analysis of variance between the curves with and without the matrix, using the F -test, demonstrated selectivity of the method, as there was no matrix effect. The detection limit was 0.26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and the quantification limit was 0.79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Accuracy values ranged from 82 to 103 % and precision ranged from 0.3 to 1.2 %. The method developed using dispersive liquid-liquid microextraction with deep eutectic solvent showed a relative recovery of 96.87% compared to the chromatographic reference method for analyzing folic acid in dietary supplements and showed no statistical difference when verified by the F and t (*Student*) tests with 95% reliability. The AGREE tool allowed the method to be classified as green, in accordance with the principles of green chemistry, being classified as a sustainable method with low risk for the environment and the analyst.

Keywords: folic acid; dispersive liquid-liquid microextraction; deep eutectic solvent, UV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do ácido fólico com identificação das subunidades.....	26
Figura 2 – Estrutura química dos folatos	27
Figura 3 – Representação de um exemplo da interação intermolecular na formação de um DES	40
Figura 4 – Diagrama de fase sólido-líquido geral de uma mistura binária.....	41
Figura 5 – HBA e HBD comumente utilizados no preparo de DES	42
Figura 6 – Preparo do solvente eutético profundo.....	51
Figura 7 – Instrumentação utilizada no procedimento de microextração do ácido fólico com DES.....	52
Figura 8 – Diagrama de distribuição de microespécies de ácido fólico e constantes de dissociação	62
Figura 9 – Gráficos de solubilidade (A) e lipofilicidade (B) em função do pH para ácido fólico	63
Figura 10 – Espectro de absorção no UV-Vis da água, solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	65
Figura 11 – Espectro de absorção no UV-Vis de diferentes concentrações de ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio.....	66
Figura 12 – Espectro de absorção no UV-Vis de diferentes concentrações de ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	66
Figura 13 – Espectros de ordem zero e primeira derivada de ácido fólico 20,0 µg.mL ⁻¹ em solução tampão fosfato de sódio e potássio	68
Figura 14 – Espectros de ordem zero e primeira derivada de ácido fólico 20,0 µg.mL ⁻¹ em solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	69
Figura 15 – Curvas de calibração do ácido fólico em $\lambda_{\text{máx}} \pm 2$ nm em solução tampão fosfato de sódio e potássio (A) e solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ (B) em diferentes comprimentos de onda.....	72
Figura 16 – Gráfico de estabilidade do ácido fólico (20,0 µg.mL ⁻¹) em solução tampão fosfato de sódio e potássio (A) e solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ (B) em temperatura de 5 °C $\pm$ 3 °C e diferentes comprimentos de onda.....	75
Figura 17 – Aspecto do solvente eutético profundo preparado	77

Figura 18 – Espectro de absorção no UV-Vis do DES mostrando no detalhe os espectros do cloreto de triocetilmetilamônio (TOMAC) e álcool isoamílico	78
Figura 19 – Espectro de absorção no UV-Vis do metanol (A), acetonitrila (B) e de diferentes diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:12 (v/v) do DES em metanol (C) e em acetonitrila (D)	79
Figura 20 – Espectro de absorção UV mostrando a transferência de massa de álcool isoamílico da fase orgânica DES para a fase aquosa	80
Figura 21 – Espectros de absorção no UV-Vis para extração de ácido fólico (20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para os sistemas tampão fosfato de sódio e potássio/ metanol (A), tampão fosfato de sódio e potássio/ acetonitrila (B), solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} / metanol (C) e solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} / acetonitrila (D).....	82
Figura 22 – Espectros de absorção no UV-Vis das fases aquosas obtidas a partir da microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para o tampão fosfato de sódio e potássio (A), solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} (B) e espectro do álcool isoamílico em água	84
Figura 23 – Espectros de zero ordem e primeira derivada do ácido fólico (20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) extraído por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para os sistemas tampão fosfato de sódio e potássio/ metanol (A), tampão fosfato de sódio e potássio/ acetonitrila (B), solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} / metanol (C) e solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} / acetonitrila (D).....	85
Figura 24 – Gráfico de Pareto para a resposta do planejamento fatorial	89
Figura 25 – Curvas de calibração para ácido fólico extraído por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo em NaOH 0,1 mol.L^{-1} diluído 1:4 e 1:8 (v/v) em metanol (A) e acetonitrila (B) em comprimento de onda 370 nm $\pm$ 2 nm	90
Figura 26 – Espectros de absorção no UV-Vis para microextração de ácido fólico de suplemento alimentar com e sem DES e com adição de padrão de ácido fólico 1,0; 5,0; e 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	92

Figura 27 – Gráficos de resíduos para extração de ácido fólico sem matriz e diluição 1:4 (v/v) metanol (A), sem matriz e diluição 1:8 (v/v) metanol (B), com matriz e diluição 1:4 (v/v) metanol (C), com matriz e diluição 1:8 (v/v) metanol (D).....	96
Figura 28 – Gráficos das curvas sem e com matriz suplemento alimentar para extração de ácido fólico pelo sistema DES/NaOH, diluição 1:8 (v/v) em metanol.	97
Figura 29 – Etapas da extração de suplemento alimentar de ácido fólico por microextração líquido-líquido assistida por vórtex e solvente eutético profundo.....	99
Figura 30 – Diagrama de Ishikawa para identificação das fontes de incerteza para a determinação de ácido fólico	101
Figura 31 – Contribuições das fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição do método de microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para quantificação de ácido fólico em suplemento alimentar.....	104
Figura 32 – Resultados da análise pelo sistema métrico AGREE.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Limites máximos e mínimos de ácido fólico (μg) que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo por grupo populacional indicado pelo fabricante.....	32
Quadro 2 – Métodos de extração e quantificação de ácido fólico por espectrofotometria no UV-Vis.....	36
Quadro 3 – Propriedades físico-químicas de solventes eutéticos profundos hidrofóbicos	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas do ácido fólico	28
Tabela 2 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3 para otimização do experimento	53
Tabela 3 – Matriz octogonal do planejamento fatorial 2^3 para $k = 3$ fatores e $n = 8$ experimentos	54
Tabela 4 – Parâmetros de regressão linear para ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio	70
Tabela 5 – Parâmetros de regressão linear para ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	71
Tabela 6 – Valores encontrados para teste t pareado para os conjuntos $b_{\lambda \pm 2nm}$ e $b_{\lambda \pm 5nm}$, com nível de significância de 5% e 2 graus de liberdade	71
Tabela 7 – Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	73
Tabela 8 – Valores experimentais de absorvidade molar para ácido fólico	74
Tabela 9 – Recuperação (%) do ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ em temperatura de 5 °C $\pm$ 3 °C	76
Tabela 10 – Parâmetros de regressão linear para microextração líquido-líquido dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo, de ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio	86
Tabela 11 – Parâmetros de regressão linear para microextração líquido-líquido dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo de ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	87
Tabela 12 – Valores experimentais de absorvidade molar (ϵ em L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) para o ácido fólico extraído no sistema NaOH/DES a 370 nm $\pm$ 2 nm	88
Tabela 13 – Níveis reais e codificados das variáveis e respostas do planejamento fatorial 2^3	89
Tabela 14 – Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para extração de ácido fólico por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo em solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ e DES diluído em metanol basificado	91

Tabela 15 – Parâmetros das curvas de calibração externa de solução padrão de ácido fólico no sistema NaOH/DES; diluições 1:4 e 1:8 (v/v) de metanol	94
Tabela 16 – Parâmetros das curvas de calibração de solução padrão de ácido fólico no sistema NaOH/DES com matriz suplemento alimentar e diluições 1:4 e 1:8 (v/v) de metanol	95
Tabela 17 – Resultados para teste <i>F</i> e teste <i>t</i> das curvas de ácido fólico com e sem matriz	97
Tabela 18 – Resultados dos ensaios de exatidão e precisão	98
Tabela 19 – Resultados dos testes estatísticos aplicados à comparação dos métodos desenvolvido e referência para quantificação de ácido fólico em suplemento alimentar	100
Tabela 20 – Identificação de cada fonte de entrada e tipo de distribuição utilizada no cálculo de incerteza de medição.....	102
Tabela 21 – Valores de incerteza combinada, incerteza expandida, graus de liberdade efetivos e fator de abrangência.....	103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIAD	Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AF	Ácido fólico
AGREE	<i>Analytical Greenes Calculator</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Collaboration</i>
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DES	Solvente eutético profundo
DFE	Equivalente de Fosfato Dietético
DIVS/SC	Vigilância Sanitária do Estado de Santa Catarina
DLLME	Microextração Líquido-líquido dispersiva
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
HBA	Substância receptora de hidrogênio
HBD	Substância doadora de hidrogênio
HDES	Solvente eutético profundo hidrofóbico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Standard Organization</i>
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{máx}$	Comprimento de onda máximo
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo da constante de dissociação de um ácido
PNAN	Política Nacional de Alimentação e Nutrição
PteGlu	Ácido pteroilmonoglutâmico
RSD	Desvio padrão relativo

SD	Desvio padrão
TFSP	Solução tampão fosfato de sódio e potássio
TOMAC	Cloreto de trioctilmetilamônio
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UV-Vis	Ultravioleta – visível
V_{eff}	Graus de Liberdade efetivos
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS	25
1.1.1	Objetivo Geral	25
1.1.2	Objetivos Específicos	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	ÁCIDO FÓLICO	26
2.1.1	Ácido fólico e saúde humana	28
2.1.2	Valor diário recomendado	30
2.2	SUPLEMENTOS ALIMENTARES	31
2.3	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM SUPLEMENTO ALIMENTAR	34
2.3.1	Extração com solvente eutético profundo	40
2.4	AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	44
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	PADRÃO ANALÍTICO E REAGENTES	46
3.2	VIDRARIAS	46
3.3	INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS UTILIZADOS	46
3.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	47
3.4.1	Solução tampão fosfato de sódio 0,25 mol. L ⁻¹ e potássio 0,3 mol.L ⁻¹	47
3.4.2	Solução hidróxido de sódio 0,1 mol.L ⁻¹	47
3.4.3	Metanol basificado	47
3.5	ÁCIDO FÓLICO	47
3.5.1	Preparo do padrão de ácido fólico 100 µg.L ⁻¹	48
3.5.2	Caracterização das propriedades físico-químicas do ácido fólico através de simulação numérica	48
3.5.3	Caracterização do espectro de absorção molecular do ácido fólico...	48

3.5.4	Construção das curvas de calibração, avaliação de linearidade e limites de detecção e quantificação.....	49
3.5.5	Determinação experimental do coeficiente de absorvidade molar....	49
3.5.6	Avaliação da estabilidade do ácido fólico.....	50
3.6	SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (DES) A BASE DE CLORETO DE TRIOCTILMETILAMÔNIO E ÁLCOOL ISOAMÍLICO	50
3.6.1	Preparo do solvente eutético profundo.....	50
3.6.2	Caracterização das propriedades físico-químicas do DES.....	51
3.6.3	Caracterização do comportamento espectrofotométrico do DES	51
3.7	MICROEXTRAÇÃO DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE ÁCIDO FÓLICO ASSISTIDA POR AGITAÇÃO EM VÓRTEX COM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO	51
3.8	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	53
3.9	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO ANALÍTICO.....	54
3.9.1	Faixa de trabalho e linearidade	55
3.9.2	Seletividade.....	55
3.9.3	Limite de detecção e limite de quantificação.....	55
3.9.4	Exatidão.....	56
3.9.5	Precisão.....	56
3.9.6	Comparação com método referência	57
3.9.7	Incerteza de medição	58
3.10	AMOSTRA DE ÁCIDO FÓLICO UTILIZADA NO ESTUDO	58
3.11	VERIFICAÇÃO DO MÉTODO FRENTE AOS PARÂMETROS DA QUÍMICA VERDE	59
3.12	PRÉ PROCESSAMENTO DE DADOS.....	59
3.13	PÓS PROCESSAMENTO DE DADOS	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	ÁCIDO FÓLICO	61

4.1.1	Caracterização das propriedades físico-químicas do ácido fólico por simulação numérica	61
4.1.2	Caracterização espectrofotométrica.....	64
4.1.3	Avaliação da linearidade.....	70
4.1.4	Determinação dos coeficientes de absorvidade molar.....	73
4.1.5	Avaliação da estabilidade do ácido fólico.....	74
4.2	PREPARO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESPECTROFOTOMÉTRICA DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO ...	76
4.2.1	Preparo e caracterização físico-química	76
4.2.2	Caracterização do comportamento espectrofotométrico do DES e seus componentes	78
4.3	MICROEXTRAÇÃO DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE ÁCIDO FÓLICO ASSISTIDA POR AGITAÇÃO EM VÓRTEX COM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO	81
4.3.1	Planejamento fatorial (2^3).....	88
4.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO ANALÍTICO.....	91
4.4.1	Faixa de trabalho e linearidade	93
4.4.2	Seletividade.....	96
4.4.3	Limites de detecção e quantificação	98
4.4.4	Exatidão e precisão	98
4.4.5	Comparação entre o método desenvolvido e o método de referência	99
4.4.6	Incerteza de medição	101
4.5	VERIFICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO FRENTE AOS PARÂMETROS DA QUÍMICA VERDE	104
5	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS.....	108
	APÊNDICE A – RESULTADOS DE CÁLCULOS DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÁCIDO FÓLICO OBTIDAS PELOS PROGRAMA CHEMICALIZE	126

APÊNDICE B – EQUAÇÕES DOS COEFICIENTES DE SENSIBILIDADE E GRAUS DE LIBERDADE EFETIVOS PARA ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	136
ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO ÁCIDO FÓLICO – MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO	137
ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CLORETO DE TRIOCTILMETILAMÔNIO.....	143
ANEXO C – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO ÁLCOOL ISOAMÍLICO .	144

1 INTRODUÇÃO

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel utilizada na formulação de suplementos alimentares na forma isolada ou em associação a outros compostos bioativos (Thabet *et al.*, 2024). Dentre os principais problemas causados pela deficiência de ácido fólico estão más formações congênitas (Schettino; Ramos-Silva; Sarti, 2024).

Segundo a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN), a dieta do brasileiro é caracterizada pela alta ingestão de alimentos ultra processados, que se reflete no consumo diário de baixos teores de micronutrientes. A ingestão de suplementos alimentares contendo ácido fólico, é uma das estratégias de saúde que podem ser adotadas a fim de complementar as necessidades diárias de ingestão deste nutriente (Brasil, 2013). Nesse contexto, o Brasil por meio da Portaria n° 370, de 13 de maio de 2005 passa a adotar como estratégia de política pública de promoção e prevenção de agravos em saúde da população, a suplementação de ácido fólico para gestantes no período de gestação visando prevenir as doenças do tubo neural e a anemia (Ministério da Saúde, 2013). No ano de 2018 a Resolução – RDC n° 243 de 26 de julho de 2018 estabelece os requisitos sanitários para fabricação e comercialização de suplementos alimentares, que devem ser produzidos em formas farmacêuticas e determina requisitos de composição, qualidade e segurança (Brasil, 2018a).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais (ABIAD), o consumo de suplementos alimentares aumentou em 10% do ano de 2015 a 2020 e estão presentes em 59% dos lares brasileiros (Pesquisa [...], 2021).

As análises laboratoriais que visam verificar a qualidade de suplementos alimentares, que estão sujeitos à fiscalização sanitária, constituem ação estratégica para o controle sanitário e o gerenciamento de riscos à saúde (Brasil, 2017a). Existem poucos estudos publicados no Brasil com relação a eficácia e segurança na utilização de suplementos alimentares. A diretriz 8 da PNAN que busca fomentar a pesquisa, inovação e conhecimento em alimentação e nutrição visando a geração de evidências para a sua implementação, impulsiona o desenvolvimento de metodologias analíticas mais precisas para identificação e quantificação em suplementos alimentares de forma a contribuir para a melhoria das condições alimentares e nutricionais da população brasileira (Santos *et al.*, 2021).

Com relação à determinação de ácido fólico em suplementos alimentares, a Resolução – RDC n° 243, de 26 de julho de 2018 não estabelece um método oficial, mas determina que os constituintes ativos devem atender aos padrões de qualidade em acordo com a Farmacopeia Brasileira ou padrões publicados por outros órgãos oficiais. A Farmacopeia Brasileira utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção na faixa do ultravioleta (UV) para comprimidos de ácido fólico. Embora a técnica de HPLC apresente excelente precisão e robustez, ela apresenta complexidade de operação e um alto custo para as análises fiscais. Uma alternativa a utilização de cromatografia é a espectrofotometria, a qual requer menor tempo de análise, baixo consumo de solventes, baixa geração de resíduos contaminantes e, portanto, está alinhada aos princípios da química verde (Dong; Lianas, 2013; Gaber *et al.*, 2011; Gama *et al.*, 2019; Kannaiah *et al.*, 2021).

Diversos estudos têm sido realizados a fim de desenvolver e avaliar a utilização de métodos espectrofotométricos com UV-Vis em comparação aos métodos por HPLC, no intuito de disponibilizar metodologias mais simples para quantificação de ácido fólico em formas farmacêuticas (Ahmed; Khayoon, 2022; Nagaraja; Vasantha; Yathirajan, 2002; Ribeiro *et al.*, 2016).

O desenvolvimento dos métodos analíticos tem incorporado uma preocupação crescente com o desenvolvimento sustentável, preservação do meio ambiente, geração de menos resíduos e redução no consumo de energia. A química verde engloba estes princípios e diversas técnicas analíticas vem sendo desenvolvidas na tentativa de reduzir os riscos ambientais e humanos associados aos métodos de análises. A miniaturização de técnicas convencionais, como a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e o uso de solventes eutéticos profundos (DES) como alternativa aos solventes orgânicos convencionais são exemplos que despontam no desenvolvimento moderno da química verde (Armenta *et al.*, 2019; Cunha; Fernandes, 2018; Tobiszewski; Mechlińska; Namieśnik, 2010).

Com base no exposto, o presente trabalho visa desenvolver, otimizar e avaliar parâmetros analíticos de mérito de um método analítico para determinação de ácido fólico em suplementos alimentares utilizando microextração líquido-líquido dispersiva, solvente eutético profundo e quantificação por espectrofotometria no UV-Vis.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para determinação de ácido fólico em suplemento alimentar por espectrofotometria com o uso da técnica de microextração líquido-líquido dispersiva por solvente eutético profundo.

1.1.2 Objetivos Específicos

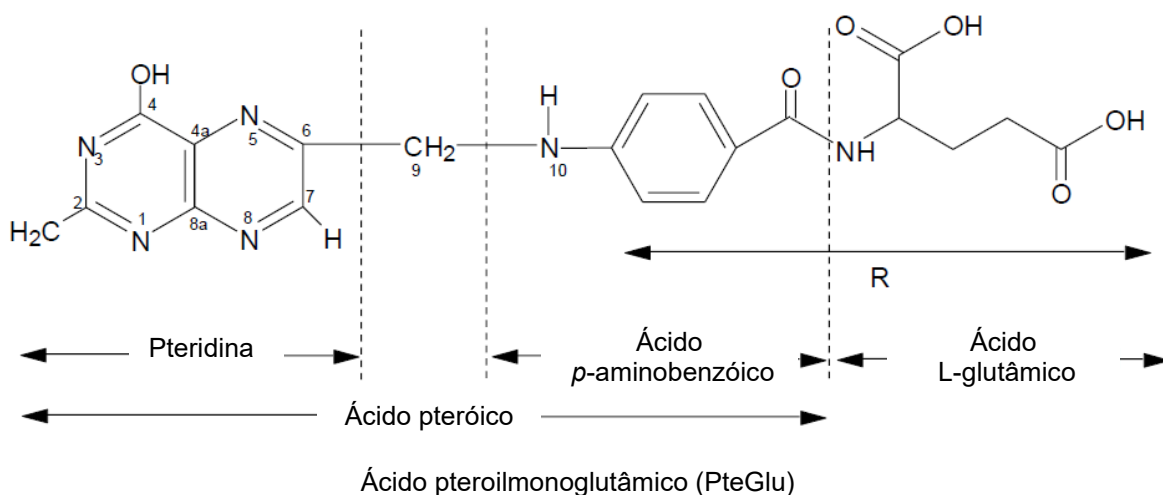
- Avaliar a estabilidade da solução de ácido fólico em diferentes tempos de armazenamento.
- Preparar e caracterizar um solvente eutético profundo à base de cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico.
- Verificar a influência de diferentes solventes, pH e volume de diluente na eficiência de extração do ácido fólico com solvente eutético profundo.
- Otimizar um método de microextração líquido-líquido dispersiva com solvente eutético profundo utilizando planejamento fatorial.
- Avaliar os parâmetros analíticos de mérito do método desenvolvido, como faixa de trabalho, linearidade, efeito de matriz, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e incerteza de medição.
- Comparar o método desenvolvido com o método da Farmacopeia Brasileira, por meio de avaliação de recuperação e tendência utilizando testes estatísticos t e F .
- Avaliar o método desenvolvido utilizando os princípios da química verde.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico (AF) (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também denominado de ácido pteroilglutâmico ou vitamina B₉ (Catharino, 2000), pertence ao grupo dos folatos, um grupo de compostos encontrados naturalmente em vegetais folhosos verde-escuros, fígado e gema de ovo (Bailey *et al.*, 2014; Karmin *et al.*, 2020; Nasser *et al.*, 2005) e que apresentam atividade biológica similar bem como uma estrutura química complexa e semelhante, caracterizada pela presença do ácido pteroilmonoglutâmico, o qual possui três subunidades básicas: pteridina, ácido *p*-aminobenzóico e ácido glutâmico (Figura 1) (Alaburda; Shundo, 2007). O termo ácido fólico é normalmente empregado para a forma oxidada da molécula e corresponde à espécie química sintética, utilizada comumente como suplemento alimentar (Marchetti *et al.*, 2014).

Figura 1 – Estrutura química do ácido fólico com identificação das subunidades

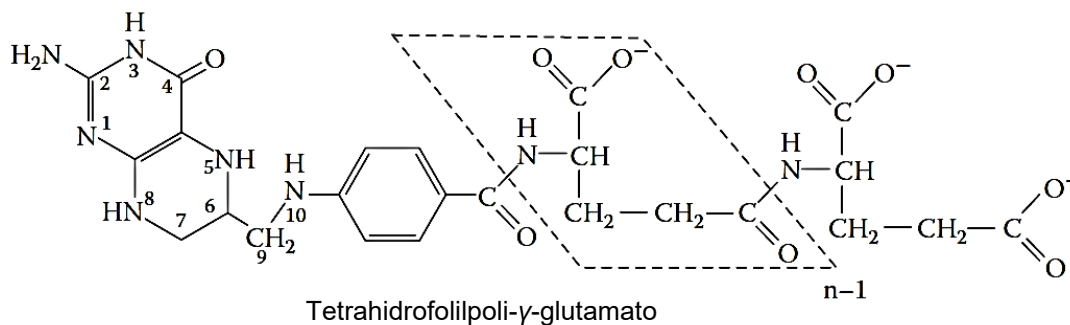


Fonte: adaptado de Wyk, Dolley e Mshicileli, (2014).

Nos alimentos, o ácido fólico ocorre naturalmente na forma de folatos (Figura 2), podendo apresentar até oito resíduos de ácido glutâmico ligados ao anel benzênico e entre si por ligações peptídicas, ligação de diferentes radicais metil, metileno ou formil nos nitrogênios N-5 e/ou N-10 e diferentes estados de redução do anel pirazina

da subunidade pteridina (Alaburda; Shundo, 2007; Combs; McLung, 2017; Shane, 2010).

Figura 2 – Estrutura química dos folatos



Fonte: adaptado de Shane (2010).

O ácido fólico apresenta baixa solubilidade em água, é insolúvel em etanol e solventes orgânicos menos polares como acetona e éter (Combs; McLung, 2017), no entanto apresenta alta solubilidade em soluções aquosas alcalinas ou ácidas (Alaburda; Shundo, 2007; Al-Shammary *et al.* (1990 *apud* Florey, 1990)). Wu *et al.* (2010) conduziram estudos de solubilidade do ácido fólico em água, em pH de 0 a 7 e diferentes temperaturas e concluíram que no geral o incremento da temperatura aumenta a solubilidade e que em condições de pH básico e fortemente ácido a solubilidade do ácido fólico se intensifica. Bottari *et al.* (2021) demonstram que as espécies químicas ácidas e básicas provenientes da desprotonação e/ou protonação dos grupos carboxílicos ou do nitrogênio do anel pteridínico em soluções aquosas apresentam solubilidade maior que a forma neutra. De acordo com Ball (1998) o ácido fólico é uma molécula anfótera e ionizável. Os grupos ionizáveis de relevância na faixa de pH dos alimentos estão localizados nas posições N-5 do tetrahydrofolato ($pK_a = 4,8$) e nos grupamentos carboxílicos do glutamato (γ $pK_a = 4,8$; α $pK_a = 3,5$). O ácido fólico apresenta sensibilidade a luz ultravioleta, oxigênio, calor (Chandra-Hioe; Bucknall; Arcot, 2017) e a pH extremos (Bailey *et al.*, 2014). Em temperatura de 100 °C e pH entre 5,0 e 12,0, o ácido fólico exibe maior estabilidade quando comparado a outros derivados de folatos. O ácido fólico sintético exibe maior estabilidade sob altas temperaturas e pH baixo que os folatos naturais, razão pela qual é utilizado em suplementação (Yaman *et al.*, 2021). Estudo realizado por Gazzali *et al.* (2016) demonstrou que o ácido fólico não sofre degradação até temperatura de 180 °C,

sendo que valores de pH mais elevados contribuem para maior estabilidade e que tanto os raios UVA quanto UVB promovem a degradação do ácido fólico.

Devido a presença de grupos fortemente cromóforos o ácido fólico apresenta um espectro de absorção característico, a subunidade de ácido p-aminobenzóico conjugada ao glutamato confere absorção nas faixas de 283 nm e 256 nm, enquanto a subunidade pteridina por conter dois anéis conjugados nitrogenados confere absorção máxima a 365 nm (Pérez, 2017). A Tabela 1 apresenta valores de absorbância para o ácido fólico.

Tabela 1 – Propriedades físicas do ácido fólico

Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Absorção máxima (nm)	Absortividade molar (ε)
441,1	256 ^a	49.171,5 ^a
	282 ^b	27.000 ^b
	284 ^a	49.744,8 ^a
	350 ^b	7.000 ^b
	365 ^a	17.684,1 ^a

Fonte: adaptado de Al-Shammary *et al.* (1990 *apud* Florey, 1990) e Combs e McLung (2017).

Legenda: A^{1%}_{1cm} - absorbância de uma solução de analito em concentração de 1% em caminho óptico de 1cm, a - Al-Shammary *et al.* (1990 *apud* Florey, 1990) em solução 0,1 mol.L⁻¹ NaOH, não especifica a unidade para os valores publicados, b - Combs e McLung (2017) não especificam o solvente utilizado para os valores publicados, nem unidades.

2.1.1 Ácido fólico e saúde humana

O ácido fólico atua no organismo humano, na forma de folatos como mediadores da transferência de unidades de carbono nas vias metabólicas, nas reações de produção de purinas, na biossíntese do nucleotídeo timidilato (Altundag; Çelebi-Saltik, 2021; Bailey *et al.*, 2014; House; Nichols; Rae, 2021; Karmin *et al.*, 2020; Lyon *et al.*, 2020; Stover, 2010; Stover; Fox, 2008), no metabolismo de aminoácidos como metionina, homocisteína, serina e glicina (Cai *et al.*, 2021) e como antioxidante (Asbaghi *et al.*, 2021; Taira, 2021; Taira; Takayuki, 2020). A diversidade de reações biológicas nas quais o ácido fólico participa demonstra que a sua deficiência implica em uma variedade de complicações, tais como, doença não alcoólica do fígado, doença vascular, dificuldades cognitivas e demência (Cai *et al.*, 2021).

Especialmente durante a embriogênese, a suplementação de ácido fólico desempenha papel crítico diminuindo o risco da ocorrência de defeitos no fechamento

do tubo neural, que podem levar ao aparecimento de espinha bífida e anencefalia (Korsmo; Jiang, 2021; Taira; Takayuki, 2020), logo a ingestão adequada deste nutriente antes e durante a gestação é crucial para o desenvolvimento saudável do feto (Bailey *et al.*, 2014; Chitayat, *et al.*, 2016; House; Nichols; Rae, 2021). Também, há um aumento no catabolismo do ácido fólico na mulher durante a gravidez, que pode induzir complicações como anemia megaloblástica e aumento dos níveis sanguíneos circulantes de homocisteína (Castaño-Moreno *et al.*, 2020). Não obstante, a suplementação durante a gestação, com ácido fólico acima dos níveis recomendados também pode ocasionar problemas neurológicos e metabólicos, como transtornos de espectro autista, convulsão, problemas de memória, risco aumentado de obesidade e resistência à insulina (Shulpekova *et al.*, 2021).

Neste contexto, no Brasil, a partir do ano de 2002, seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Panamericana da Saúde (OPAS) foi publicada a Resolução-RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 que tornou obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico a fim de diminuir a ocorrência de anemia ferropriva e patologias do tubo neural e da mielomeningocele. Com esta Resolução, ficou estabelecido o enriquecimento de ácido fólico de grau alimentício na concentração de 150 µg/ 100 g de farinha (BRASIL, 2002). A partir da publicação da Resolução-RDC nº 604, de 10 de fevereiro de 2022 ficaram estabelecidos os limites mínimo e máximo de ácido fólico em farinhas de trigo e milho, como sendo 140 µg/ 100 g e 220 µg/ 100 g, respectivamente, a ser adicionado na forma de ácido N-pterilglutâmico, e que deve ser mantido durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2022a).

Estudo epidemiológico realizado no Brasil revelou que entre os anos 2014 e 2018, cerca de 7 para cada 10.000 crianças nasceram com diagnóstico de espinha bífida, o que ainda representa uma alta prevalência desta condição (Campos; Souto; Machado, 2021). Outro estudo constatou que entre os anos 2000 e 2016 houve aumento de 50% na incidência de ocorrência de espinha bífida na região nordeste do Brasil (Ferreira *et al.*, 2019). Estudo conduzido em 2008 com 750 indivíduos no município de São Paulo revelou média de consumo de folatos igual a 375,8 µg/dia abaixo da recomendação diária recomendada de 400 µg/ dia para adultos (Steluti, 2014).

Pesquisas recentes apontam ainda outras atribuições para suplementação com ácido fólico como aumento da função cognitiva e redução da demência em idosos

(Li *et al.*, 2020; Soest *et al.*, 2021), redução do risco de doenças vasculares (Zamani *et al.*, 2023) e tratamento da disfunção erétil (Zhang *et al.*, 2021).

A utilização de suplementos alimentares, nos quais o ácido fólico está na forma sintética, é recomendada pois a biodisponibilidade do ácido fólico nesta forma é de 85% quando ingerido durante uma refeição e quando consumido isoladamente a biodisponibilidade pode atingir 100% (Caudill, 2010; Folate [...], 2022).

2.1.2 Valor diário recomendado

O folato total em alimentos é calculado através do valor em microgramas por dia de Equivalente de Folato Dietético (DFE), conforme a Equação 1 (*Institute of Medicine*, 2000). O folato total dos alimentos equivale ao folato na forma de pteroilglutamatos somado ao ácido fólico como ácido pteroilmonoglutâmico

$$\mu g \text{ de DFE} = \mu g \text{ de folato no alimento} + (1,7 \times \mu g \text{ de ácido fólico}) \quad (1)$$

onde:

DFE = Equivalente de Folato Dietético.

O *Institute of Medicine* (2000) e *World Health Organization* (WHO, 2001) recomendam ingestão de 400 µg/ dia em DFE para homens e mulheres adultos. Durante a gravidez e lactação esses valores são de 600 µg/ dia e 500 µg/ dia, respectivamente. No Brasil, o Valor Diário Recomendado estabelecido pela Instrução-Normativa nº 75 de 2018, em ácido fólico é de 240 µg/ dia para adultos, 360 µg/ dia para gestantes e 300 µg/ dia para lactantes (Brasil, 2020a).

Cabe ressaltar que a dificuldade em garantir uma dieta adequada, que contenha as quantidades ideais de macro e micronutrientes está ligada a situação socioeconômica de uma determinada população, limitando a capacidade de produção e de aquisição de alimentos bem como a questões culturais peculiares que restringem a oferta de alimentos (WHO, 2001). Uma das estratégias de saúde pública utilizadas para garantir a ingestão de micronutrientes além da fortificação de alimentos é a ingestão de ácido fólico na forma de suplementos alimentares (Brasil, 2013).

2.2 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Em 2013, a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN), estabeleceu como propósito a melhoria das condições de alimentação, nutrição e saúde da população brasileira. A promoção da alimentação adequada e saudável é uma das ações que integram as diretrizes da PNAN, cabendo tanto aos serviços de Atenção Básica quanto às Redes de Atenção à Saúde, incluindo os órgãos de vigilância sanitária, implementar ações que visam atender às deficiências nutricionais da população, mediante a suplementação de micronutrientes (Brasil, 2013).

A deficiência de micronutrientes ainda é mundialmente relacionada ao aparecimento de diversas doenças. No ano de 2015, mundialmente, foi observada a ocorrência de defeitos do tubo neural em cerca de 260.100 nascimentos, destes pelo menos 75% resultaram no óbito de crianças menores de 5 anos. Com base nestes dados, pesquisadores sugerem que muitos destes casos poderiam ter sido evitados com a administração de ácido fólico (Tong; Walker, 2021).

A partir de 2018, a Resolução-RDC n° 243, de 26 de julho de 2018, foi introduzida como novo marco regulatório, criando a categoria de suplementos alimentares (Brasil, 2022). A Resolução-RDC n° 243, determina os requisitos sanitários dos suplementos alimentares e os define como produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas e destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados (Brasil, 2018a).

Complementando a Resolução-RDC n° 243, em 27 de julho de 2018 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Instrução Normativa-IN n° 28 estabelecendo a lista de constituintes permitidos para os suplementos alimentares, bem como limites de uso, alegações autorizadas e requisitos de rotulagem (Brasil, 2018b). O uso de ácido fólico em suplementos alimentares foi autorizado nas formas químicas ácido N-pteróil-L-glutâmico e L-metilfolato de cálcio, sendo que os limites mínimos e máximos, diferem de acordo com o grupo populacional e podem variar de 22,5 a 1.281,5 Equivalentes de Folato Dietético, correspondentes respectivamente a 13,5 µg e 768,9 µg de ácido fólico, com exceção do grupo populacional de 0 a 11 meses, para o qual o uso de ácido fólico não é autorizado (Brasil, 2020b). O Quadro 1 apresenta os valores de ácido fólico permitido em suplementos alimentares de acordo com a legislação.

Quadro 1 – Limites máximos e mínimos de ácido fólico (μg) que devem ser fornecidos pelos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo por grupo populacional indicado pelo fabricante

Grupo	1 a 3 anos	4 a 8 anos	9 a 18 anos	≥ 19 anos	Gestantes	Lactantes
Valor mínimo	22,5	30	60	60	666,6	75
Valor máximo	350	466,6	602,3	1.281,5	1.138,3	1.162,3

Fonte: Brasil (2020).

No ano de 2020, uma pesquisa de mercado realizada pela ABIAD evidenciou aumento de 10% no consumo de suplementos alimentares pela população brasileira, em relação à pesquisa também realizada pela ABIAD no ano de 2015. A pesquisa abrangeu as cinco regiões do país, sendo 1006 entrevistados, 50% homens e 50% de mulheres, de 17 a 70 anos. O estudo ainda revelou que 59% dos domicílios brasileiros possuem, ao menos, uma pessoa consumindo suplementos, 49% do consumo não é indicado por profissional de saúde e dentre aqueles que já consumiam suplementos, 48% aumentaram o consumo durante o período de quarentena imposto pela pandemia de COVID-19 (Pesquisa [...], 2021).

Araújo (2019), realizou estudo verificando a adequação da rotulagem de suplementos alimentares comercializados no município de Lavras (MG), dentre eles 19 suplementos vitamínicos e minerais. Para o suplemento com ácido fólico 26,32 % apresentaram no rótulo valores acima do máximo permitido pela legislação e do total de amostras 76,19% apresentaram algum tipo de inadequação com relação à legislação. Santos *et al.* (2020) analisaram 40 rótulos de suplementos comercializados em Uberaba (MG) e encontraram irregularidades em 85% dos rótulos avaliados.

Outro estudo realizado em Campo Grande (MS), no qual foram analisados 130 rótulos de suplementos alimentares disponíveis em loja virtuais, evidenciou que 100% dos produtos avaliados apresentavam algum tipo de não atendimento à legislação brasileira (Arevalo; Sanchez, 2022).

Quanto a adequação da concentração real de vitaminas em suplementos alimentares comparada a declaração do rótulo, pesquisadores observaram divergências nas informações de diferentes suplementos. Tuna *et al.* (2023) afirmaram que de 17 suplementos de ácido ascórbico, avaliados em Istambul, na Turquia, o

conteúdo estimado de vitamina variou de 80 % a 126 % em 16 unidades, apenas em 1 unidade o conteúdo encontrado foi de 28 %. Em outro estudo realizado nos Estados Unidos, Abourashed, Roberson e Elsharkawy (2014); avaliaram 24 amostras de suplemento alimentar contendo cafeína, das quais 21 não continham declarado no rótulo o valor de cafeína. Dentre as 3 amostras que declararam o valor de cafeína, 2 apresentaram valor dentro da margem de $\pm 20\%$. No Brasil, Alencar *et al.* (2011) analisaram o teor de β -caroteno em cápsulas a base de *Spirulina* adquiridas em Fortaleza (CE). Das 7 marcas avaliadas, 1 não continha β -caroteno e os teores máximo e mínimo entre as marcas que continham β -caroteno variaram na ordem de dez vezes entre si.

Em consulta feita na página online da Diretoria de Vigilância Sanitária do Estado de Santa Catarina (DIVS/SC), com respeito aos alertas sanitários emitidos tanto pela ANVISA, quanto pela DIVS/SC, é possível verificar que no período de 01 de janeiro de 2023 a 20 de dezembro de 2023 houve 63 Comunicações de Risco envolvendo suplementos alimentares, ocasionando desde a suspensão de fabricação e recolhimento de lotes, à proibição de comercialização dos suplementos. Destas, 22 comunicações revelaram que os suplementos continham substâncias não permitidas pela legislação, como ácido docosahexaenóico obtido de óleo de alga *Schizochytrium* sp, catalase, metilsulfonilmetano ou ingredientes não permitidos para bebês e crianças abaixo de 3 anos ou ainda matéria prima de origem de fertilizante (sulfato de zinco). Foi constatada falsificação de produtos em 15 ocorrências envolvendo, entre outras substâncias, metilfolato, ômega-3 e creatina. Sete dos comunicados não atenderam ao padrão de qualidade e em 3 deles foi relatado valores de vitaminas acima do permitido pela legislação (Alertas [...], 2023).

Em uma revisão geral acerca da utilização de suplementos alimentares, Djaoudene *et al.* (2023) relataram que a expansão do uso de suplementos alimentares vem despontando como uma questão de saúde pública. Os autores afirmam que os países devem desenvolver estratégias de gerenciamento no uso de suplementos, considerando nos debates questões como eficácia e segurança, uso de metodologias apropriadas para identificação e quantificação dos ativos, contaminantes e adulterantes.

No Brasil ainda são poucos os estudos publicados com relação a eficácia e segurança na utilização de suplementos alimentares. Portanto as ações de controle e regulação de alimentos estabelecidas pela diretriz 7 da PNAN vêm de encontro a

atuação dos órgãos públicos que atuam no sistema de vigilância em saúde, seja através das ações promovidas por órgãos reguladores, vigilâncias sanitárias ou pelos laboratórios de saúde pública. O fomento à pesquisa, inovação e conhecimento em alimentação e nutrição conforme definido na diretriz 8 da PNAN visa contribuir para gerar evidências para a implementação da PNAN. Desse modo, o desenvolvimento de metodologias analíticas mais exatas e precisas para identificação e quantificação em suplementos alimentares pode contribuir para a melhoria das condições alimentares e nutricionais da população brasileira (Santos *et al.*, 2021).

Visando atender as demandas dos programas de monitoramento e garantir o cumprimento da legislação, os métodos analíticos empregados para o monitoramento da qualidade de suplementos alimentares devem ser reconhecidos internacionalmente e validados (Brasil, 2003), e o monitoramento deve ser realizado pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública integrantes do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2017a).

2.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM SUPLEMENTO ALIMENTAR

Os métodos analíticos utilizados na determinação de micronutrientes devem ser sensíveis, precisos e confiáveis, a fim de avaliar os valores declarados nos rótulos, seja para o atendimento a demandas legais ou aos requerimentos nutricionais (Fatima *et al.*, 2019).

Para suplementos alimentares a base de ácido fólico, a legislação nacional especifica que os ingredientes que são fontes de nutrientes devem atender aos padrões de qualidade especificados pela Farmacopeia Brasileira ou publicações de outros órgãos internacionais como o *Codex Alimentarius*, Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre aditivos alimentares, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, entre outros (Brasil, 2018a). A Farmacopeia Brasileira especifica os requisitos de qualidade para a forma farmacêutica comprimidos de ácido fólico, sendo a metodologia utilizada para identificação e quantificação da vitamina, extração sólido líquido com hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹, quantificação por HPLC e detecção por ultravioleta em comprimento de onda de 283 nm (ANVISA, 2019). Cabe ressaltar que, para formas farmacêuticas diferentes de comprimidos, utilizadas na produção de suplementos alimentares de ácido fólico, é necessário que seja realizada validação do método analítico (Brasil, 2017b). A garantia da confiabilidade analítica

de métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório pode ser alcançada pelo planejamento de uma validação intralaboratorial conduzida por laboratório que atenda aos sistemas internacionais de gestão da qualidade e assegure competência técnica (Boison, 2016).

A extração é uma parte do preparo da amostra que desempenha um papel fundamental na análise, podendo abranger aspectos de pré-tratamento, limpeza, concentração do analito e derivatização (Tang; Zang; Lee, 2015). O processo de extração consiste basicamente na utilização de técnicas de separação de um analito de uma matriz e de seus interferentes, a fim de tornar o analito disponível para a análise (Raynie, 2006). Assim, para que ocorra a extração é necessário que haja intumescimento da matriz e/ou dissociação do complexo matriz-analito, possibilitando que ocorra a partição do analito para a fase extratora (Pawliszyn, 1995).

Em referência as técnicas de extração aplicadas para o ácido fólico contido em formas farmacêuticas por espectrometria no UV-Vis (Quadro 2), Ribeiro *et al.* (2016) utilizaram diferentes solventes em amostras de comprimidos e cápsulas de ácido fólico empregando a técnica de extração sólido líquido e obtiveram resultados de recuperação quando utilizado hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, na ordem de 100 a 104 % utilizando a primeira derivada ($393 \pm 10 \text{ nm}$), resultado melhor que o obtido com a análise em ordem zero que foi 90 a 94 % de recuperação. Os autores ainda observaram maior seletividade do método quando utilizada a avaliação pela primeira derivada. Kayan e Hemn (2022) utilizaram solução de tampão fosfato de sódio e potássio monobásico ($\text{pH} = 7$) para extração de ácido fólico e ácido ascórbico em comprimidos. O ácido fólico foi diferenciado do ácido ascórbico a 256 nm utilizando a primeira derivada, coeficiente de correlação (r) de 0,9998 e recuperação de 99,4 %. Elkhazein *et al.* (2022) aplicaram a técnica de extração sólido líquido com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para extração de comprimidos de ácido fólico e obtiveram valores de recuperação de $100 \% \pm 0,2 \%$ e coeficiente de determinação (r^2) de 0,999.

Quadro 2 – Métodos de extração e quantificação de ácido fólico por espectrofotometria no UV-Vis

Referências	Matriz	Preparo da amostra	λ (nm)
Ribeiro <i>et al.</i> (2016)	Comprimidos e cápsulas	Extração sólido líquido; NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ , Na ₂ CO ₃ 0,27 mol.L ⁻¹ , HCl 3,0 mol.L ⁻¹	393
Elkhazein <i>et al.</i> (2022)	Comprimidos	Extração sólido líquido; NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	255
Kayan e Hemn (2022)	Comprimidos	Extração sólido líquido; tampão fosfato de sódio e potássio monobásico (pH = 7)	256
Matias <i>et al.</i> (2014)	Comprimidos	Extração sólido líquido; tampão NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 0,1 mol.L ⁻¹ (pH = 9)	282,5
Nagaraja, Vasantha e Yathirajan (2002)	Comprimidos	Extração sólido líquido; NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ , redução com zinco em meio ácido Reação colorimétrica com iminodibenzil e ácido sulfanílico Reação colorimétrica com 3-aminofenol e ácido sulfanílico Reação colorimétrica com pirocatecol e molibdato de sódio	580 460 490
Nghia, Huy e Lee (2020)	Comprimidos	Extração sólido líquido; tampão PBS Reação colorimétrica com rodamina-B e íons Cu(II)	505
Najm <i>et al.</i> (2022)	Comprimidos	Extração sólido líquido; NaOH 2,0 mol.L ⁻¹ Reação colorimétrica com fenantrolina e cloreto férrico a 25 °C Reação colorimétrica com ninidrina e NaHCO ₃ a 97 °C	505 575
Shishehbore, Sheibani e Haghdoost (2011)	Comprimidos	Extração sólido líquido; NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ e sonicação, reação colorimétrica com tionina e bromato de potássio	601
Gürkan e Altunay (2016)	Comprimidos	Extração assistida por ultrassom; NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ ; extração em meio difásico composto por íons prata, brometo de cetiltrimetilamônio e éter de monoalquil polietilenoglicol	540
Ahmed e Khayoon (2022)	Solução de ácido fólico, comprimidos, xarope e semente de linhaça	Microextração líquido-líquido dispersiva e reação colorimétrica; 2-naftoquinona-4 sulfonato, etanol, clorofórmio e Triton x-14	520
Modupe, Maurras e Diosady (2020)	Sal fortificado com ácido fólico	Extração sólido líquido; NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	285

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: λ - comprimento de onda.

Matias *et al.* (2014) utilizaram extração com tampão fosfato 0,10 mol.L⁻¹ (pH = 9) seguido de leitura em espectrofotômetro na faixa de absorção máxima de 282,5 nm. Os autores relataram excelente concordância dos parâmetros avaliados na validação em relação ao método de referência baseado em HPLC. A recuperação variou de 100,6 % a 101,1 % e os coeficientes de variação (RSD %) entre 0,4 % e 1,5 %, quando aplicado a amostras reais de comprimidos.

Técnicas de preparo de amostra envolvendo reações de acoplamento foram descritas para identificação de ácido fólico em comprimidos por Nagaraja, Vasantha e

Yathirajan (2002). Os autores testaram 3 diferentes reagentes (iminodibenzil, 3-aminofenol e pirocatecol) em meio ácido para reação com ácido fólico e obtiveram coeficientes de correlação (r) de 0,998, 0,996 e 0,999 respectivamente e recuperação que oscilou de 99,4 % a 100,7 %. Nghia, Huy e Lee (2020) desenvolveram um método colorimétrico para quantificação de ácido fólico por UV-vis. O método empregou reagente derivativo a base de rodamina-B e íons Cu(II) que na presença de ácido fólico produzem coloração rósea. O método foi testado em comprimidos de ácido fólico e apresentou recuperação de 99 % a 102 %, RSD < 2 % e limite de detecção de 22 nmol.L⁻¹. Najm *et al.* (2022) extraíram ácido fólico a partir de comprimidos utilizando solução de NaOH (2 mol.L⁻¹) e utilizaram dois métodos para reação colorimétrica, mediante reação com fenantrolina/cloreto férrico e leitura a 505 nm e reação com a ninidrina com leitura a 575 nm. Os autores obtiveram valores de coeficiente de correlação de 0,9988 e 0,9979 e recuperação (%) de 98,3 a 101,5 e 100,5 a 102,2, respectivamente, quando testadas amostras comerciais de comprimidos de ácido fólico.

Shishehbore, Sheibani e Haghdost (2011) aplicaram técnica de espectrofotometria cinética para determinação de ácido fólico em comprimidos, urina e soro. As amostras foram preparadas com o corante tionina e bromato de potássio em meio ácido. A diferença entre a cinética de reação do ácido fólico e da tionina com o bromato, com leitura em comprimento de onda de 601 nm, foi utilizada para quantificar o ácido fólico. O método desenvolvido apresentou duas faixas de linearidade, e coeficientes de determinação de 0,995 e 0,998. Quando aplicado a amostras reais de comprimidos de 1,0 mg e 5,0 mg os coeficientes de variação (RSD %) foram iguais 2,04 e 1,37, respectivamente.

Gürkan e Altunay (2016) empregaram extração assistida por ultrassom em diversas matrizes, incluindo comprimidos de ácido fólico. A técnica aplicada consistia em uma primeira extração sólido líquido utilizando hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹, seguida de adição de um meio complexante composto por íons prata, brometo de cetiltrimetilamônio e éter de monoalquil polietilenoglicol e agitação por ultrasonicação. A fase sobrenadante foi recolhida e o resultado foi obtido por espectrofotometria a 540 nm. O método apresentou um coeficiente de correlação (r) de 0,9953, fator de enriquecimento de 85 e recuperação de 93,2 % a 103,2 % para comprimidos de ácido fólico.

Extração sólido líquido com solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para extração de ácido fólico também foi avaliada por Modupe, Maurras e Diosady (2020) em amostras de sal fortificado com ácido fólico seguido de leitura em espectrofotômetro UV-Vis. Os autores encontraram valores máximos de absorção em 256 nm, 283 nm e 366 nm em solução $25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido fólico. A escolha do comprimento de onda de 285 nm para a validação foi justificada pela interferência dos compostos pteridina, ácido pteróico e vitamina B₁₂, os quais podem ser interferentes do método. A recuperação encontrada foi de $100 \% \pm 1,8 \%$.

A maioria dos métodos apresentados (Quadro 2) empregam extração sólido-líquido com solventes alcalinos. Alguns utilizam análise de derivadas como método de avaliação dos espectros e outros ainda empregam reações de acoplamento e derivatização a fim de obter um espectro de absorção livre de interferentes na região do visível. A literatura apresenta poucos dados com respeito a técnicas que empregam microextração de ácido fólico em formas farmacêuticas com detecção por espectrofotometria UV-Vis.

Estudo realizado por Ahmed e Khayoon (2022) utilizou microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para extração de ácido fólico em comprimidos, xaropes e amostras de linhaça com detecção em espectrofotômetro UV-Vis. As amostras foram inicialmente diluídas em solução alcalina de bicarbonato de sódio $0,1 \text{ mol.mL}^{-1}$ e então a DLLME foi conduzida adicionando-se 2-naftoquinona-4 sulfonato seguida por adição de uma mistura de 1 mL de etanol e 400 μL de clorofórmio que foi rapidamente misturado com a amostra. Logo após foi adicionado 500 μL de Triton X-14 resultando em uma dispersão de gotículas. Após centrifugação o sobrenadante foi recolhido e a absorbância medida a 520 nm. A formação de coloração avermelhada na solução é resultante da reação entre o ácido fólico e 2-naftoquinona-4 sulfonato. Os resultados demonstraram linearidade satisfatória, coeficiente de correlação de 0,9997 e recuperação de 96,16 % a 99,84 % para as amostras de formas farmacêuticas.

Técnicas de extração baseadas na química verde foram empregadas para determinação de ácido fólico por Faraji, Mahmoodi-Maymand e Dastmalchi (2020) e Nojavan *et al.* (2015) que demonstraram que a DLMME utilizando pareamento iônico e solvente eutético profundo, respectivamente, são técnicas verdes aplicáveis a quantificação de ácido fólico com quantificação por HPLC.

A DLLME é uma modificação da extração líquido-líquido que emprega um sistema ternário como solvente e que pode ser aplicado para a extração de diversos

compostos. A técnica foi empregada para extração de vitaminas hidrossolúveis de matrizes alimentares complexas, tal como tiamina utilizando acetonitrila como solvente dispersivo e cloroetano como solvente extrator (Fatima *et al.*, 2019). A DLLME é fundamentada na extração de um ou mais analitos pela microemulsão de um extrator. Normalmente a fase extratora é composta por um solvente mais denso que a água. Recentemente a utilização de solventes menos tóxicos como líquidos iônicos ou solventes eutéticos profundos vem sendo difundida devido a emergência dos princípios da química verde. A extração ainda pode ser assistida por ultrassom, vórtex ou ar a fim de aumentar a eficiência da extração dos analitos (Dmitrienko *et al.*, 2020) ou em substituição ao solvente dispersor (Carasek, Scur e Bernardi, 2023).

Nojavan *et al.* (2015) desenvolveram técnica baseada em pareamento iônico com microextração líquido-líquido dispersiva combinada a HPLC-UV para extração de ácido fólico e outros 4 folatos em farinha de trigo, gema de ovo e suco de laranja. O surfactante cloreto de *N*-metil-*N,N*-dioctiloctano-1-amônio foi utilizado como pareador iônico e 1-octanol como solvente. Foram avaliadas e otimizadas as variáveis que afetam o rendimento da extração como volume do solvente extrator e do solvente dispersante, concentração do surfactante, pH da amostra e efeito de sal. Os resultados obtidos na validação analítica demonstraram que a recuperação dos analitos variou de 98 % a 102 %, ausência de efeito de matriz e baixo limite de quantificação, sendo aplicável para determinação da concentração de 50 ng.g⁻¹ de folato.

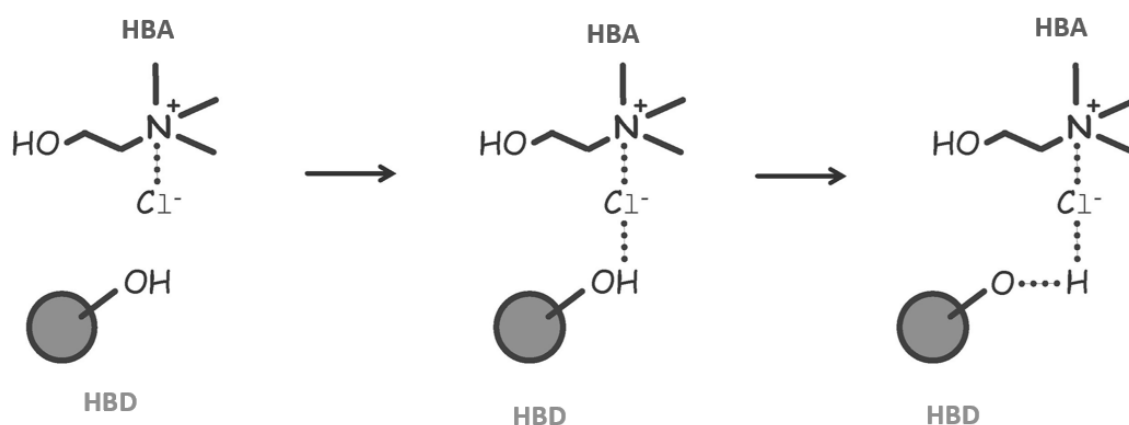
Faraji, Mahmoodi-Maymand e Dastmalchi (2020) utilizaram solvente eutético profundo hidrofóbico com microextração líquido-líquido em fase dispersiva assistida por vórtex combinada a HPLC-UV para determinação de ácido fólico em amostras de farinha de trigo fortificada. O solvente eutético utilizado foi uma combinação de cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico na razão molar de 1:4 (v/v). Os autores propuseram que as interações eletrostáticas entre o cloreto de trioctilmetilamônio, o solvente eutético profundo e o ácido fólico foram responsáveis pelo mecanismo de extração. A porcentagem de recuperação obtidas pelo método variaram na faixa de 91,6 % a 99,7 %, que também apresentou precisão satisfatória e capacidade de detectar o ácido fólico a níveis baixos. Além disto, o método foi classificado como rápido, simples, sensível e de baixo custo, e por utilizar pouco solvente, não empregar procedimentos de limpeza, utilizar vórtex e outras características, foi considerado como um método verde.

Diversos estudos têm empregado os solventes eutéticos profundos para extração de vitaminas e outros compostos orgânicos acoplados a detecção por espectrofotometria no UV-Vis (Dalmaz; Özak, 2022; Kizil *et al.*, 2024a; Kizil *et al.*, 2024b; Koraqi *et al.*, 2023, Yuvali *et al.*, 2021), no entanto até o momento não há relatos de utilização de solventes eutéticos profundos para extração de ácido fólico em suplementos alimentares.

2.3.1 Extração com solvente eutético profundo

Os solventes eutéticos profundos (DES) são uma mistura eutética composta por uma substância doadora de hidrogênio (HBD – *hydrogen bond donator*) e outra receptora de hidrogênio (HBA - *hydrogen bond acceptor*) (Santana *et al.*, 2021). A Figura 3 demonstra essa interação entre os constituintes do DES. A interação entre o HBA e o HBD ocorre tanto devido a formação de ligações de hidrogênio quanto pelas forças de Van der Waals, as quais determinam as propriedades físico-químicas do DES (Santos *et al.*, 2022).

Figura 3 – Representação de um exemplo da interação intermolecular na formação de um DES



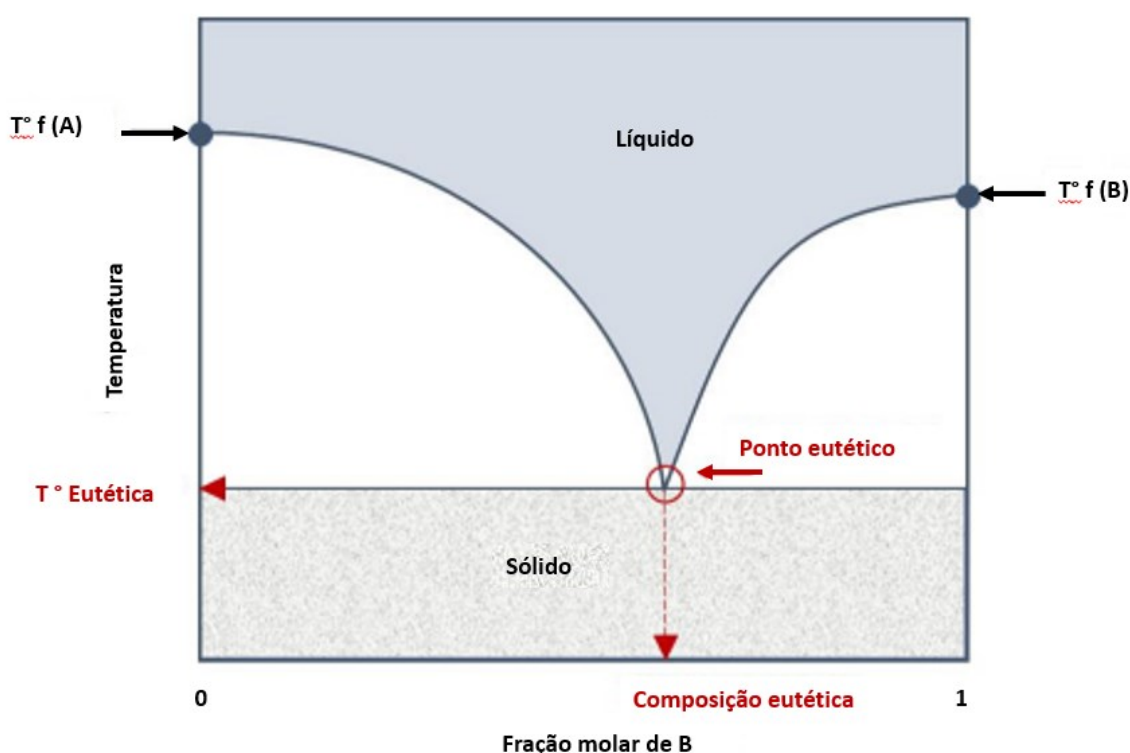
Fonte: adaptado de Santos *et al.* (2022).

Legenda: HBA - substância aceptora de hidrogênio; HBD - substância doadora de hidrogênio.

Essa mistura binária confere ao solvente eutético profundo a característica de apresentar um ponto de fusão menor que seus componentes individuais. Muitos dos solventes eutéticos profundos se apresentam na forma líquida a temperaturas menores que 70 °C a 80 °C, sendo que a maioria permanece estável em fase líquida

a temperatura ambiente. Estes solventes apresentam vantagens sobre outros solventes, pois são não inflamáveis, biodegradáveis, biocompatíveis e quimicamente estáveis (Zainal-Abidin; Hayyan; Wong, 2021). O sistema binário formado pela HBA e HBD pode ser representado por um diagrama de fase sólido-líquido, que expressa a temperatura de fusão em função da temperatura (Figura 4). O ponto no qual as curvas de temperatura de fusão dos dois compostos se encontram indica a composição do sistema e a temperatura de fusão mínima (Achkar, 2023).

Figura 4 – Diagrama de fase sólido-líquido geral de uma mistura binária

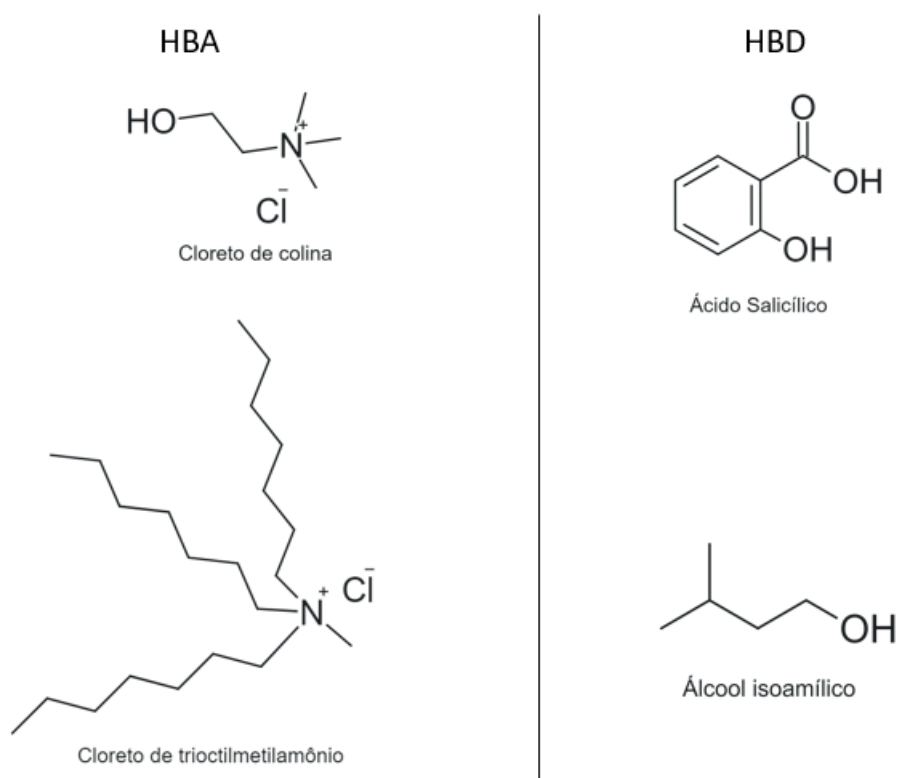


Fonte: adaptado de Achkar (2020).

Os DES são geralmente compostos por um sal quaternário de amônio que atua como HBA e um HBD que tem habilidade de formar ligações de hidrogênio com o HBA. Os DES são em sua maioria classificados de acordo com a natureza do HBD, que podem incluir cloretos metálicos, haletos metálicos hidratados e compostos orgânicos (Ijardar; Singh; Gardas, 2022). A Figura 5 ilustra alguns tipos de HBA e HBD. Atualmente, a literatura vem introduzindo outra classe de DES, os solventes eutéticos naturais (NADES), que têm apresentado grande potencial, uma vez que são obtidos de fontes naturais incluindo açúcares, polióis, ácidos carboxílicos, aminas e

aminoácidos (Cunha; Fernandes, 2018). Outra vantagem no uso do DES é a facilidade de seu preparo no laboratório. As etapas normalmente incluem a mistura dos componentes sob agitação e aquecimento, normalmente na faixa de 50°C a 100 °C. Outros métodos de preparo incluem o método de evaporação, *freeze-drying* e pulverização (Tang; An; Lee, 2021).

Figura 5 – HBA e HBD comumente utilizados no preparo de DES



Fonte: adaptado de Ijardar, Singh e Gardas (2022).

Ainda, conforme a composição, o DES pode apresentar uma natureza mais hidrofílica ou hidrofóbica. Embora os DES hidrofílicos sejam amplamente aplicados em catálise de reações químicas, em processos de separação e eletroquímica, eles possuem a desvantagem de serem instáveis em meio aquoso (Qu *et al.*, 2019). Em contrapartida, os solventes eutéticos profundos hidrofóbicos (HDES – *hydrophobic deep eutectic solvents*) apresentam pouca miscibilidade em água, devido à presença de longas cadeias alifáticas cíclicas ou alicíclicas, que reduzem a influência de domínios carregados característicos da carga iônica (HDES iônicos) ou da presença de grupos hidrofílicos como hidroxilas e grupos carboxilados (HDES neutros ou não

iônicos) (Makoś; Stupek; Gebicki, 2020; Tang; An; Lee, 2021). A hidrofobicidade dos HDES os torna ideais para aplicação em extração e remoção de componentes a partir de meios aquosos, além disso, a baixa pressão de vapor, elevada estabilidade térmica, ampla faixa de liquidez e incombustibilidade estão em acordo com os princípios da química verde (Cao; Su, 2021). Os HDES têm sido aplicados na extração de compostos orgânicos bioativos e por apresentarem baixa ou nenhuma toxicidade, alta biodegradabilidade e baixo custo, têm emergido como alternativa a outros solventes, como os líquidos iônicos (Ruggeri *et al.*, 2019; Socas-Rodríguez, *et al.*, 2021; Zainal-Abidin; Hayyan; Wong, 2021). As características físico-químicas dos solventes eutéticos profundos hidrofóbicos apresentadas no Quadro 3, dependem da sua composição e influenciam a sua aplicação.

Quadro 3 – Propriedades físico-químicas de solventes eutéticos profundos hidrofóbicos

Propriedade	Características	Fonte
Densidade (ρ)	Apresentam faixa de 0,85 a 1,5 g.mL ⁻¹ , sendo a maioria entre 0,88 e 0,97 g.mL ⁻¹ Tendem a formar emulsão quando a densidade for próxima à da água ρ HBA e HBD > ρ H ₂ O $\rightarrow$ ρ HDES > ρ H ₂ O ρ HBA e HBD < ρ H ₂ O $\rightarrow$ ρ HDES < ρ H ₂ O A ρ aumenta com o aumento do número de grupos funcionais -OH do HBD HDES com mesmo HBD, a ρ reduz com aumento da cadeia do HBA ρ HDES é linearmente negativa correlacionada com a temperatura	Cao e Su, 2021
Viscosidade (ν)	Baixa viscosidade, na faixa de 2,31 a 1807 mPa s ν de HDES neutros < HDES iônicos ν de HDES que contém Br ⁻ > ν de HDES contém Cl ⁻ HDES com mesmo HBA, a ν reduz com a redução da cadeia do HBD Maior ν pode facilitar a separação do solvente A elevação da temperatura diminui a ν .	Cao e Su, 2021
Polaridade	Indica a capacidade de solubilização de um solvente. Menor polaridade $\rightarrow$ DES hidrofílicos a base de monoácidos < HDES iônicos < HDES neutros < DES hidrofílicos a base de diácidos < água $\rightarrow$ Maior polaridade	Cao e Su, 2021
pH	Diminui discretamente com incremento da temperatura (25 – 85 ° C) Varia significativamente com alteração do HBD	Skulkova <i>et al.</i> , 2018
Condutividade	Quanto maior o volume do íon, menor a condutividade e maior a viscosidade.	Kityk <i>et al.</i> , 2017
Índice de refração	Varia de acordo com o HBD, pode haver relação com o volume da molécula A refratividade molar pode ser utilizada para evidenciar a formação de ligações de hidrogênio	Hansen <i>et al.</i> , 2021

Fonte: elaborado pelo autor.

A utilização de solventes eutéticos profundos hidrofóbicos vêm sendo empregada para extração de compostos orgânicos a partir de suplementos

alimentares. Yakupova *et al.* (2023) utilizaram DES hidrofóbico a base de mentol e ácido heptanóico para extração de melatonina utilizando microextração por gota orgânica flutuante solidificada e detecção por HPLC-UV. Li-yuan *et al.* 2020 quantificaram curcuminóides extraídos de suplemento alimentar utilizando HDES a base de cloreto de tetrabutylamônio e ácido decanóico. Outro estudo demonstrou eficácia na extração de vitamina C de comprimidos efervescentes utilizando HDES preparado a partir de mentol e ácido decanóico com quantificação por espectrofotometria UV-Vis (Dalmaz; Özak, 2022).

Referente a aplicação de HDES para a extração de ácido fólico, apenas um estudo foi encontrado na literatura utilizando quantificação por HPLC-UV (Faraji; Mahmoodi-Maymand; Dastmalchi, 2020). Até o momento não há relatos na literatura da utilização de HDES para extração de ácido fólico a partir de suplementos alimentares utilizando espectrofotometria UV-Vis.

2.4 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos consiste no processo de definir os parâmetros analíticos de mérito que confirmam que o método proposto possui a capacidade e consistência para a sua aplicação (Magnusson; Ornemark, 2014). Allegrini e Olivieri (2014) definem parâmetros analíticos de mérito como sendo indicadores estatísticos que fornecem indicadores quantitativos acerca da qualidade ou performance de um dado método analítico. De acordo com o Documento Orientativo número 8 da Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, DOC-CGCRE-008, a validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Esta especificação está em consonância com o conceito apresentado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 e pelo Vocabulário Internacional de Medidas (VIM) (ABNT, 2017; INMETRO, 2012; INMETRO, 2020). Fundamentalmente o objetivo é garantir que os resultados de uma medição sejam o mais próximo possível do valor verdadeiro para um determinado analito em uma amostra específica (González; Herrador, 2007).

Diversos guias e protocolos de validação estão publicados na literatura, os quais são emitidos por órgãos reguladores ou associações internacionais como o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade (INMETRO) e a *Association of Official*

Analytical Collaboration (AOAC). Os parâmetros analíticos de mérito como seletividade, faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, repetibilidade e incerteza de medição são comumente utilizados na avaliação de métodos analíticos (INMETRO, 2020; AOAC International, 2016). A AOAC possui guia específico para suplementos alimentares, o qual apresenta requisitos comuns a outros guias publicados (AOAC International, 2023).

No Brasil não existe um guia específico para validação de métodos aplicado a suplementos alimentares. Entretanto a legislação nacional classifica os suplementos alimentares como formas farmacêuticas para as quais os métodos analíticos publicados na Farmacopeia Brasileira podem ser aplicados. A Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos em formas farmacêuticas (medicamentos), insumos farmacêuticos e produtos biológicos pode ser aplicada a suplementos alimentares. Esta resolução determina que os parâmetros de validação e seus respectivos critérios sejam definidos a partir das características do analito e da natureza do método sejam eles métodos qualitativos ou quantitativos (Brasil, 2018a, Brasil, 2017b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PADRÃO ANALÍTICO E REAGENTES

Para a produção da solução padrão utilizou-se ácido fólico material de referência certificado (Merck Millipore, CAS n° 59-30-3). As demais soluções foram preparadas com fosfato de potássio dibásico (Biotec, pureza $\geq 98\%$, CAS n° 7758-11-4), fosfato de sódio bibásico grau ACS (Dinâmica, pureza $\geq 99\%$, CAS n° 7558-79-4), hidróxido de sódio grau reagente (Exôdo, pureza $\geq 97\%$, CAS n° 1310-73-2), metanol grau HPLC (Merck-Supelco, pureza $\geq 99,9\%$, CAS n° 67-56-1) e acetonitrila (Reatec, pureza $\geq 99,97\%$, CAS n° 75-05-8).

Água ultra purificada foi obtida pelo sistema de purificação ELIX 10 (Millipore, EUA). Antes da utilização a água foi fervida por 1 hora, em seguida resfriada e utilizada em até 24 h.

Para o preparo do solvente eutético profundo foram utilizados cloreto de trioctilmetilamônio (TOMAC) (Merck, pureza $\geq 97\%$, CAS 5137-55-3) e álcool isoamílico (Biotec, pureza $\geq 98,5\%$, CAS n° 123-51-3).

Os certificados de análise do ácido fólico, cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico constam nos ANEXOS A, B e C.

3.2 VIDRARIAS

Todas as vidrarias volumétricas utilizadas durante as análises foram de classe A, certificadas por laboratório acreditado na Rede Brasileira de Calibração.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO E MÉTODOS UTILIZADOS

As pesagens dos reagentes foram realizadas em balança analítica (BEL, modelo HPGB 2285Di, Brasil). As transferências de volume foram feitas com auxílio de micropipetas automáticas (HTL, LabmatePro, Polônia). A verificação do pH foi realizada em medidor de pH (Digimed, DM-21, Brasil). Para a extração do ácido fólico foi utilizado agitador de tubos (Marconi, MA 162, Brasil) e para separação de fases centrífuga refrigerada (ALC, modelo PK131R, EUA). O preparo do DES foi realizado

em chapa aquecedora com agitação (Quimis, Q261-22, Brasil) e termômetro analógico de vidro.

A análise espectrofotométrica foi executada em espectrofotômetro (Varian, Cary 50, EUA), a aquisição de dados foi realizada pelo software CaryWinUV versão 3.00 (399) em modo “SCAN” na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, Infinity 1260 II LC System, EUA) equipado com amostrador automático (260 HiP ALS) com 40 µL de loop, bomba quaternária (1260 Infinity II), termostato (1290 Infinity II), forno de coluna (1260 Infinity II) e detector de arranjo de diodos (1200 Infinity). Sistema de cromatografia controlado pelo software OpenLab EZChrom .

Todas as análises foram realizadas no Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

3.4.1 Solução tampão fosfato de sódio 0,25 mol. L⁻¹ e potássio 0,3 mol.L⁻¹

Foram pesados 25,0 g de K₂HPO₄ e 18,0 g de Na₂HPO₄ e transferidos para balão volumétrico de 500 mL. Foi adicionada água e mantido em banho de ultrassom até completa solubilização, (pH = 8,76 ± 0,01).

3.4.2 Solução hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹

Foi pesado 40,0 g de hidróxido de sódio, transferido para balão volumétrico de 1 L e completado o volume com água ultra purificada, (pH = 12,67 ± 0,02).

3.4.3 Metanol basificado

Um volume de 10 µL de hidróxido de amônio foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com metanol.

3.5 ÁCIDO FÓLICO

3.5.1 Preparo do padrão de ácido fólico 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Para o preparo da solução estoque foi pesado 10 mg de ácido fólico, transferido para balão volumétrico de 100 mL, adicionado 5 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ e completado o volume com solução tampão fosfato de sódio e potássio.

3.5.2 Caracterização das propriedades físico-químicas do ácido fólico através de simulação numérica

Utilizando simulação numérica gerada por meio do programa CHEMICALIZE (CHEMAXON, 2023, Budapeste) e Marvin Sketch (CHEMAXON, versão 23.16.0, Budapeste) foi possível obter as seguintes propriedades físicas do ácido fólico: pKas, a partir dos quais foi gerado o diagrama de distribuição de espécies; constante de solubilidade (log S) usada para a estimativa da curva de solubilidade (mg.mL⁻¹) e a constante de partição (log D) para a estimativa da curva de lipofilicidade (mg.mL⁻¹). Os dados obtidos foram plotados no programa Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO®, versão 2311, EUA).

3.5.3 Caracterização do espectro de absorção molecular do ácido fólico

Inicialmente foi realizado um estudo para caracterizar os espectros de absorção do ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ na faixa de varredura de comprimento de onda de 200 a 800 nm. Foram preparadas soluções de ácido fólico nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio e potássio e em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e realizadas leituras em espectrofotômetro utilizando microcubetas de quartzo de 10 mm com capacidade para 100 μL . Foram feitos brancos da água, da solução tampão fosfato de sódio e potássio e da solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

Para avaliação do $\lambda_{\text{máx}}$ dos espectros foi utilizada a derivação espectral de primeira ordem conforme as Equações 2 e 3:

$$\text{Zero ordem: } A = f(\lambda) \quad (2)$$

$$\text{Primeira ordem: } \frac{dA}{d\lambda} = f'(\lambda) \quad (3)$$

Onde:

A = absorvância;

λ = comprimento de onda (nm).

3.5.4 Construção das curvas de calibração, avaliação de linearidade e limites de detecção e quantificação

Após a determinação dos comprimentos de onda máximos para ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, os valores de absorvância das soluções de ácido fólico nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg.mL⁻¹ foram utilizados para construção das curvas analíticas de absorvância *versus* concentração. Os parâmetros de regressão linear utilizados para avaliação da linearidade foram calculados no programa Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO®, versão 2311, EUA). Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme as Equações 4 e 5.

$$LOD = 3,3 \times s/b \quad (4)$$

onde:

LOD = limite de detecção

s = desvio padrão da resposta do branco

b = coeficiente angular da curva analítica

$$LOQ = 10 \times s/b \quad (5)$$

onde:

LOQ = limite de detecção

s = desvio padrão da resposta do branco

b = coeficiente angular da curva analítica

3.5.5 Determinação experimental do coeficiente de absorvidade molar

O coeficiente de absorvidade molar foi calculado a partir do coeficiente angular obtido no ajuste linear dos gráficos de absorvância *versus* concentração de acordo com a Equação 6, conforme a Lei de *Lambert-Beer* para as soluções de

solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ nos comprimentos de onda máximos do ácido fólico.

$$Abs = \varepsilon . b . c. \quad (6)$$

onde:

Abs = valor da absorção em um dado comprimento de onda;

ε = absortividade molar (L.mol⁻¹.cm⁻¹);

b = caminho óptico (cm);

c = concentração do analito (mol.L⁻¹).

3.5.6 Avaliação da estabilidade do ácido fólico

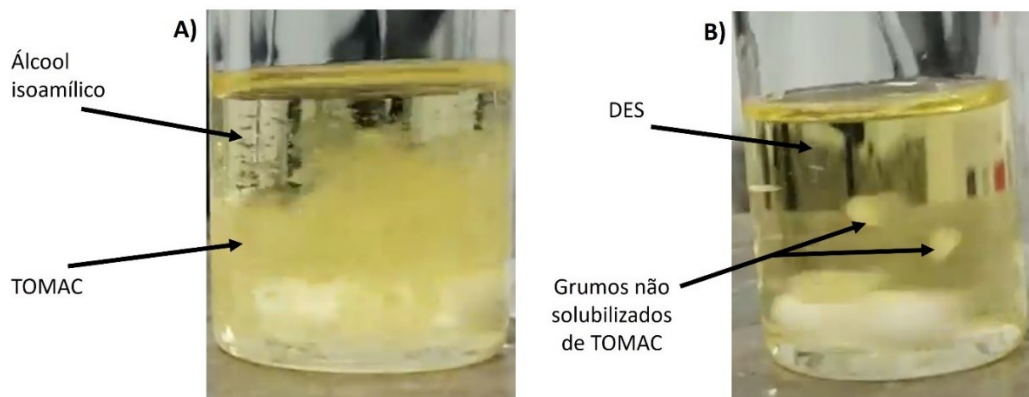
Foram preparadas soluções de ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ na concentração de 20,0 µg.mL⁻¹ e mantidas em frasco âmbar sob temperatura de 5 °C ± 3 °C. A estabilidade do sinal e a recuperação (%) do ácido fólico foram avaliadas por espectrofotometria na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm no tempo zero (imediatamente após o preparo da solução), 5 dias e 40 dias de armazenamento.

3.6 SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (DES) A BASE DE CLORETO DE TRIOCTILMETILAMÔNIO E ÁLCOOL ISOAMÍLICO

3.6.1 Preparo do solvente eutético profundo

A escolha dos reagentes para o preparo do DES (cloreto de trioctilmetilamônio (TOMAC) e álcool isoamílico, a proporção molar 1:4 de TOMAC:álcool isoamílico e o preparo do DES, foram realizados de acordo com Faraji (2019) e Faraji, Mahmoodi-Maymand e Dastmalchi (2020). Para o preparo do DES os reagentes foram pesados diretamente em tubo de ensaio, após o tubo foi mantido sobre uma chapa aquecedora com agitação constante, com temperatura de 50 °C até que fosse perceptível visualmente que os dois reagentes estivessem completamente solubilizados e a mistura apresentasse aspecto transparente e homogêneo (Figura 6).

Figura 6 – Preparo do solvente eutético profundo



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: TOMAC – cloreto de trioctilmetilamônio; A) mistura no tempo zero; B) mistura após 10 min de agitação a 50 °C.

3.6.2 Caracterização das propriedades físico-químicas do DES

O DES foi caracterizado com base nas seguintes propriedades físico-químicas: densidade e índice de refração, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019).

3.6.3 Caracterização do comportamento espectrofotométrico do DES

Foi realizado um estudo para caracterizar os espectros de absorção do DES, cloreto de trioctilmetilamônio, álcool isoamílico, metanol e acetonitrila na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm utilizando espectrofotômetro UV-Vis, em cubetas de quartzo de 10 mm, com 10 replicatas, a fim de verificar o comportamento espectral dos reagentes propostos na etapa de extração e diluição. Também foi realizado teste com 300 μL de DES em 5 mL de água ultra purificada a fim de verificar se houve transferência de fase orgânica para a fase aquosa.

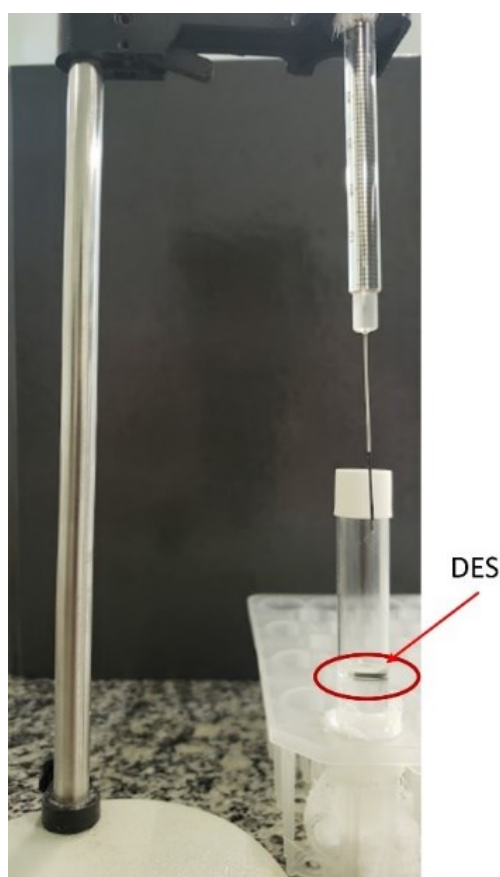
3.7 MICROEXTRAÇÃO DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE ÁCIDO FÓLICO ASSISTIDA POR AGITAÇÃO EM VÓRTEX COM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO

Foram preparadas duas curvas analíticas em solução tampão fosfato de sódio e potássio e em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0;

15,0 e 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido fólico. Foram utilizados 5 mL de cada diluição e transferidos para tubos de ensaio com rosca (10 x 100 mm). A cada tubo foi adicionado 300 μL de DES, seguidos de agitação em vórtex por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 7.500 RPM para separação de fases. Foram retiradas 2 alíquotas de 100 μL cada da fase orgânica (DES) com auxílio de microseringa de 250 μL e feita a leitura em espectrofotômetro com varredura no comprimento de onda entre 200 a 800 nm em microcubeta de 100 μL (10 mm).

Na fase orgânica que continha o DES (fase superior) (Figura 7) foi realizada leitura no espectrofotômetro (200 a 800 nm) e após esta fase foi diluída separadamente em metanol basificado e acetonitrila nas proporções de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:12 e realizadas leituras no espectrofotômetro (200 a 800 nm). Na fase aquosa (inferior) também foi realizada leitura no espectrofotômetro (200 a 800 nm). Todas as análises foram realizadas em quintuplicata.

Figura 7 – Instrumentação utilizada no procedimento de microextração do ácido fólico com DES



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: aparato montado com microseringa para estabilizar a retirada da alíquota de DES.

3.8 PLANEJAMENTO FATORIAL 2³

Para o desenvolvimento do método e definição dos fatores que podem interferir na extração do ácido fólico foi realizado um estudo para otimização das variáveis por meio de um planejamento fatorial 2³. As variáveis pesquisadas e os respectivos níveis estão descritos na Tabela 2. Foram verificados o efeito sobre a eficiência de extração em dois níveis de pH; dois tipos de solvente utilizados para a diluição do DES (um aprótico – acetonitrila e outro prótico – metanol basificado com 0,01% de hidróxido de amônio) em dois níveis de diluição desses solventes (1:4 (v/v) e 1:8 (v/v)) em dois níveis de diluição.

Tabela 2 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2³ para otimização do experimento

Fatores	Código de interação	Níveis	
		baixo (-)	alto (+)
pH	<i>a</i>	8,76	12,67
Solvente de diluição	<i>b</i>	Metanol basificado	Acetonitrila
Fator de diluição do solvente	<i>c</i>	1:4	1:8

Fonte: elaborado pelo autor.

Para análise dos 3 fatores planejados, foi utilizada uma matriz de contraste com 8 testes, em ordem aleatória, cada linha apresenta as variáveis por teste executado (Tabela 3). Como resposta foi utilizado o coeficiente de determinação (r^2). Para cada um dos testes foi construída uma curva de calibração analítica em solução tampão fosfato de sódio e potássio e em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg.mL⁻¹ de ácido fólico.

Tabela 3 – Matriz octogonal do planejamento fatorial 2^3 para $k = 3$ fatores e $n = 8$ experimentos

Teste	Ordem	Combinação do tratamento	Variáveis			Resposta
			pH	Solvente de diluição	Fator de diluição do solvente	
1	5°	(1)	8,76 (-1)	Metanol (-1)	1:4 (-1)	coeficiente de determinação (r^2).
2	1°	a	12,67 (+1)	Metanol (-1)	1:4 (-1)	
3	7°	a	8,76 (-1)	ACN (+1)	1:4 (-1)	
4	3°	ab	12,67 (+1)	ACN (+1)	1:4 (-1)	
5	6°	c	8,76 (-1)	Metanol (-1)	1:8 (+1)	
6	2°	ac	12,67(+1)	Metanol (-1)	1:8 (+1)	
7	8°	bc	8,76 (-1)	ACN (+1)	1:8 (+1)	
8	4°	abc	12,67 (+1)	ACN(+1)	1:8 (+1)	

Fonte: elaborado pelo autor.

O cálculo dos efeitos, estimativa de erros e avaliação do modelo estatístico foram gerados pelo modelo de regressão e por análise de variância (ANOVA) com valor de significância ($p < 0,05$).

3.9 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO ANALÍTICO

Os parâmetros de seletividade, faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de detecção, exatidão, repetibilidade, fator de enriquecimento e incerteza de medição foram avaliados neste estudo. A matriz utilizada nos testes foi suplemento alimentar contendo ácido fólico, uma vez que não foi possível encontrar matriz isenta do analito.

O fator de enriquecimento foi determinado pela Equação 7 (Faraji, Mahmoodi-Maymand e Dastmalchi, (2020).

$$EF = C_f / C_i \quad (7)$$

onde:

EF = fator de enriquecimento;

C_f = concentração de ácido fólico na fase orgânica (DES);

C_i = concentração de ácido fólico na fase aquosa inicial.

3.9.1 Faixa de trabalho e linearidade

Para determinar a faixa de trabalho e a linearidade, foi construída uma curva de calibração com 5 pontos em quintuplicata nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando padrão de ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} . A curva foi avaliada visualmente e pelo método dos mínimos quadrados para obtenção da regressão linear e dos coeficientes angular, linear, coeficientes de correlação e de determinação. A verificação de homocedasticidade foi avaliada pelo teste de Cochran. Os valores discrepantes foram verificados pelo teste de Grubs e os resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk assumindo como hipótese nula a normalidade dos resíduos (INMETRO, 2020).

3.9.2 Seletividade

O estudo para verificação de possíveis interferentes foi realizado por efeito de matriz. A curva padrão sem matriz obtida no teste de linearidade foi comparada a curva com matriz, ambas adicionadas de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão de ácido fólico.

A avaliação estatística foi realizada pelo teste- F e verificação de homogeneidade das variâncias, por nível de concentração, para avaliar o efeito da matriz na precisão, e pelo teste t para comparação das médias por nível de concentração, para avaliar se a matriz não interfere o sinal do analito nos níveis de concentração especificados (INMETRO, 2020).

3.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Foram executadas 10 repetições do branco sem padrão de ácido fólico para determinação do LOD e LOQ, calculados a partir das Equações 4 e 5 (INMETRO, 2020).

3.9.4 Exatidão

Foram realizadas 5 replicatas em 5 níveis de concentração (1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg.mL⁻¹) na curva sem matriz. A recuperação relativa foi calculada utilizando a Equação 8 (INMETRO, 2020).

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{referência}} \times 100 \quad (8)$$

onde:

R = Recuperação relativa em porcentagem;

x = valor médio do analito na matriz não fortificada;

$x_{referência}$ = valor de referência da concentração adicionada na matriz.

O valor de R (%) foi avaliado como satisfatório quando atingiu a faixa de recuperação entre 80 e 110% de acordo com o DOC-CGCRE-8 (INMETRO, 2020).

3.9.5 Precisão

Foram realizadas 5 replicatas em 5 níveis de concentração (1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg.mL⁻¹) na curva sem matriz (INMETRO, 2020). Para a avaliação da repetibilidade os testes foram realizados pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, no mesmo dia. O desvio padrão relativo (DPR) para avaliação da repetibilidade foi calculado conforme a Equação 9.

$$DPR(\%) = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 \quad (9)$$

onde:

DPR = desvio padrão relativo em porcentagem;

s_r = desvio padrão da repetibilidade.

$\bar{x}$ = valor médio da concentração nas 5 replicatas.

O valor de DPR (%) foi avaliado pelo valor de Horwitz derivado da Equação 10 de acordo com o DOC-CGCRE-8 (INMETRO, 2020).

$$DPR_R = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (10)$$

onde:

DPR_R = desvio padrão relativo em porcentagem;

C = concentração de analito (g.g^{-1}).

3.9.6 Comparação com método referência

A comparação do método desenvolvido para determinação de ácido fólico, foi realizada em amostra de suplemento alimentar de ácido fólico. Os resultados do método desenvolvido foram comparados ao método cromatográfico para comprimidos de ácido fólico da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019).

Para execução do método desenvolvido, a massa equivalente a 10 μg de ácido fólico, foi pesada a partir da homogeneização de 20 cápsulas do suplemento alimentar, transferida para balão volumétrico âmbar de 250 mL e completado o volume com solução de NaOH 0,1 mol.L^{-1} . O balão foi agitado manualmente por 50 vezes, uma alíquota de 10 mL foi transferida para tubo plástico e centrifugado por 5 min a 7500 rpm. Um volume de 5 mL do sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio de vidro com tampa e então adicionados 300 μL de DES. A solução foi agitada em vórtex por 2 min e centrifugada por 5 min a 7500 RPM. Um volume de 100 μL da fase orgânica, foi retirado com auxílio de microseringa de 250 μL , transferido para frasco de vidro de 1,5 mL, seguindo-se a diluição com metanol basificado na proporção de 1:8 (v/v). Uma alíquota de 100 μL da diluição foi transferida para microcubeta e a leitura realizada em espectrofotômetro na faixa de 200 a 800 nm.

Foi realizada a comparação entre o resultado obtido para o método desenvolvido no presente trabalho com o método referência preconizado na Farmacopeia Brasileira, para a determinação de ácido fólico em suplemento alimentar por HPLC-UV. A tendência relativa do método e a recuperação relativa apresentadas foram determinadas pelas Equações 11 e 12, respectivamente. As médias dos resultados foram avaliadas pelo teste F para avaliar se as variâncias foram estatisticamente iguais e pelo teste t (Student) para verificação de igualdade das médias dos resultados (INMETRO, 2020).

$$b(\%) = \left(\bar{x} - \bar{x}_{\text{referência}} \right) / \bar{x}_{\text{referência}} \times 100 \quad (11)$$

$$R' = \bar{x} / x_{\text{referência}} \times 100 \quad (12)$$

onde:

b = tendência do método, em porcentagem;

R' = recuperação relativa, em porcentagem;

$\bar{x}$ = concentração média de AF no método desenvolvido, em $\mu\text{g}/\text{cápsula}$;

$\bar{x}_{\text{referência}}$ = concentração média de AF no método referência, em $\mu\text{g}/\text{cápsula}$.

3.9.7 Incerteza de medição

Para estimativa da incerteza de medição foi especificado o mensurando, e então as fontes de incerteza padrão foram identificadas a partir de múltiplas fontes, utilizando o Diagrama de Ishikawa. As fontes de incerteza foram então classificadas como fonte do tipo A ou tipo B, a fim de verificar o tipo de distribuição utilizada para normalização dos dados de entrada e transformação em incerteza padrão para cada componente. As incertezas padrão obtidas foram equacionadas, considerando os respectivos coeficientes de sensibilidade, resultando em uma incerteza combinada. O valor calculado de graus de liberdade efetivos (V_{eff}) foi utilizado para determinação do fator de abrangência (k) a um nível de 95,45% de confiança utilizado para determinação do valor da incerteza expandida (U_{exp}) (Ellison; Williams, 2012).

O valor encontrado para incerteza de medição foi avaliado de acordo com o estabelecido pelo Guia de validação e controle de qualidade analítica (Brasil, 2011), conforme Equação 13.

$$\frac{u_c(C_{\text{anal}})}{C_{\text{anal}}} \leq 8/9 \times CV_{\text{tabelado}} \quad (13)$$

onde:

$u_c(C_{\text{anal}})$ = incerteza combinada para a faixa de concentração avaliada, em $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$;

C_{anal} = concentração analítica para a faixa avaliada, $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$;

CV_{tabelado} = coeficiente de variação tabelado para a faixa avaliada.

3.10 AMOSTRA DE ÁCIDO FÓLICO UTILIZADA NO ESTUDO

A amostra utilizada no estudo foi adquirida em farmácia da região metropolitana de Florianópolis e foi selecionada seguindo os seguintes critérios: apresentação na forma suplemento alimentar em cápsulas, contendo ácido fólico na forma de ácido n-pterilmonoglutâmico, sem associação com outros ativos.

3.11 VERIFICAÇÃO DO MÉTODO FRENTE AOS PARÂMETROS DA QUÍMICA VERDE

O método desenvolvido para determinação de ácido fólico e o método cromatográfico para comprimidos de ácido fólico da Farmacopeia Brasileira foram verificados e comparados frente aos 12 parâmetros da química verde, utilizando a ferramenta *Analytical Greenes Calculator* (AGREE) (Pena-Pereira; Wojnowski, Tobiszewski, 2020).

3.12 PRÉ PROCESSAMENTO DE DADOS

Todos os espectros foram processados para correção do deslocamento da linha de base (*offset*) empregando a Equação 14, conforme especificado por Beebe, Pell e Seasholtz (1998).

$$y_{\lambda}^{**} = y_{\lambda}^{*} + \alpha \quad (14)$$

Onde:

y_{λ}^{**} = valor do vetor-amostra ao longo do espectro UV-Vis;

y_{λ}^{*} = valor do sinal de interesse corrigido;

α = valor estimado (*offset-baseline*).

A suavização dos dados espectrais foi realizada por meio da aplicação do método Savitzky-Golay (Savitzky e Golay, 1964) utilizando-se um polinômio móvel de segunda ordem com janela de 7 pontos para minimização de ruídos e sem perda significativa de informação (Equação 15). A suavização foi aplicada nos espectros de ordem zero e primeira derivada.

$$y_{\lambda} = (-2y_{\lambda-3}^{*} + 3y_{\lambda-2}^{*} + 6y_{\lambda-1}^{*} + 7y_{\lambda}^{*} + 6y_{\lambda+1}^{*} + 3y_{\lambda+2}^{*} - 2y_{\lambda+3}^{*})/21 \quad (15)$$

Onde:

y_{λ} = sinal suavizado;

y_{λ}^{*} = valor do sinal de interesse corrigido (referente ao sinal da Equação 15), com t sendo o passo entre cada leitura.

Todos os dados foram tratados utilizando o programa Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO®, versão 2311, EUA).

3.13 PÓS PROCESSAMENTO DE DADOS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Microsoft® Excel® (Microsoft 365 MSO®, versão 2311, EUA) e o programa Minitab® Statistical Software (LLC, versão 21.4.2 2023, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

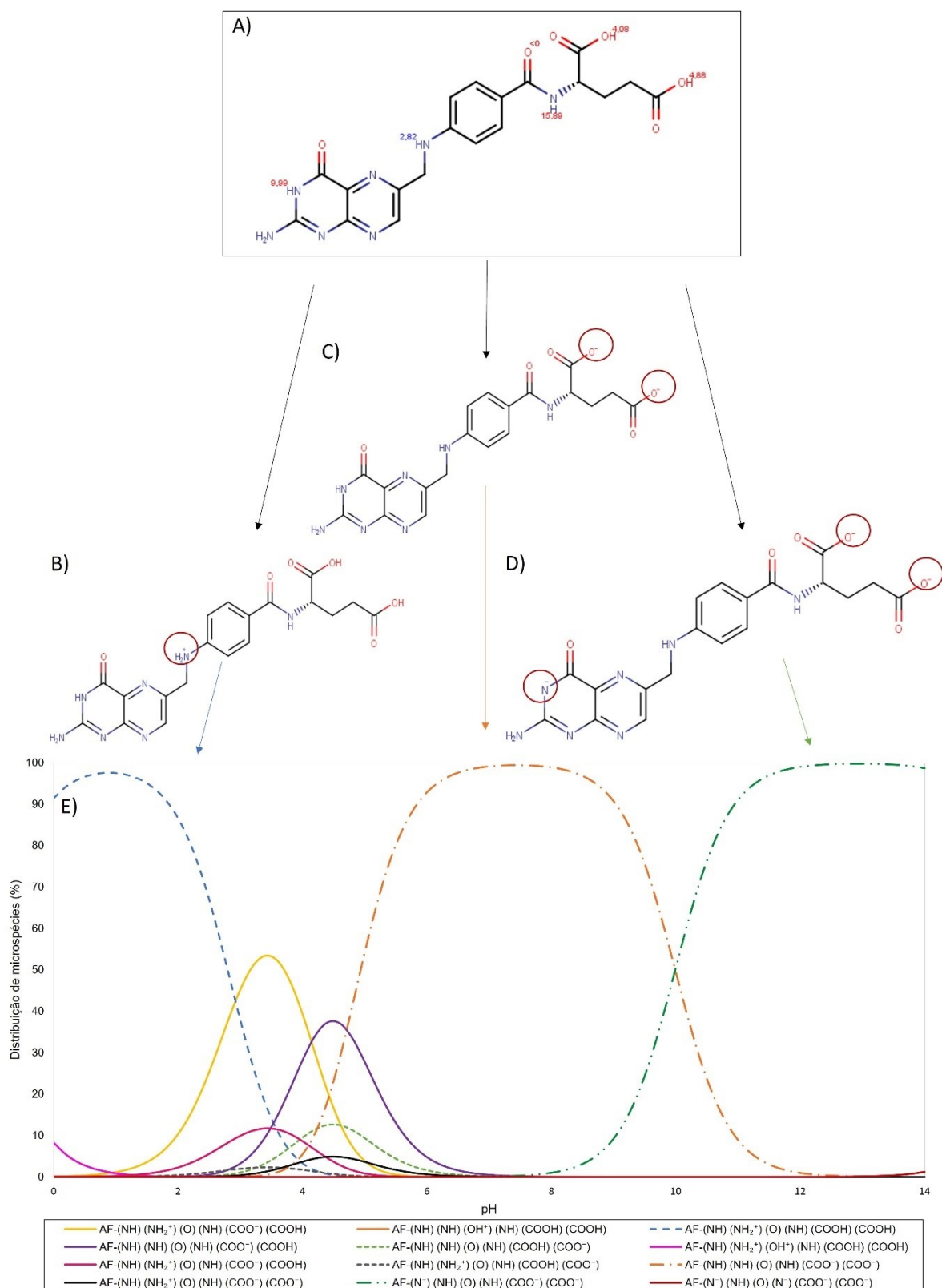
4.1 ÁCIDO FÓLICO

4.1.1 Caracterização das propriedades físico-químicas do ácido fólico por simulação numérica

A Figura 8 apresenta o diagrama de espécies para o ácido fólico gerado a partir dos dados da plataforma CHEMICALIZE e do programa Marvin Sketch. Os dados brutos da simulação gerada pelo programa CHEMICALIZE estão apresentadas no APÊNDICE A. A simulação gerada pelo programa Marvin Sketch apresenta 6 sítios principais de ionização responsáveis pela dissociação do ácido fólico, sendo eles 5 pKas com valor positivo e 1 pKa com valor abaixo de 0. Dentre as estruturas apresentadas, as Figuras 8 C e 8 D são as de interesse, pois apresentam maior percentual de espécies nos valores de pH de 8,76 e 12,67 referente a solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, respectivamente, utilizadas neste trabalho. No gráfico de distribuição de espécies é possível verificar que nessa faixa de pH as duas espécies (Figura 8 C e 8 D) são majoritárias, sendo que a espécie demonstrada na Figura 8 C possui os dois grupamentos carboxílicos da porção glutamyl desprotonados (pKa 4,08 e 4,98) e a espécie na Figura 8 D apresenta desprotonação do nitrogênio no anel pteridínico (pKa 9,99) além dos dois grupamentos carboxílicos desprotonados.

Szakács e Noszál (2006) determinaram 3 pKas ácidos para o ácido fólico em 2,38, 3,46 e 4,98 que contribuem para a desprotonação dos grupamentos glutamyl-carboxílicos e do nitrogênio do anel pteridínico, respectivamente, e um pKa para o ácido fólico em 8,08 atribuído ao nitrogênio da porção lactâmica.

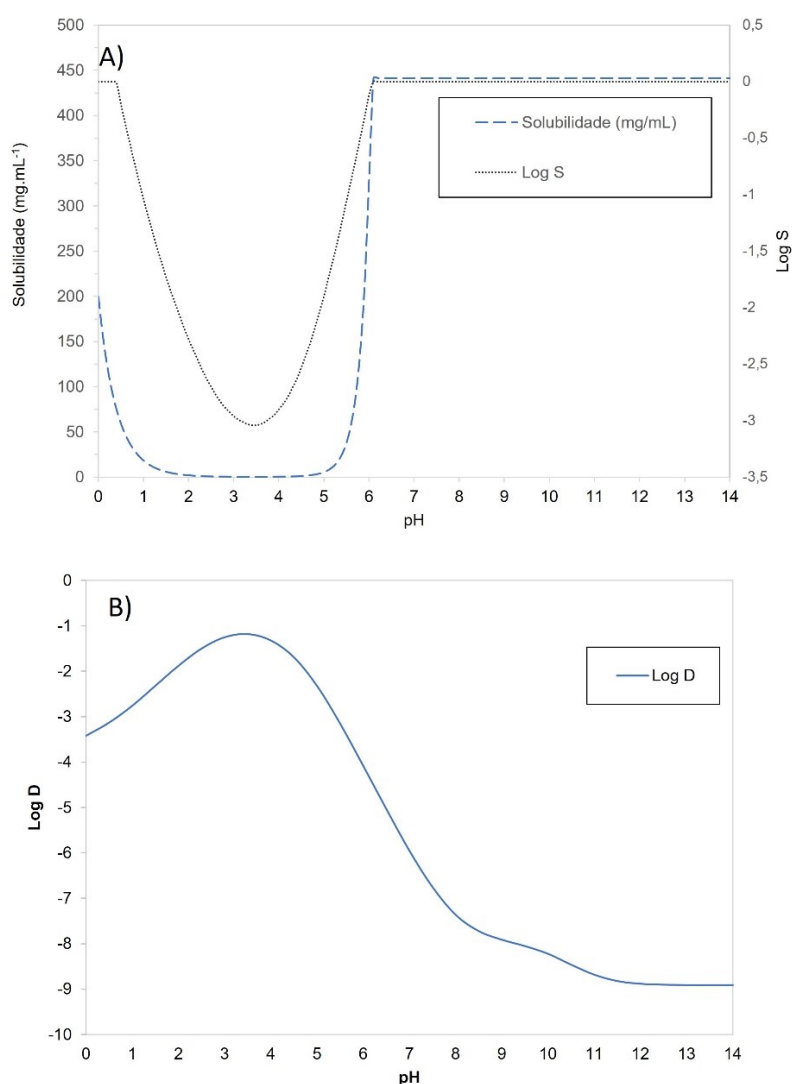
Figura 8 – Diagrama de distribuição de microespécies de ácido fólico e constantes de dissociação



Legenda: AF - ácido fólico; A - AF com respectivos pKas; B, C e D - protonação e desprotonação dos grupamentos amínicos e carboxílicos do AF; E - diagrama de distribuição de espécies do AF.

Na curva de solubilidade do ácido fólico (Figura 9) obtida pela simulação, observou-se que o ácido fólico apresenta elevação da curva de solubilidade a partir de pH 5,0 atingindo máximo em torno de pH 6,0. Em pH 8,0 a 13,0 continua apresentando máxima solubilidade, sendo que nessa região de pH, há prevalência das espécies desprotonadas conforme demonstrado nas Figuras 8 C e 8 D. Estes dados são condizentes com os determinados experimentalmente por Bottari *et al.* (2021) que realizaram estudo sobre a solubilidade do ácido fólico e observaram que a solubilidade do ácido fólico é dependente do pH, devido a presença de duas a três cargas na forma aniônica, correspondentes a desprotonação dos grupos carboxílicos e do nitrogênio no anel pteridínico.

Figura 9 – Gráficos de solubilidade (A) e lipofilicidade (B) em função do pH para ácido fólico



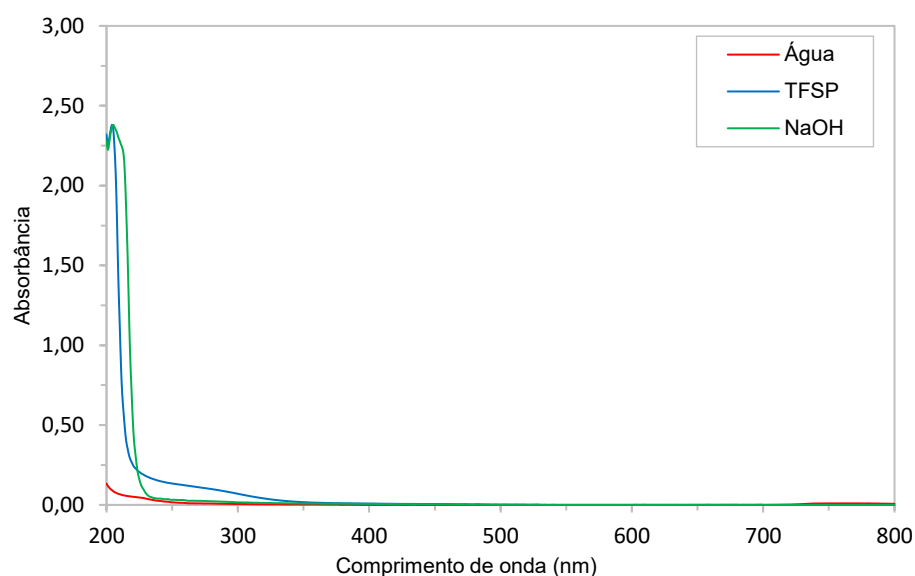
Fonte: elaborado pelo autor.

A curva correspondente ao coeficiente de partição ($\log D$) para o ácido fólico (Figura 9) indica o comportamento lipofílico do ácido fólico. O $\log D$ permite avaliar a distribuição das espécies carregadas e não carregadas em equilíbrio em função do pH (Csizmadia *et al.*, 1997). A partir do pH em torno de 5,0 a curva é decrescente e o valor de $\log D$ diminui, indicando maior concentração de espécies ionizadas de ácido fólico em fase aquosa. Conforme observado na Figura 8, o ácido fólico apresenta diversos grupos desprotonados em pH alcalino e melhor solubilidade, corroborando o apresentado na curva de lipofilicidade.

4.1.2 Caracterização espectrofotométrica

A Figura 10 apresenta os espectros de absorção molecular da água, da solução tampão fosfato de sódio e potássio pH $8,76 \pm 0,01$ e solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH $12,67 \pm 0,02$, na região de comprimento de onda entre 200 e 800 nm, utilizados para correção dos espectros do ácido fólico. Observou-se que para comprimentos de onda inferiores a 250 nm há aumento da absorbância, principalmente para o solução tampão fosfato de sódio e potássio e para a solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. A solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ apresentou máxima absorção próxima a 207 nm, similar ao valor de 210 nm encontrado por Tong *et al.* (2020). O espectro da água reagente apresentou comportamento compatível ao reportado por Shalatonin e Pollack (2022), sem presença de bandas de absorção ao longo do espectro. Para todas as soluções testadas não foi verificado sinal indicativo de interferentes na região de interesse para este trabalho (255 a 365 nm).

Figura 10 – Espectro de absorção no UV-Vis da água, solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹

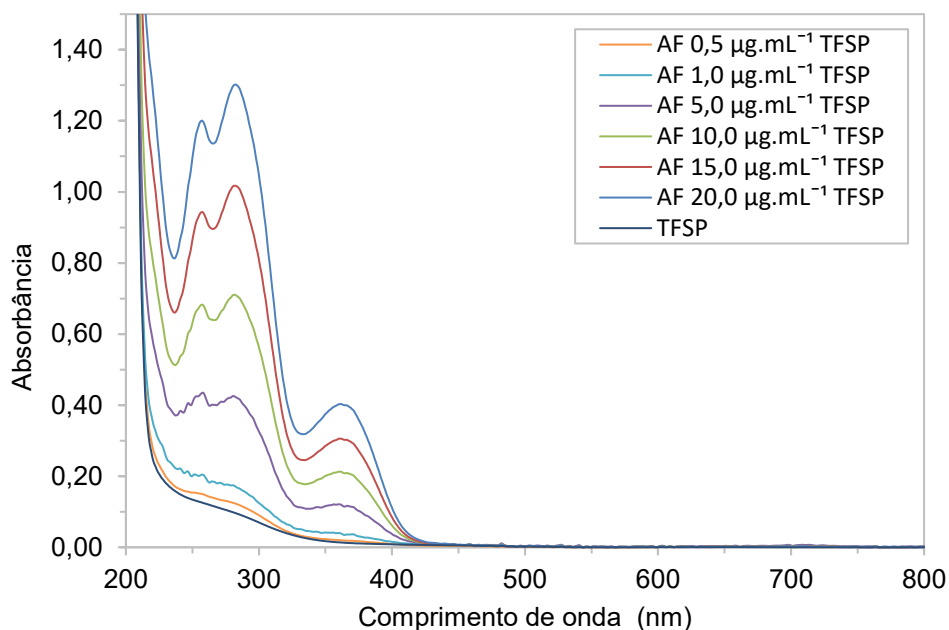


Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: TFSP - tampão fosfato de sódio e potássio.

Diferentes concentrações de ácido fólico foram caracterizadas por espectrofotometria UV-Vis na região de comprimento de onda entre 200 e 800 nm. Os espectros com correção de linha de base e suavização estão apresentados na Figura 11 para a solução tampão fosfato de sódio e potássio e na Figura 12 para a solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

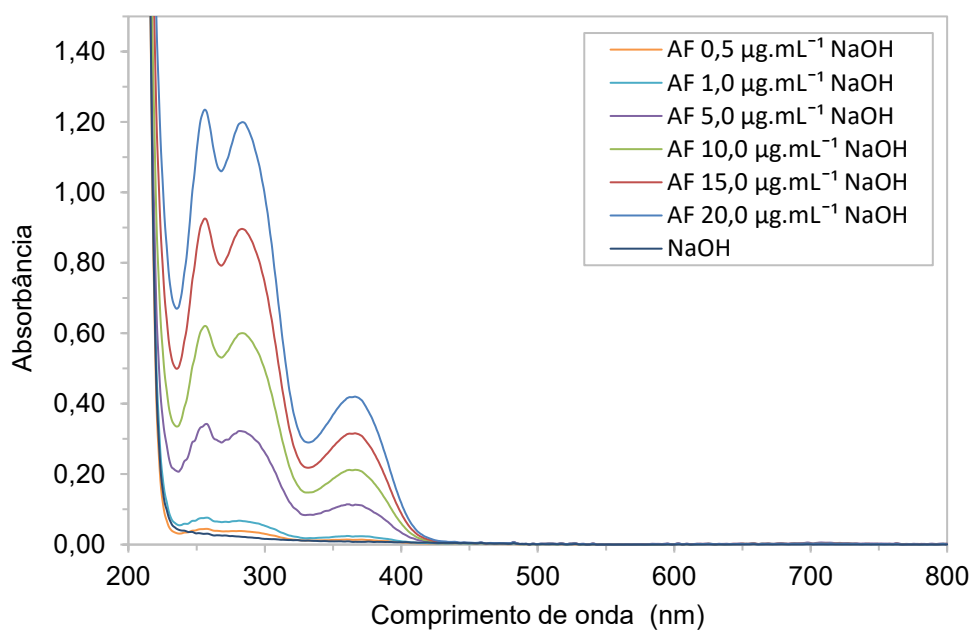
Figura 11 – Espectro de absorção no UV-Vis de diferentes concentrações de ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AF - ácido fólico; TFSP - tampão fosfato de sódio e potássio.

Figura 12 – Espectro de absorção no UV-Vis de diferentes concentrações de ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹



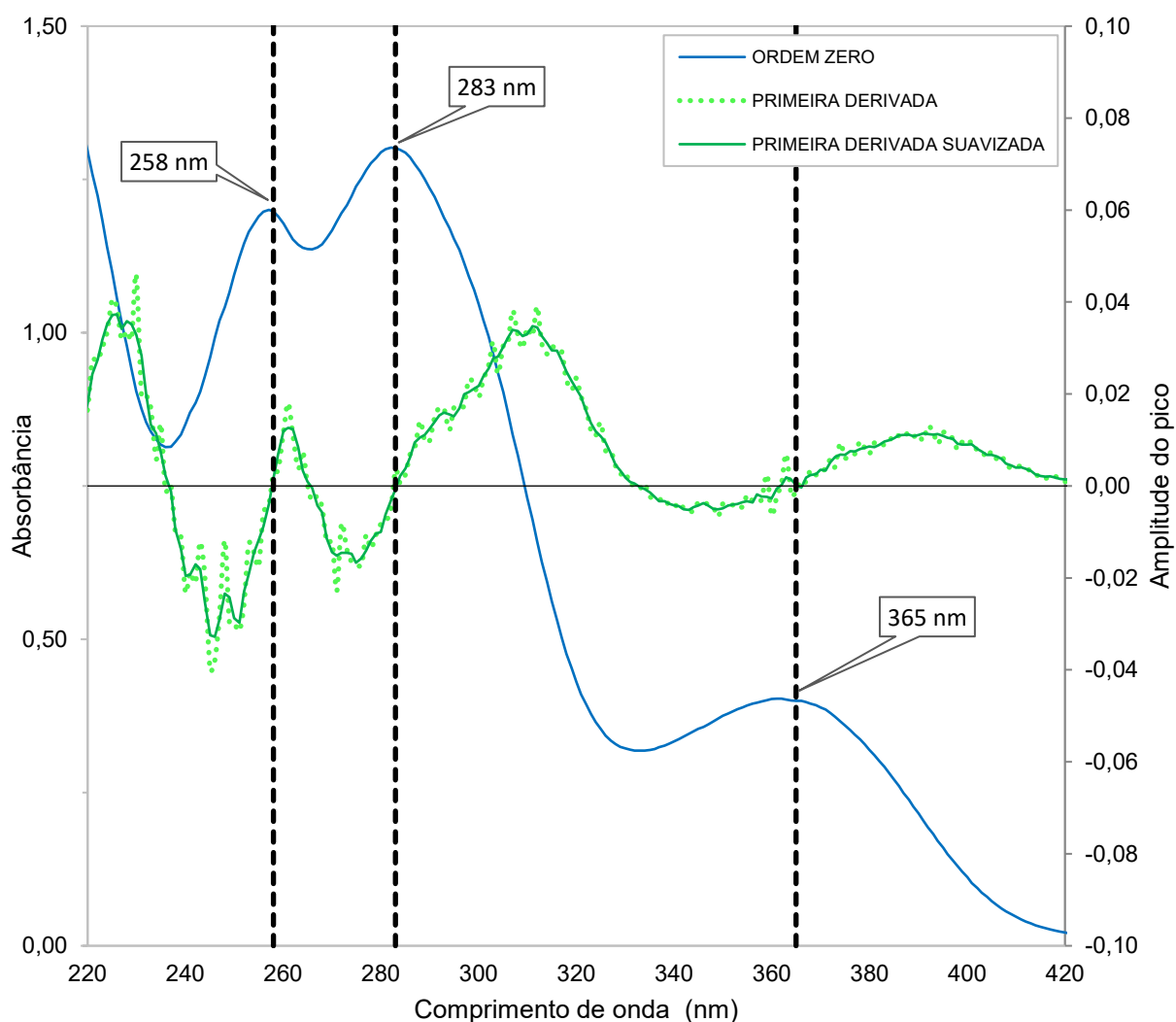
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AF - ácido fólico.

A observação visual dos espectros permite verificar a ocorrência de 3 bandas distintas de absorção máximas do ácido fólico, tanto na solução tampão fosfato de sódio e potássio quanto em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Essas bandas de absorção máxima são características do ácido fólico, conforme relatado por Pérez (2017), no qual a absorbância nos comprimentos de onda de 283 nm e 256 nm é devida a presença de grupos cromóforos da subunidade ácido *p*-aminobenzóico conjugada ao aminoácido glutamato e a absorção em 356 nm se deve a presença da subunidade pteridina.

De acordo com Owen (2000) a espectrofotometria derivativa permite confirmar a identidade de um analito. No espectro do ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio (Figura 13), foi possível visualizar 3 pontos de intersecção da primeira derivada que indicam três $\lambda_{\text{máx}}$ para o ácido fólico em 258 nm, 283 nm e 365 nm.

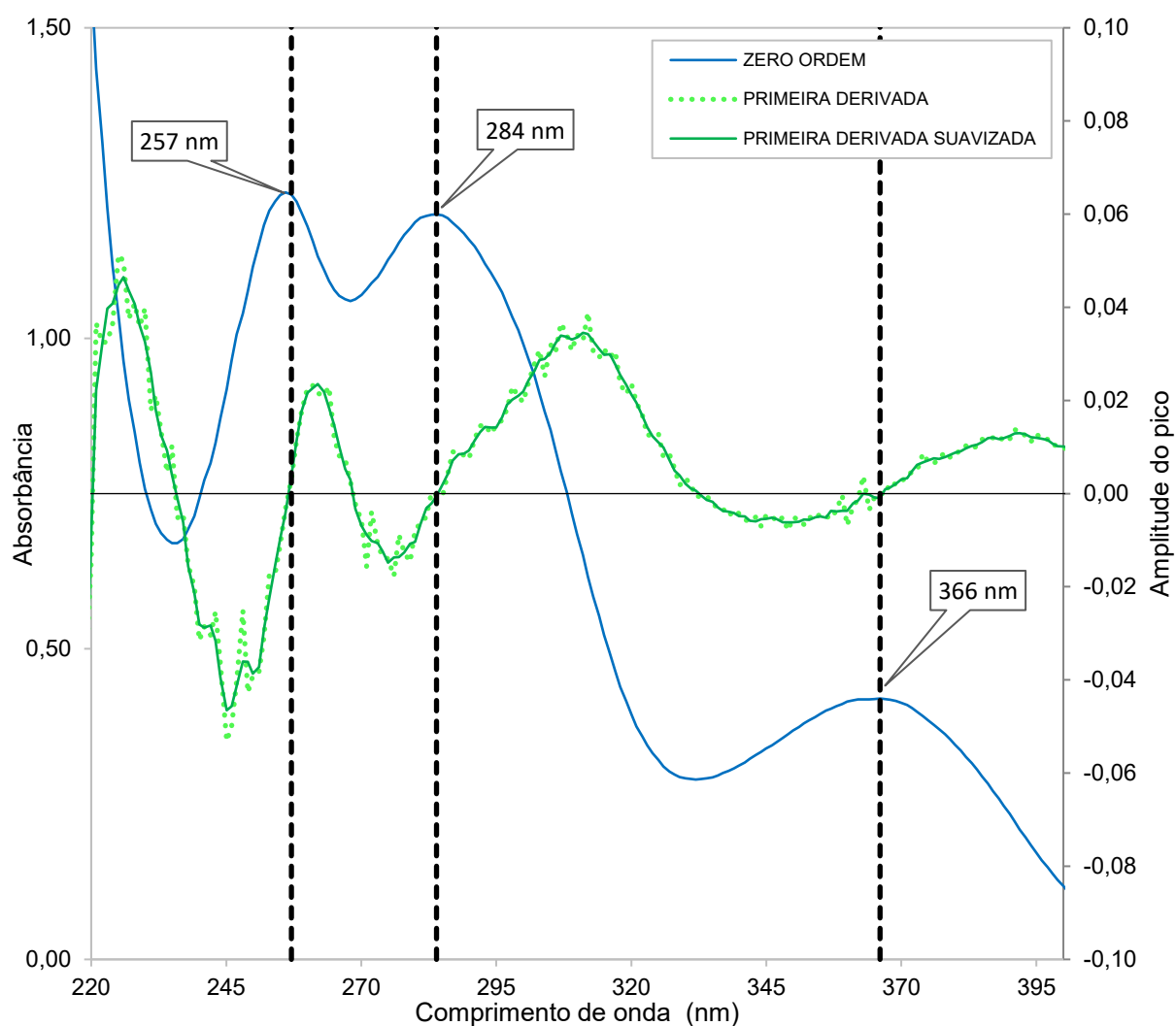
Figura 13 – Espectros de ordem zero e primeira derivada de ácido fólico $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução tampão fosfato de sódio e potássio



Fonte: elaborado pelo autor.

Para o ácido fólico em solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ o comportamento espectral observado na Figura 14 foi similar ao encontrado para o solução tampão fosfato de sódio e potássio, porém com $\lambda_{\text{máx}}$ em 257 nm, 284 nm e 366 nm.

Figura 14 – Espectros de ordem zero e primeira derivada de ácido fólico $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$



Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com aqueles observados por Modupe, Maurras e Diosady (2020), que avaliaram o comportamento de solução de ácido fólico ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em carbonato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), em pH 11,1 e encontraram máxima absorção em 256 nm, 283 nm e 366 nm. Ribeiro *et al.* (2016) verificaram o comportamento espectral de solução de ácido fólico $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em carbonato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, e observaram que a máxima absorção foi nos comprimentos de 255,5 nm, 283,0 nm e 365,5 nm. Matias *et al.* (2014) relataram 4 comprimentos de onda de máxima absorção em 217 nm, 257 nm, 282,5 nm e 361,5 nm, para ácido fólico ($17,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em solução tampão

NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (0,1 mol.L⁻¹; pH 9,0), muito próximos aos comprimentos de onda de 258 nm, 283 nm e 366 nm encontrados no presente trabalho.

4.1.3 Avaliação da linearidade

Após a determinação dos $\lambda_{\text{máx}}$ do ácido fólico as curvas de calibração foram construídas na faixa de concentração de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg.mL⁻¹ em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, considerando os dados com correção de linha de base, correção de branco e aplicação de suavização obtidos no item 4.1.2 para a avaliação por regressão linear. Foram utilizados dois intervalos de valores, ± 2 nm e ± 5 nm, em torno dos $\lambda_{\text{máx}}$ para aquisição dos dados de cada ponto da curva.

Os coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r) para o ácido fólico tanto em solução tampão fosfato de sódio e potássio quanto em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, (Tabelas 4 e 5), foram superiores a 0,999 demonstrando relação linear do método testado. Observou-se que em ambas as soluções o coeficiente angular é similar para todos os $\lambda_{\text{máx}}$, e que na região de 365 nm e 366 nm o coeficiente angular diminui consideravelmente em relação aos demais $\lambda_{\text{máx}}$ conferindo menor sensibilidade para quantificação de ácido fólico nesta região. Esses valores estão em consonância com os valores encontrados na literatura para ácido fólico, quando utilizado hidróxido de sódio ou tampões a base de fosfatos, nos quais os valores de coeficientes foram superiores a 0,999 (Elkhazein *et al.*, 2022; Kayan; Hemn, 2022; Modupe; Maurras; Diosady, 2020; Ribeiro *et al.*, 2016).

Tabela 4 – Parâmetros de regressão linear para ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio

Parâmetros de regressão	Comprimento de onda (nm)					
	258 $\pm$ 5	258 $\pm$ 2	283 $\pm$ 5	283 $\pm$ 2	365 $\pm$ 5	365 $\pm$ 2
Coeficiente angular (b)	0,0524 $\pm$ 0,0008	0,0528 $\pm$ 0,0009	0,0597 $\pm$ 0,0006	0,0601 $\pm$ 0,0007	0,0191 $\pm$ 0,0002	0,0192 $\pm$ 0,0002
Coeficiente linear (a)	0,0174 $\pm$ 0,0092	0,0213 $\pm$ 0,0108	0,0116 $\pm$ 0,0075	0,0116 $\pm$ 0,0074	0,0029 $\pm$ 0,0027	0,0017 $\pm$ 0,0023
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9990	0,9987	0,9995	0,9995	0,9993	0,9995
Coeficiente de correlação (r)	0,9995	0,9993	0,9997	0,9998	0,9997	0,9998

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Parâmetros de regressão linear para ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹

Parâmetros de regressão	Comprimento de onda (nm)					
	257 ± 5	257 ± 2	284 ± 5	284 ± 2	366 ± 5	366 ± 2
<i>Coeficiente angular (b)</i>	0,0590 ± 0,0005	0,0599 ± 0,0006	0,0589 ± 0,0004	0,0592 ± 0,0004	0,0206 ± 0,0001	0,0207 ± 0,0001
<i>Coeficiente linear (a)</i>	-0,0108 ± 0,0062	-0,0101 ± 0,0071	-0,0101 ± 0,0049	-0,0101 ± 0,0051	-0,0031 ± 0,0016	-0,0032 ± 0,0016
<i>Coeficiente de determinação (r²)</i>	0,9996	0,9996	0,9998	0,9998	0,9996	0,9998
<i>Coeficiente de correlação (r)</i>	0,9998	0,9998	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999

Fonte: elaborado pelo autor.

Para determinar se houve diferença significativa com relação ao intervalo de dados utilizados para determinação dos valores em torno do $\lambda_{\text{máx}}$, foi realizada a comparação dos coeficientes angulares (*b*) para os grupos de dados obtidos nos intervalos de $\lambda \pm 2$ nm e $\lambda \pm 5$ nm para solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. O teste utilizado foi o teste *t* para dados pareados com nível de significância de 5% (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores encontrados para teste *t* pareado para os conjuntos $b_{\lambda \pm 2\text{nm}}$ e $b_{\lambda \pm 5\text{nm}}$, com nível de significância de 5% e 2 graus de liberdade

	<i>S_d</i>	<i>t</i> calculado	<i>p</i> -valor
TSFP	0,00694	0,68	0,386
NaOH	0,00085	0,90	0,235

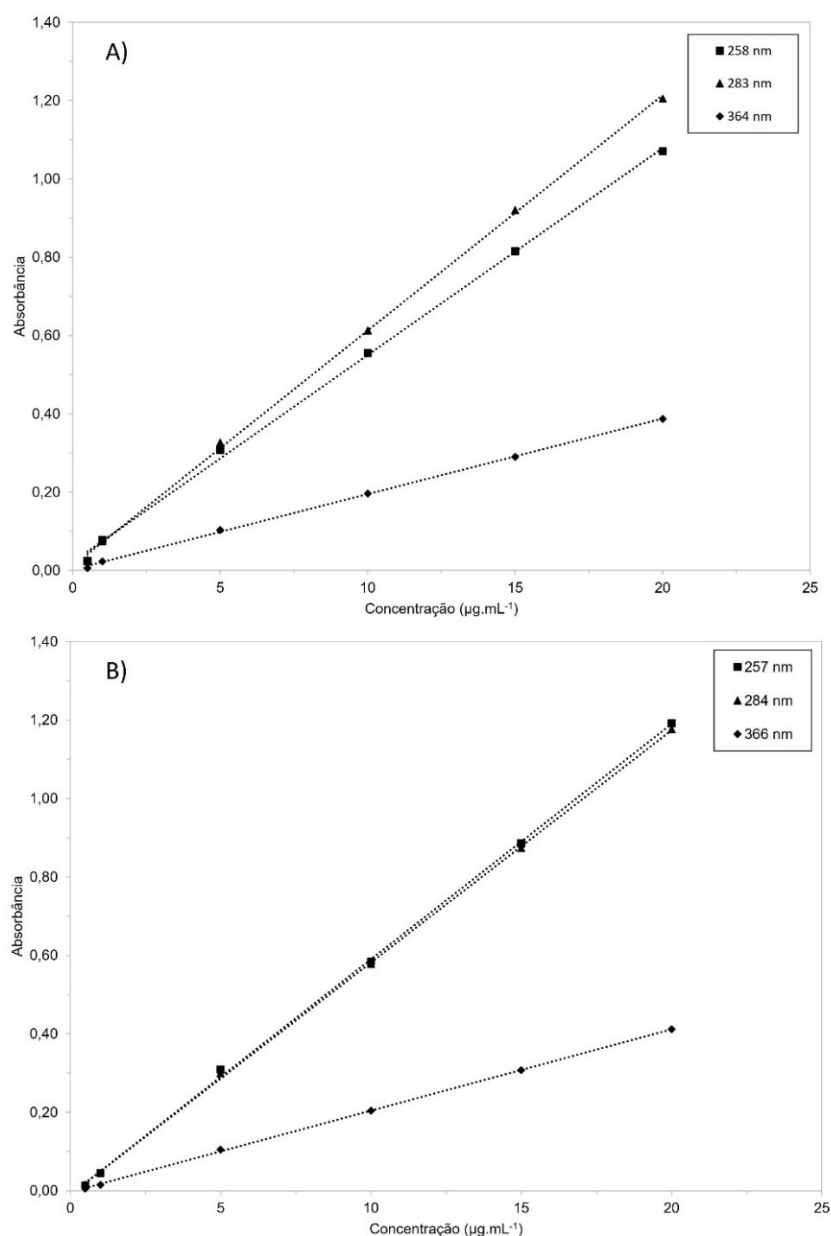
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: *S_d* - desvio padrão das diferenças das observações pareadas; TSFP - solução tampão fosfato de sódio e potássio.

Os resultados apontaram que não houve diferença significativa entre os conjuntos $b_{\lambda \pm 2\text{nm}}$ e $b_{\lambda \pm 5\text{nm}}$. Ambos os *p*-valores calculados (Tabela 6) foram maiores que 0,05 e os valores *t* menores que o valor *t*_{crítico} (*t*_{crítico} 4,30), com 95% de confiança. Dessa forma conclui-se que a hipótese nula é verdadeira, portanto, não há diferença significativa entre os coeficientes angulares dos dois grupos. Optou-se a partir desta etapa do trabalho utilizar os dados obtidos a partir dos espectros para os $\lambda_{\text{máx}} \pm 2$ nm.

A Figura 15 apresenta as curvas de calibração obtidas para o ácido fólico, conforme apresentado nas Tabelas 4 e 5, e foi possível observar que os modelos apresentam linearidade e os valores dos coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r) atendem ao critério de aceitação (r) superior a 0,990 estabelecido pela RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 (Brasil, 2017b). É possível observar na Figura 15 B que as curvas para 257 nm e 284 nm se sobrepõem.

Figura 15 – Curvas de calibração do ácido fólico em $\lambda_{\text{máx}} \pm 2$ nm em solução tampão fosfato de sódio e potássio (A) e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (B) em diferentes comprimentos de onda



Fonte: elaborado pelo autor

Os limites de detecção e quantificação da Tabela 7 foram calculados a partir de 10 replicatas dos desvios padrão dos brancos e dos coeficientes angulares das curvas conforme as Equações 4 e 5.

Tabela 7 – Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹

Comprimento de onda (nm)	LOD (µg.mL ⁻¹)	LOQ (µg.mL ⁻¹)
TFSP		
258	0,04	0,12
283	0,03	0,09
365	0,05	0,17
NaOH		
257	0,08	0,25
284	0,06	0,18
366	0,06	0,18

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: TSFP - tampão fosfato de sódio e potássio.

Os limites encontrados nesta etapa do trabalho estão abaixo da menor concentração da curva (0,5 µg.mL⁻¹), indicando que o intervalo proposto para a faixa de trabalho e construção das curvas de linearidade foi adequado.

Elkhazein *et al.* (2022) obtiveram valores de 2,73 µg.mL⁻¹ e 8,27 µg.mL⁻¹ de LOD e LOQ de ácido fólico, respectivamente, utilizando solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ em 255 nm. Esses valores são cerca de 50 vezes superiores ao encontrado neste trabalho. Ribeiro *et al.* (2016) obtiveram valores de LOD e LOQ em torno de 10 vezes acima dos encontrados neste trabalho, utilizando a mesma concentração de solução de NaOH do presente estudo.

4.1.4 Determinação dos coeficientes de absorvidade molar

Na Tabela 8 constam os valores calculados para a absorvidade molar do ácido fólico nos comprimentos de onda máximos observados nas soluções de tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 8 – Valores experimentais de absorvividade molar para ácido fólico

$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
TFSP	
258	23334 ± 427
283	26510 ± 295
365	8513 ± 92
NaOH	
257	26466 ± 278
284	26113 ± 200
366	9174 ± 63

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: TFSP - tampão fosfato de sódio e potássio; $\lambda_{m\acute{a}x}$ - comprimento de onda máximo (nm).

Os valores obtidos para a absorvividade molar do ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ são similares, entretanto nos comprimentos de onda de 257-258 nm e 365-366 nm, os valores de absorvividade são superiores para a solução de NaOH que possui pH de 12,67, maior que a solução tampão fosfato de sódio e potássio que possui pH igual a 8,76. O aumento da absorvividade molar em solução de NaOH pode estar relacionada a desprotonação do nitrogênio pteridínico, que ocorre em pKa 9,99, conforme apresentado no item 4.1.1. De acordo com Thangavel *et al.* (2022) compostos orgânicos que possuem vários sítios ionizáveis podem apresentar alterações no espectro UV, contanto que os grupos ionizáveis possuam variação significativa na absorvividade molar.

Off *et al.* (2005) encontraram valores de absorvividade molar de ácido fólico em tampão fosfato salina pH 7, iguais a 25220 e 6675 L.mol⁻¹.cm⁻¹ a 280 e 350 nm, respectivamente, próximos aos encontrados neste trabalho. Gomes (2021) reportou absorvividade molar de 3,2 x 10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹ a 280 nm para o ácido fólico em solução de DMSO, valor inferior ao obtido neste estudo.

4.1.5 Avaliação da estabilidade do ácido fólico

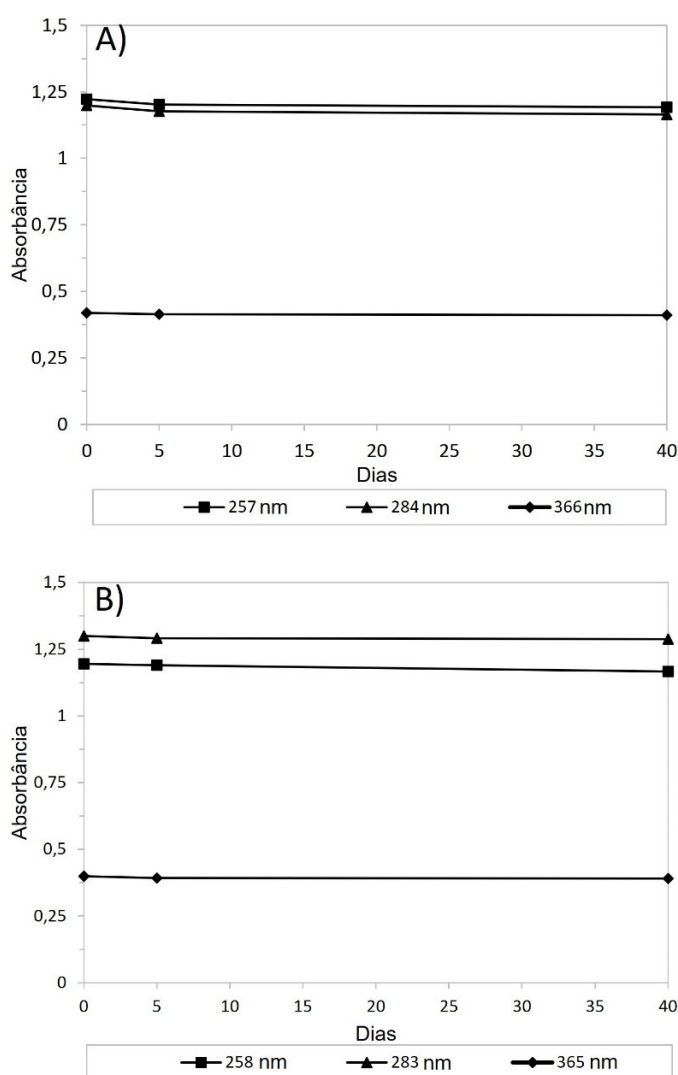
De acordo com o Codex Alimentarius a estabilidade de um analito deve ser avaliada durante o desenvolvimento e validação de um método a fim de acessar as condições de armazenamento e tempo nas quais há garantia de que a manutenção

das características do analito permanecem minimamente alteradas e dentro de um limite de aceitação determinado (FAO, 2014).

A estabilidade do ácido fólico foi avaliada sob condições de refrigeração a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 40 dias de armazenamento (Figura 16).

Pode-se observar visualmente nos gráficos da Figura 16 que ao longo dos 40 dias de armazenamento o ácido fólico manteve um comportamento estável, sem alterações visuais discrepantes na absorbância.

Figura 16 – Gráfico de estabilidade do ácido fólico ($20,0\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) em solução tampão fosfato de sódio e potássio (A) e solução de NaOH $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ (B) em temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e diferentes comprimentos de onda



Fonte: elaborado pelo autor.

Em relação a recuperação (%) do ácido fólico após o armazenamento, foi observado (Tabela 9) que não houve variação de concentração superior a 2 % nos primeiros dias de armazenamento (5 dias), entretanto após 40 dias, a maior variação observada foi de 2,8% para o ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. De acordo com o preconizado pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica (Brasil, 2011a) um padrão analítico estável não deve ultrapassar 2 % de degradação máxima. Portanto, como segurança, as soluções padrão de ácido fólico foram mantidas em frasco âmbar, a 5 °C ± 3 °C por até 5 dias de armazenamento.

Tabela 9 – Recuperação (%) do ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ em temperatura de 5 °C ± 3 °C

<i>Comprimento de onda (nm)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	
	<i>5 dias</i>	<i>40 dias</i>
TFSP		
258	99,5	97,6
283	99,3	99,0
365	98,4	97,6
NaOH		
257	98,3	97,5
284	98,2	97,2
366	98,8	97,7

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 PREPARO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESPECTROFOTOMÉTRICA DO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO

4.2.1 Preparo e caracterização físico-química

O DES preparado a partir de cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico, na proporção molar de 1:4 (p/p), respectivamente, apresentou aspecto homogêneo, transparente, líquido, de cor amarelada (Figura 17) e com forte odor pungente característico. Também apresentou aspecto viscoso, sendo menos denso que a água. Ao ser colocado em fase aquosa se apresenta como duas fases distintas, devido a sua característica hidrofóbica. Ao ser mantido em banho de gelo não solidifica. O tempo total para o preparo do DES foi de cerca de 15 min.

Figura 17 – Aspecto do solvente eutético profundo preparado



Fonte: elaborado pelo autor.

No presente estudo, o DES preparado a base de cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico apresentou valor de densidade a 20 °C igual a 0,8552 g.mL⁻¹, abaixo do valor da densidade da água a 20°C (0,9982 g.mL⁻¹) e está dentro da faixa de 0,85 a 1,5 g.mL⁻¹ conforme relatado por Cao e SU (2021) para solventes eutéticos profundos hidrofóbicos. Faraji (2019) obteve densidade 0,93 g.mL⁻¹ para a mesma composição de DES, essa diferença em relação ao presente estudo pode estar relacionada a qualidade dos reagentes utilizados bem como a técnica utilizada para medição. A hidrofobicidade e a baixa densidade foram observadas visualmente pela formação de uma fase orgânica na parte superior da fase aquosa conforme demonstrado na Figura 7.

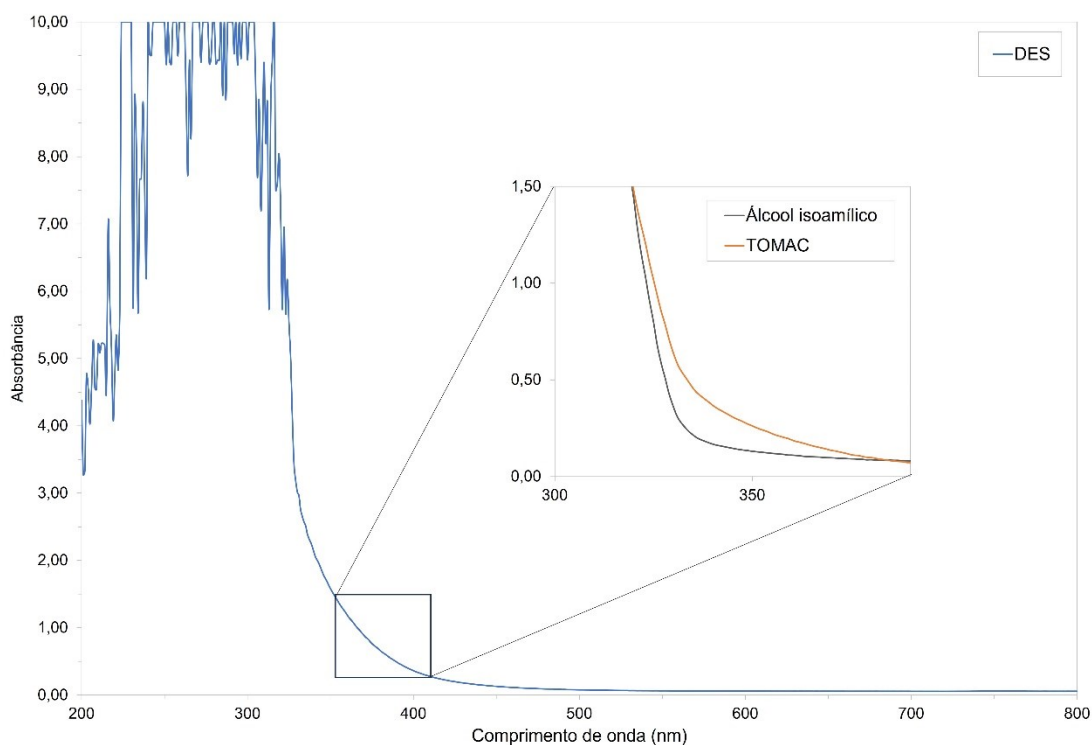
Quanto ao índice de refração, o valor encontrado foi de 1,4417 a 25 °C. Há pouca informação disponível na literatura e nenhuma sobre o DES preparado neste trabalho. O índice de refração pode ser utilizado para determinar pureza, quantificação e identificação (Chen *et al.*, 2022) bem como auxiliar estudos para determinar as propriedades elétricas e a ocorrência de ligações de hidrogênio entre as substâncias que formam o DES (Hansen *et al.*, 2020).

Cabe ressaltar que são escassos os dados da literatura sobre as propriedades físico-químicas dos DES, o que também foi observado por outros autores (Hansen *et al.*, 2020).

4.2.2 Caracterização do comportamento espectrofotométrico do DES e seus componentes

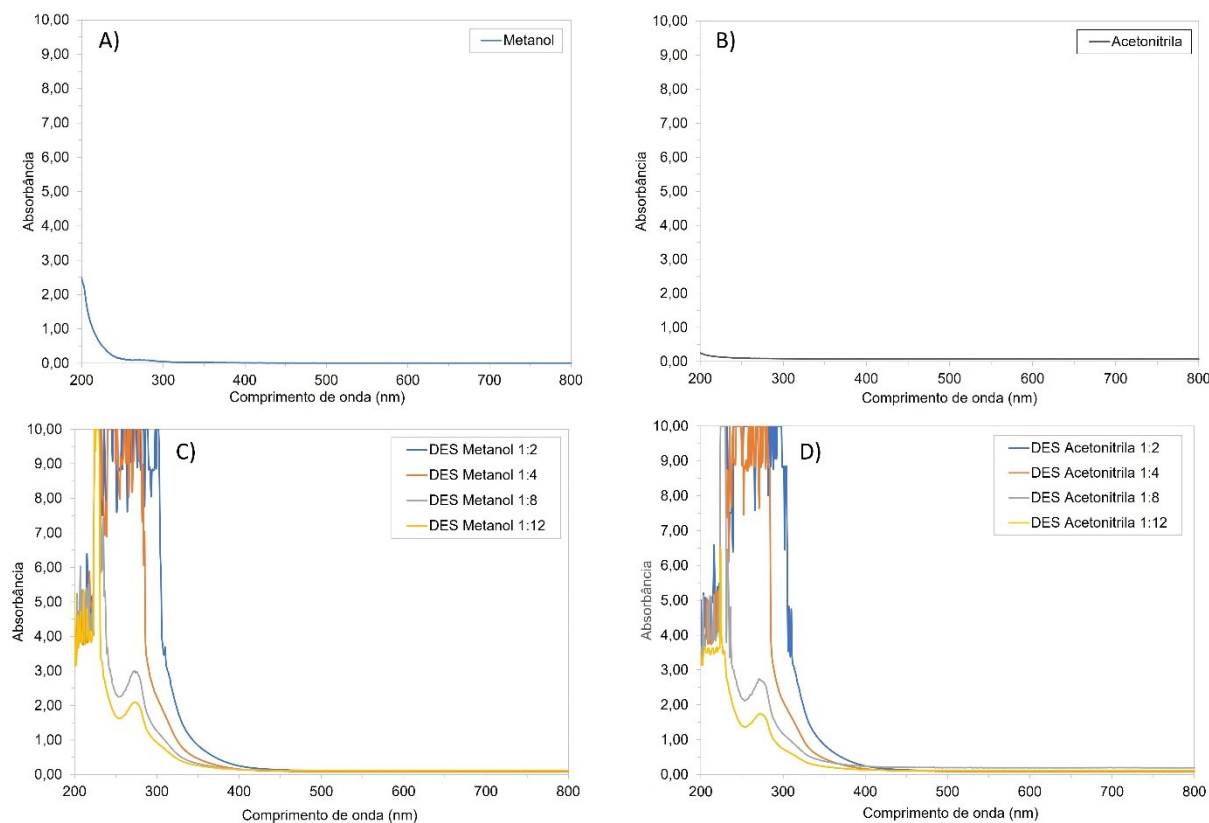
Os espectros de absorbância obtidos a partir dos dados brutos do DES, cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico estão apresentados na Figura 18. No espectro do DES, a partir da região inferior a 350 nm, houve um aumento expressivo da banda de absorbância. No detalhe da Figura 18 é possível observar os espectros do álcool isoamílico e do cloreto de trioctilmetilamônio e o efeito aditivo que ambos os compostos causam na formação do espectro do DES. Foram então conduzidos testes diluindo o DES com metanol basificado e acetonitrila nas proporções 1:2, 1:4, 1:8 e 1:12 (v/v) a fim de verificar o comportamento dos espectros das soluções diluídas de DES (Figura 19).

Figura 18 – Espectro de absorção no UV-Vis do DES mostrando no detalhe os espectros do cloreto de trioctilmetilamônio (TOMAC) e álcool isoamílico



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 19 – Espectro de absorção no UV-Vis do metanol (A), acetonitrila (B) e de diferentes diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:12 (v/v) do DES em metanol (C) e em acetonitrila (D)



Fonte: elaborado pelo autor.

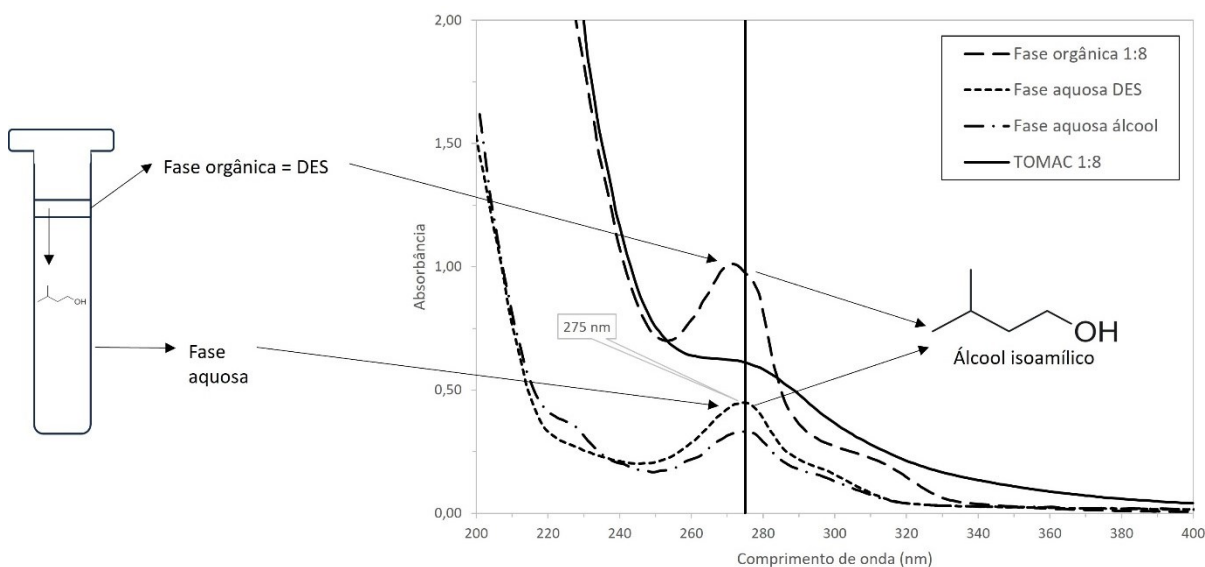
Legenda: DES = solvente eutético profundo.

Nas Figura 19 A e B, observou-se que os espectros do metanol e da acetonitrila não apresentaram sinal de absorção. O metanol apresenta elevação do sinal a partir da região inferior a 250 nm, porém este comportamento está em acordo com o reportado por SHIMADZU (2020).

Os espectros das diluições do DES em metanol basificado e acetonitrila, apresentados nas Figura 19 C e D demonstram o efeito da diluição dos solventes empregados. A partir da diluição 1:8 (v/v), tanto para diluição com metanol quanto para acetonitrila, há o aparecimento de uma banda de absorção na região de 275 a 280 nm, próxima a região de 257 a 283 nm nas quais foram identificados dois picos de absorção característicos para o ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. A presença de absorção do DES nessa região pode dificultar a utilização da faixa de comprimento de onda de 257 a 283 nm, para quantificação do ácido fólico utilizando o DES como sistema extrator.

A Figura 20 apresenta o resultado obtido para o teste de verificação de transferência de compostos do DES para a fase aquosa. No gráfico observa-se que o pico na região de 275-280 nm que apareceu no espectro do DES (fase orgânica) também pode ser observado na fase aquosa, nesta mesma região de comprimento de onda. Foi realizado um teste para verificar se este pico poderia ser devido a transferência de massa dos componentes do DES (cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico). Para tanto diluiu-se o cloreto de trioctilmetilamônio na proporção de 1:8 (v/v) em metanol e em seguida realizada a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda entre 200 nm a 800 nm. Também foi preparada uma solução com 5 mL de água ultra purificada e 0,1 mL de álcool isoamílico, a qual foi agitada e após a separação de fases, uma alíquota foi retirada da fase aquosa e realizada leitura no espectrofotômetro nas mesmas condições descritas anteriormente.

Figura 20 – Espectro de absorção UV mostrando a transferência de massa de álcool isoamílico da fase orgânica DES para a fase aquosa



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: fase orgânica 1:8 - diluição 1:8 (v/v) do DES em metanol que esteve em contato com a água ultra purificada; fase aquosa DES - água ultra purificada que esteve em contato com o DES; fase aquosa álcool - água ultra purificada que entrou em contato com o álcool isoamílico; TOMAC 1:8 - diluição 1:8 do cloreto de trioctilmetilamônio em metanol.

Observou-se na Figura 20 que o cloreto de trioctilmetilamônio não apresentou pico de absorbância similar ao pico do DES em 275 nm, porém a fase aquosa do teste com álcool isoamílico apresentou um pico precisamente na região de 275 nm na qual

aparece pico de absorbância no DES, indicando que há transferência de alguma porção de massa do álcool isoamílico da fase orgânica para a fase aquosa. O álcool isoamílico possui solubilidade em água a 20 °C igual a 2,830 % em peso (Shchelokova *et al.*, 2012).

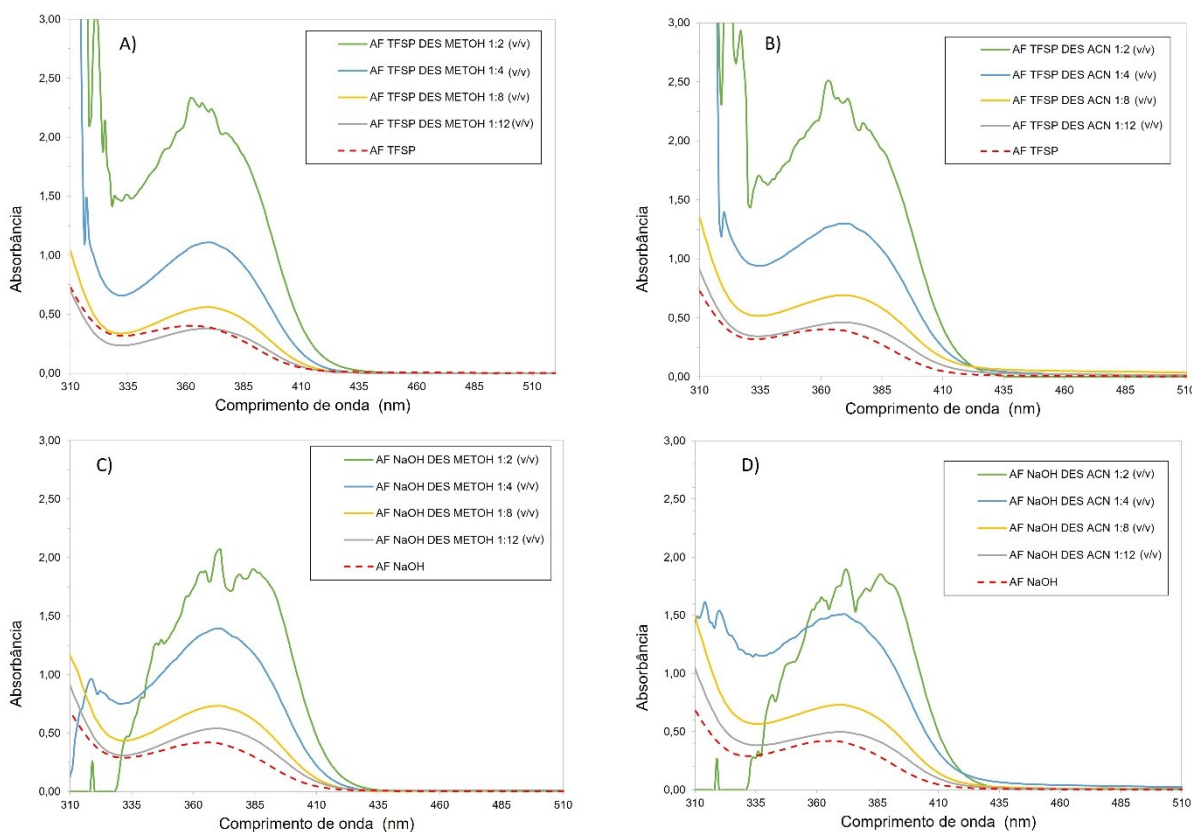
Além disso, o espectro permite observar que na região acima de 350 nm o sinal de fundo do DES é muito baixo, e considerando que no item 4.1.2 foi determinado pico de absorção para o ácido fólico em comprimento de onda de 364-365 nm, tanto para a solução de tampão fosfato de sódio e potássio quanto para a solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, essa região de absorção ultravioleta pode ser explorada para a determinação do analito de interesse.

Os testes realizados até o momento permitem concluir que o solvente eutético profundo apresenta sinal de interferência na região de 257 a 283 nm, faixa na qual o ácido fólico apresenta dois picos característicos e de maior intensidade de sinal de absorbância por espectrofotometria UV-Vis (item 3.1.2), impossibilitando a utilização desta faixa para quantificação de ácido fólico. Entretanto, na faixa de comprimento de onda de 365-366 nm, na qual o ácido fólico apresenta pico com menor intensidade (item 4.1.2), o sinal de fundo do DES é menor. A faixa de 365-366 nm foi explorada nas etapas seguintes para quantificação de ácido fólico.

4.3 MICROEXTRAÇÃO DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO DE ÁCIDO FÓLICO ASSISTIDA POR AGITAÇÃO EM VÓRTEX COM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO

A Figura 21 apresenta os espectros obtidos no teste de extração do ácido fólico 20,0 µg.mL⁻¹ utilizando o DES para extração a partir da solução tampão fosfato de sódio e potássio e solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, com as diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:12 (v/v) de metanol e acetonitrila. A partir desta etapa do trabalho optou-se por apresentar os espectros na faixa de 310 a 510 nm, devido a presença de banda espectral do álcool isoamílico na região de 275 a 280 nm, que pode interferir na absorção molecular do ácido fólico.

Figura 21 – Espectros de absorção no UV-Vis para extração de ácido fólico ($20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para os sistemas tampão fosfato de sódio e potássio/metanol (A), tampão fosfato de sódio e potássio/ acetonitrila (B), solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / metanol (C) e solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / acetonitrila (D)



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AF - ácido fólico; DES - solvente eutético profundo; TFSP - solução tampão fosfato de sódio e potássio; ACN - acetonitrila. As linhas sólidas representam o ácido fólico extraído pelo DES; as linhas tracejadas representam a extração de ácido fólico sem DES.

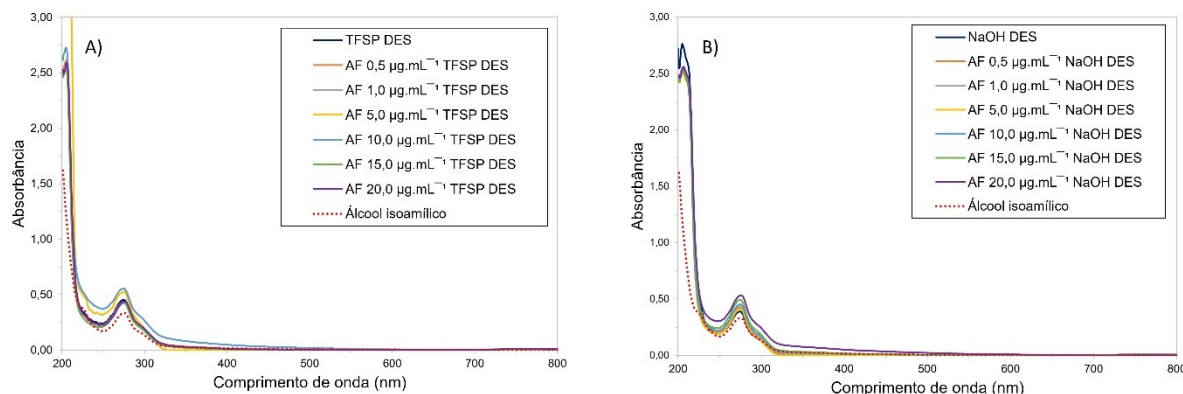
Na Figura 21 observa-se que nas diluições 1:2 (v/v) há presença de muito ruído, quando comparado aos demais espectros (1:4, 1:8 e 1:12) prejudicando o sinal do ácido fólico quando extraído pelo DES. Skoog, Holler e Nieman (2008), relatam que em concentrações mais altas de analito pode haver interações entre as cargas das moléculas absorventes devido a diminuição da distância entre as moléculas e por conseguinte alterações no espectro de absorção. Butreddy *et al.* (2021) estudaram as propriedades de auto-organização do ácido fólico em um sistema água/metanol e relataram que a partir de $2,72 \mu\text{M}$ o ácido fólico atinge a concentração crítica de agregação sendo capaz de se auto-organizar em estruturas supramoleculares.

Herbaut e Baranoff (2015) demonstraram que o coeficiente de absortividade pode ser alterado pela presença de estruturas supramoleculares formadas por trifenilenos em soluções aquosas, provocando alterações nos espectros de absorção.

Nas quatro condições avaliadas houve um aumento na leitura de absorbância em relação a extração de ácido fólico sem o DES, conforme observa-se na Figura 21. Entretanto, a diluição 1:12 (v/v) apresenta espectro bastante próximo ao do ácido fólico extraído sem o DES. Nojavan *et al.* (2015) apontam que o cloreto de trioctilmetilamônio, por ser um surfactante catiônico, tem a habilidade de formar um par iônico com o ácido fólico, com a subsequente extração para a fase orgânica. Faraji (2019) utilizou a combinação cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico como DES para extração de auxinas em água e sucos de frutas e concluiu que a presença de grupos carboxil desprotonados nas auxinas em pH acima dos valores de pKa das auxinas podem melhorar as condições para o pareamento iônico. Faraji, Mahmoodi-Maymand e Dastmalchi, (2020) concluíram que a extração de ácido fólico a partir de amostras da farinha de trigo por DES produzido a partir de cloreto de trioctilmetilamônio e álcool isoamílico, ocorre principalmente devido a interações eletrostáticas por pareamento iônico entre o DES e o ácido fólico.

Quanto ao comportamento dos extratos aquosos obtidos após a extração com o DES, a Figura 22 revela que não há picos característicos do ácido fólico em todas as concentrações avaliadas, tanto em solução tampão fosfato de sódio e potássio quanto em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

Figura 22 – Espectros de absorção no UV-Vis das fases aquosas obtidas a partir da microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para o tampão fosfato de sódio e potássio (A), solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (B) e espectro do álcool isoamílico em água



Fonte: elaborado pelo autor.

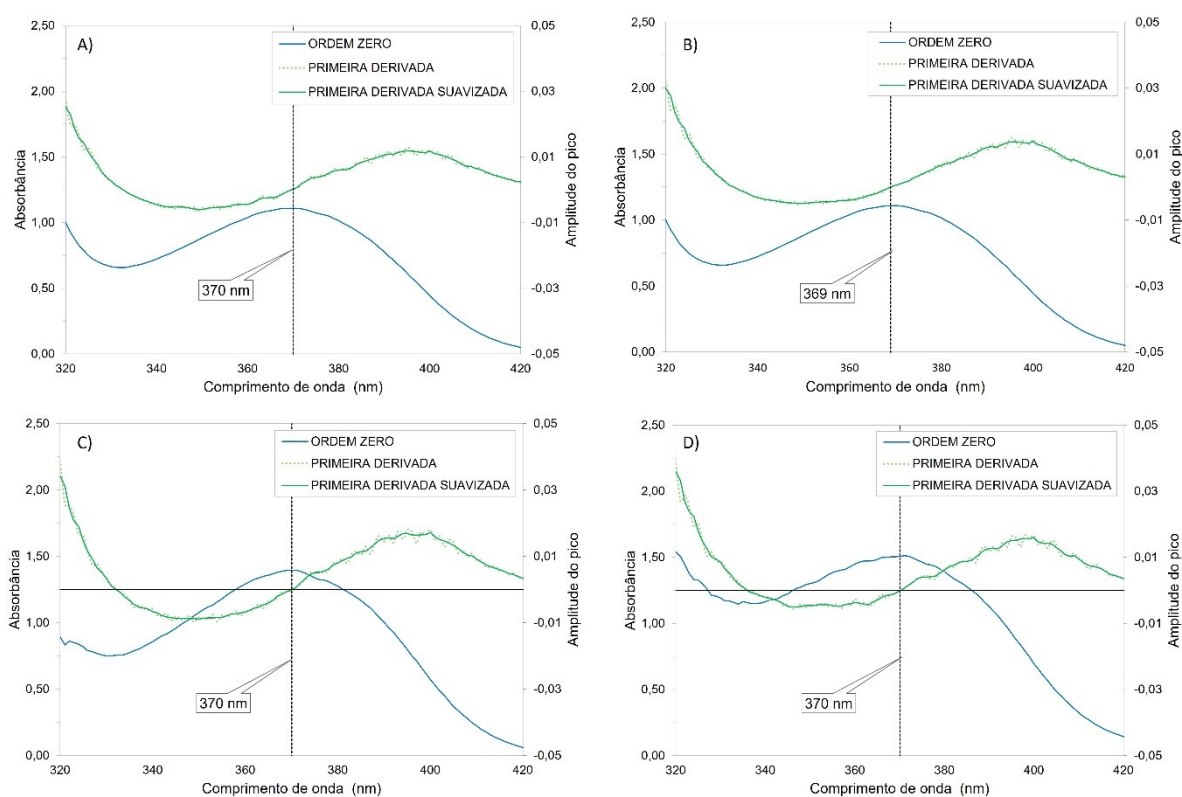
Legenda: AF - ácido fólico; DES - solvente eutético profundo; TFSP - solução tampão fosfato de sódio e potássio. As linhas sólidas representam as fases aquosas após extração pelo DES, as linhas tracejadas representam a fase aquosa da extração com álcool isoamílico.

O espectro apresentado na Figura 21 demonstra que o ácido fólico apresentou absorção na região de 330 a 410 nm, enquanto na Figura 22 pode-se observar que não há interferência dos componentes do DES, nesta mesma região de absorção. Pourmohammad, Faraji e Jafarinejad (2019) demonstraram a utilização de DES a base de fenol e cloreto de benziltriethyl amônio para extração de Cr (VI) em amostras de água sem interferência do DES na região de absorção de interesse do analito.

Os espectros da primeira derivada obtidos a partir da extração de ácido fólico (Figura 23) em ambos os sistemas tampão fosfato de sódio/DES e solução de NaOH/DES, evidenciam que o comprimento de absorção máxima é de 370 nm (Figura 23 A, C e D) com exceção do sistema TSFP/DES com diluição em acetonitrila (Figura 23 B) que exibiu comprimento de onda máximo em 369 nm. Em comparação aos testes realizados para extração de ácido fólico sem o DES, há um deslocamento da banda de absorção de cerca de 4 a 5 nm em direção à frequência mais baixa, indicando solvatocromismo positivo ou efeito batocrômico (Paczkowski; Campo, 2023). Dwamena e Raynie (2020) demonstraram o efeito batocrômico de DES a base de ácidos carboxílicos utilizados como substância doadora de hidrogênio. Kumar, Kumar e Pandey (2023) observaram que o aumento na concentração de cloreto de

lítio em um meio reacional causou efeito hipsocrômico no espectro de absorção de DES a base de cloreto de colina e glicerol.

Figura 23 – Espectros de zero ordem e primeira derivada do ácido fólico (20,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) extraído por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para os sistemas tampão fosfato de sódio e potássio/ metanol (A), tampão fosfato de sódio e potássio/ acetonitrila (B), solução de NaOH 0,1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ / metanol (C) e solução de NaOH 0,1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ / acetonitrila (D)



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: espectros das diluições 1:4 (v/v) de metanol e acetonitrila.

Considerando os resultados encontrados até o momento, as diluições 1:2 (v/v) e 1:12 (v/v), nos sistemas tampão fosfato de sódio e potássio/ metanol, tampão fosfato de sódio e potássio/ acetonitrila, solução de NaOH 0,1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ / metanol e solução de NaOH 0,1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ / acetonitrila não foram utilizadas devido a presença de interferentes no espectro e esta última por apresentar sinal próximo a extração de ácido fólico sem a presença do DES. Também as demais etapas do trabalho foram realizadas

considerando os comprimentos de onda máximo obtidos ($370 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ e $369 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$).

Quanto aos parâmetros de regressão linear apresentados nas Tabela 10 e Tabela 11, observou-se que o DES aumentou a sensibilidade do método, visto que tanto para extração de ácido fólico pelo DES em solução tampão fosfato de sódio e potássio quanto para solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ houve aumento do coeficiente angular em comparação aos obtidos para a extração de ácido fólico sem DES (Tabela 4 e 5). A maior sensibilidade foi encontrada para a extração em TFSP/DES seguida de diluição em acetonitrila na proporção de 1:4 (v/v). Os coeficientes de determinação para extração a partir do TFSP/DES variaram de 0,7896 a 0,8302, logo foram menores que a extração com o sistema NaOH/DES. A maior concentração de sais na solução tampão de fosfato de sódio e potássio com relação a solução de hidróxido de sódio pode interferir na extração do ácido fólico (Nojavan *et al.*, 2015). De acordo com Faraji, Mahmoodi-Maymand e Dastmalchi (2020) a adição de NaCl em concentrações de até 10 % (p/v) no meio extrator apresenta efeito negativo sobre a extração de ácido fólico pela combinação de cloreto de trioctilmetilamônio-álcool isoamílico como DES. Ge *et al.* (2019) também relataram diminuição da extração de parabenos em amostras de água quando a concentração de NaCl foi maior que 3 % (p/v), atribuindo à diminuição de transferência de massa com consequente aumento da viscosidade do solvente.

Tabela 10 – Parâmetros de regressão linear para microextração líquido-líquido dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo, de ácido fólico em solução tampão fosfato de sódio e potássio

Parâmetros de regressão	Metanol 1:4 (v/v)	Metanol 1:8 (v/v)	Acetonitrila 1:4 (v/v)	Acetonitrila 1:8 (v/v)
Coeficiente angular (b)	$0,0667 \pm 0,0167$	$0,0327 \pm 0,0084$	$0,0752 \pm 0,0208$	$0,0391 \pm 0,0102$
Coeficiente linear (a)	$0,0256 \pm 0,1872$	$0,0288 \pm 0,0945$	$0,0556 \pm 0,2518$	$0,0203 \pm 0,1233$
Coeficiente de determinação (r^2)	0,7991	0,7896	0,8120	0,8302
Coeficiente de correlação (r)	0,8939	0,8886	0,9011	0,9111

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: os valores para metanol foram obtidos a partir de $370 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ e para acetonitrila a partir de $369 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

Tabela 11 – Parâmetros de regressão linear para microextração líquido-líquido dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo de ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹

Parâmetros de regressão	Metanol 1:4 (v/v)	Metanol 1:8 (v/v)	Acetonitrila 1:4 (v/v)	Acetonitrila 1:8 (v/v)
<i>Coeficiente angular (b)</i>	0,0668 ± 0,0032	0,0367 ± 0,0012	0,0585 ± 0,0025	0,0283 ± 0,0012
<i>Coeficiente linear (a)</i>	0,0048 ± 0,0360	-0,0128 ± 0,0137	0,3101 ± 0,0284	0,1620 ± 0,0142
<i>Coeficiente de determinação (r²)</i>	0,9908	0,9955	0,9925	0,9920
<i>Coeficiente de correlação (r)</i>	0,9954	0,9978	0,9962	0,9960

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: todos os valores foram obtidos a partir de 370 nm ± 2 nm.

Nos espectros da fase aquosa obtidos a partir da extração com DES, apresentados na Figura 22, não foi possível observar a presença de ácido fólico, indicando que pode haver alguma interação na fase orgânica que afeta a linearidade, interferindo na medida da absorbância a partir do sistema TSFP/DES. Observou-se também que os coeficientes lineares das curvas do sistema TFSP/DES apresentaram desvios padrão altos, reforçando a não aplicabilidade desta combinação de solventes para a extração do ácido fólico em TFSP/DES. Quando se aplica a regressão linear no sistema TFSP/DES considerando-se apenas os pontos 0,5 a 10,0 µg.mL⁻¹ e excluindo os pontos 15,0 e 20,0 µg.mL⁻¹, o coeficiente de determinação (*r*²) passa para 0,8687 quando preparado em metanol 1:4 (v/v) e 0,9921 para acetonitrila 1:4 (v/v), porém com diminuição dos coeficientes angulares para 0,0407 e 0,0502, respectivamente. Estes resultados demonstram aumento da relação linear da faixa de concentração de 0,5 a 10,0 µg.mL⁻¹ para sistema TFSP/DES, porém com redução de sensibilidade e resultando em uma faixa de trabalho muito estreita.

Considerando as limitações encontradas para o sistema TSFP/DES, foram calculados apenas os coeficientes de absorvidade molar para o ácido fólico extraído a partir do sistema NaOH/DES, diluído em metanol e acetonitrila nas proporções 1:4 e 1:8 (v/v) (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores experimentais de absorvidade molar (ϵ em $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) para o ácido fólico extraído no sistema NaOH/DES a $370 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$

Diluição (v/v)	Metanol	Acetonitrila
1:4	29480 ± 1419	25823 ± 1122
1:8	16204 ± 542	12502 ± 561

Fonte: elaborado pelo autor.

Todos os valores obtidos foram superiores ao valor obtido para extração de ácido fólico em solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sem o DES em 365 nm ($\epsilon_{365} = 9174 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Os maiores valores foram obtidos nas diluições 1:4 (v/v) de metanol e acetonitrila, como esperado, considerando-se que a concentração de ácido fólico é maior que na diluição 1:8 (v/v). De acordo com Pavia *et al.* (2015), os valores obtidos para a absorvidade molar do ácido fólico no DES são considerados de alta intensidade de absorção ($> 10^4$).

4.3.1 Planejamento fatorial (2^3)

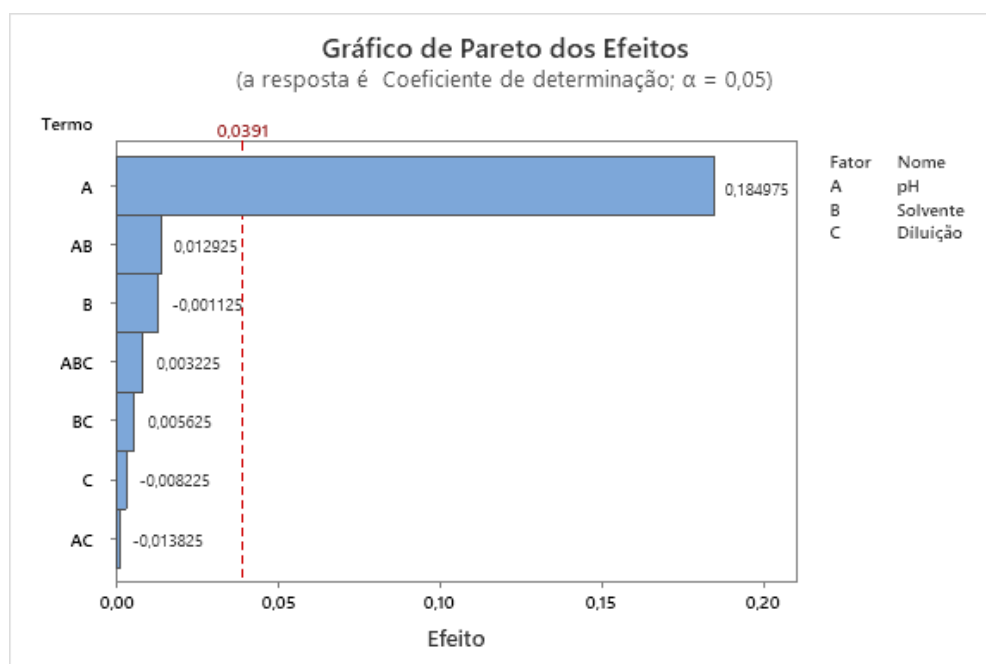
O planejamento foi realizado considerando como resposta os resultados obtidos a partir do coeficiente de determinação das curvas analíticas obtidas nos sistemas TFSP/DES e NaOH/DES. As variáveis (pH, solvente de diluição e fator de diluição do solvente), os níveis de resposta e as respostas geradas estão apresentadas na Tabela 13. As variáveis que influenciaram significativamente a determinação do ácido fólico pelo DES estão apresentadas no gráfico de Pareto (Figura 24)

Tabela 13 – Níveis reais e codificados das variáveis e respostas do planejamento fatorial 2^3

Teste	pH	Solvente de diluição	Fator de diluição do solvente	Resposta (r^2)
1	8,76 (-1)	Metanol (-1)	1:4 (-1)	0,7991
2	12,67 (+1)	Metanol (-1)	1:4 (-1)	0,9908
3	8,76 (-1)	Acetonitrila (+1)	1:4 (-1)	0,8120
4	12,67 (+1)	Acetonitrila (+1)	1:4 (-1)	0,9925
5	8,76 (-1)	Metanol (-1)	1:8 (+1)	0,7896
6	12,67 (+1)	Metanol (-1)	1:8 (+1)	0,9925
7	8,76 (-1)	Acetonitrila (+1)	1:8 (+1)	0,8302
8	12,67 (+1)	Acetonitrila (+1)	1:8 (+1)	0,9920

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 24 – Gráfico de Pareto para a resposta do planejamento fatorial

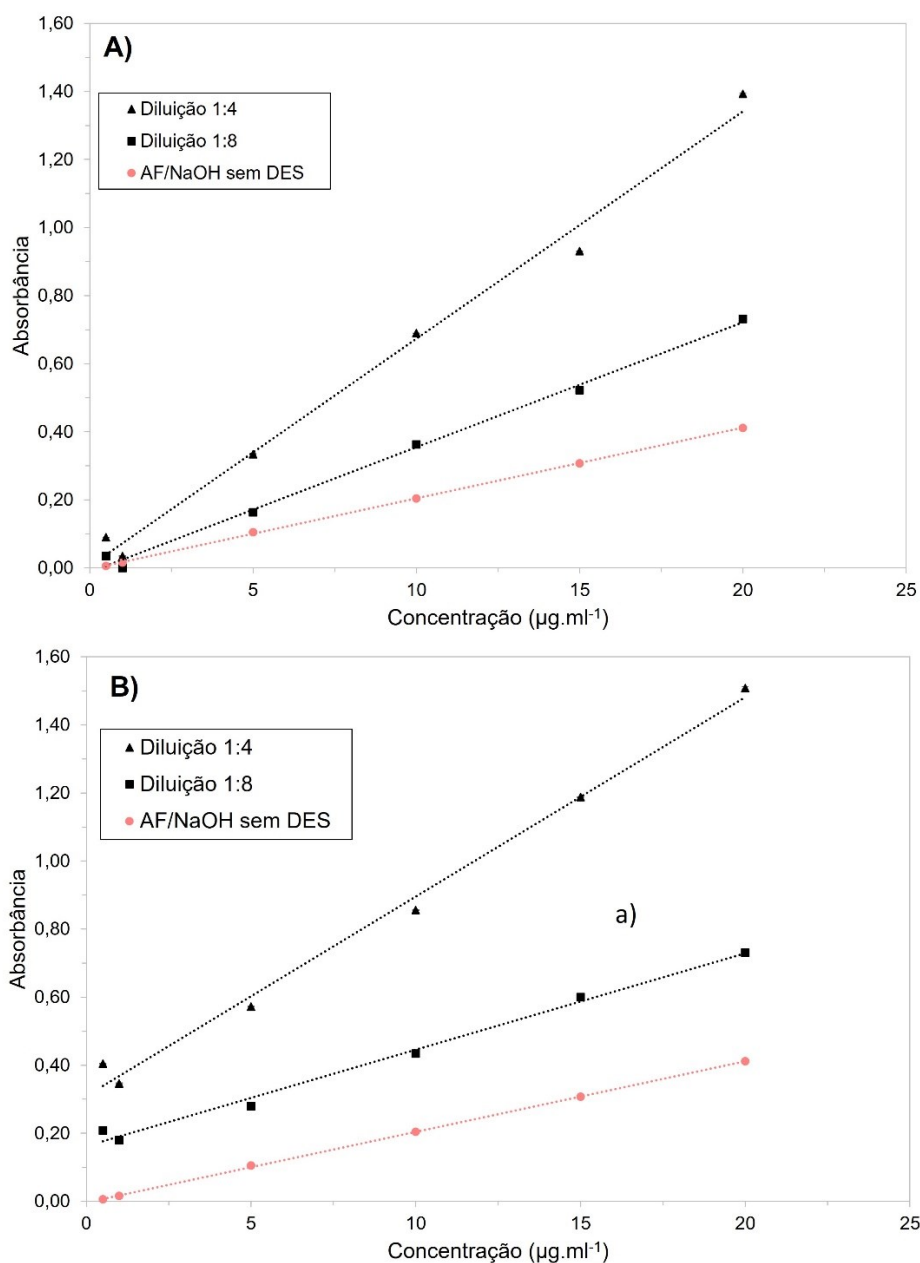


Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme observou-se na Figura 24, apenas o pH apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a extração do ácido fólico pelo DES. O efeito positivo indica que em pH 12,67 a eficiência de extração é maior que em pH 8,76. As demais variáveis ou suas interações não apresentaram efeito significativo.

A Figura 25 apresenta as curvas de calibração para a extração de ácido fólico em pH 12,67 realizada no sistema NaOH/DES com as diluições 1:4 e 1:8 (v/v) em metanol e acetonitrila.

Figura 25 – Curvas de calibração para ácido fólico extraído por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo em NaOH 0,1 mol.L⁻¹ diluído 1:4 e 1:8 (v/v) em metanol (A) e acetonitrila (B) em comprimento de onda 370 nm $\pm$ 2 nm



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AF/NaOH - extração de ácido fólico em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹; DES - solvente eutético profundo.

Foi possível observar que a diluição em metanol apresentou melhores resultados que em acetonitrila, principalmente com relação ao coeficiente linear que apresentou deslocamento em relação ao eixo x para acetonitrila. Assim,

considerando-se que o metanol apresenta menor custo e toxicidade que a acetonitrila (Cassini; Antunes; Keller, 2013; Joshi; Adhikari, 2019), optou-se pelo uso do metanol nas demais etapas.

A Tabela 14 apresenta os valores dos limites de detecção e quantificação para o sistema NaOH/DES/metanol.

Tabela 14 – Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para extração de ácido fólico por microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e DES diluído em metanol basificado

Diluição (v/v)	LOD (µg.mL ⁻¹)	LOQ (µg.mL ⁻¹)
1:4	0,12	0,37
1:8	0,27	0,82

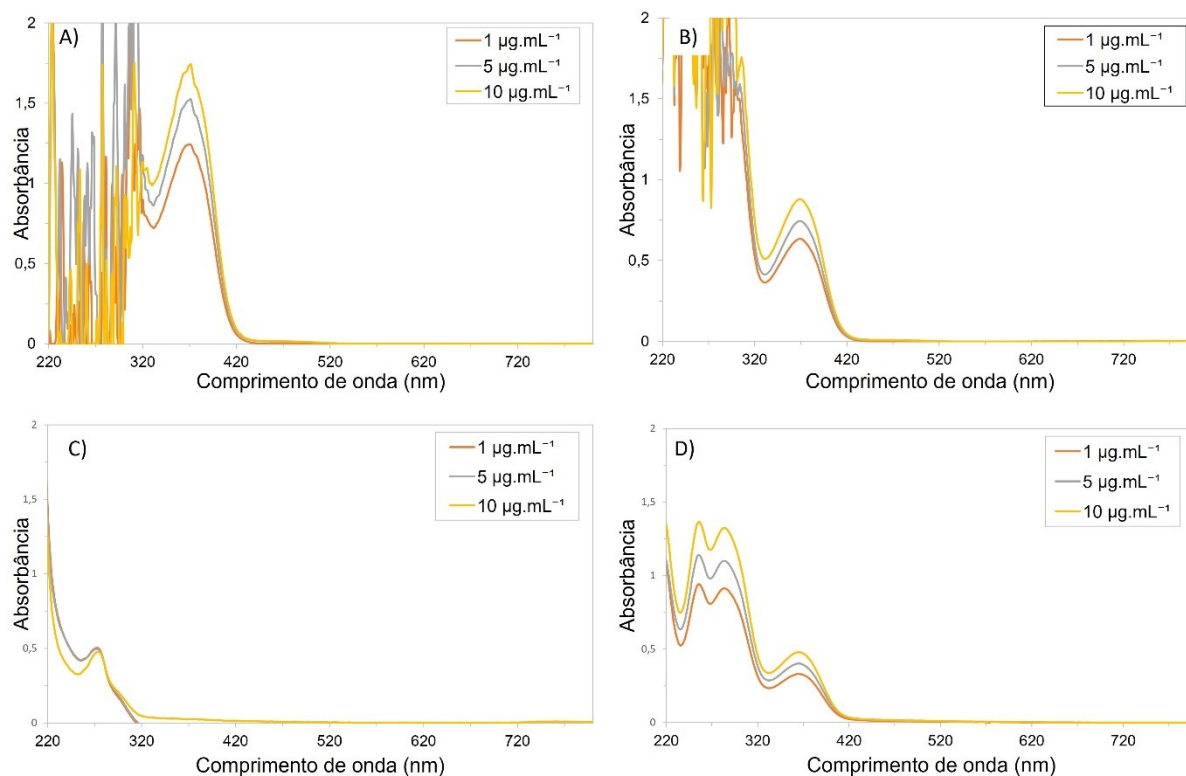
Fonte: elaborado pelo autor.

Quanto a definição da melhor diluição, a proporção de 1:4 de metanol, quando comparada a diluição 1:8 apresentou maior coeficiente angular, maior sensibilidade, maior valor de absorvidade molar e menores LOD e LOQ, porém optou-se por realizar as demais etapas ainda avaliando estes dois fatores de diluição.

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO ANALÍTICO

A Figura 26 apresenta o espectro de absorção da extração do ácido fólico de suplemento alimentar, com adição de padrão de ácido fólico, com e sem DES, e das respectivas fases aquosas das extrações com DES com correção de linha de base e suavização de dados, utilizando a técnica de microextração líquido-líquido em fase dispersiva assistida por agitação em vórtex.

Figura 26 – Espectros de absorção no UV-Vis para microextração de ácido fólico de suplemento alimentar com e sem DES e com adição de padrão de ácido fólico 1,0; 5,0; e 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: A - espectros de extração de ácido fólico a partir de solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e solvente eutético profundo na diluição 1:4 (v/v) de metanol; B - espectros de extração de ácido fólico a partir de solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e solvente eutético profundo na diluição 1:8 (v/v) de metanol; C - espectros das fases aquosas da extração de ácido fólico a partir de solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹; D - espectros das extrações a partir de solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, sem solvente eutético profundo.

A Figura 26 A e B demonstram que houve extração de ácido fólico no suplemento alimentar na faixa de comprimento de onda de 370 nm nas diluições 1:4 (v/v) e 1:8 (v/v) de metanol. Na Figura 26 C observou-se que não houve pico característico do ácido fólico na fase aquosa na região de comprimento de onda de 370 nm, indicando que a microextração foi eficiente.

Visualmente, observou-se que há aumento da intensidade do sinal do ácido fólico na faixa de comprimento de onda de 370 nm para extração de ácido fólico com DES nas diluições 1:4 (v/v) e 1:8 (v/v) de metanol, comparado a mesma faixa de comprimento de onda na Figura 26 D, na qual o ácido fólico foi extraído sem DES. O fator de enriquecimento obtido foi igual a 16,4.

Os resultados demonstram que o DES propiciou a extração do ácido fólico a partir do suplemento alimentar adicionado de padrão de ácido fólico, bem como aumentou a sensibilidade quando comparado à extração sem DES.

4.4.1 Faixa de trabalho e linearidade

As curvas de calibração para microextração líquido-líquido em fase dispersiva utilizando solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e solvente eutético profundo com diluições 1:4 e 1:8 (v/v) em metanol, com e sem matriz suplemento alimentar, foram preparadas a partir de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20 µg.mL⁻¹ de padrão de ácido fólico. O teste estatístico de Grubs demonstrou ausência de valores discrepantes. A homocedasticidade (homogeneidade das variâncias) foi avaliada pelo teste de Cochran para um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), assumindo como hipótese nula a igualdade das variâncias. Para avaliação da distribuição normal dos resíduos foi utilizado teste de Shapiro-Wilk ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), assumindo como hipótese nula a normalidade dos resíduos.

Na Tabela 15 é possível observar os dados da regressão linear realizada a partir do ajuste linear pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e dos testes estatísticos de Cochran e Shapiro-Wilk para a microextração sem matriz. Os valores encontrados para o teste de Cochran foram menores que o valor $C_{crítico}$ de 0,544, indicando homocedasticidade dos dados. Os coeficientes de determinação, r^2 superiores a 0,99 demonstraram uma boa linearidade. O ajuste do modelo linear foi verificado por análise de variância (ANOVA) e os valores do teste $F_{calculado}$ maior que $F_{tabelado}$, indicaram que os modelos lineares têm significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 15 – Parâmetros das curvas de calibração externa de solução padrão de ácido fólico no sistema NaOH/DES; diluições 1:4 e 1:8 (v/v) de metanol

Parâmetros	Diluição 1:4	Diluição 1:8
<i>Faixa de linearidade ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	1 - 20	1 - 20
<i>Coefficiente angular (b)</i>	0,0690	0,0380
<i>Coefficiente linear (a)</i>	-0,0276	-0,0311
<i>Coefficiente de determinação (r^2)</i>	0,9912	0,9982
<i>Coefficiente de correlação (r)</i>	0,9956	0,9991
<i>Valor Cochran (C)¹</i>	0,416	0,460
<i>Valor Shapiro-Wilk (W)²</i>	0,862	0,953
<i>Valor F³</i>	2.798	12.412

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: 1 - valor $C_{\text{crítico}}$ com 5% de significância = 0,544; 2 - valor $W_{5;0,05}$ tabelado com 5% de significância = 0,918; 3 - valor F_{tabelado} com 0,05% de significância = 4,3.

Os resultados das avaliações realizadas na matriz suplemento alimentar de ácido fólico, estão apresentados na Tabela 16. Os resultados indicam homocedasticidade para diluição 1:4 (v/v), sendo o valor C de 0,624 menor que o valor $C_{\text{crítico}}$, a regressão linear pelo MMQO resultou em um coeficiente de determinação maior que 0,9 e bom ajuste linear demonstrado pelo valor de F igual a 383 maior que F_{tabelado} . Para a diluição 1:8 (v/v) na presença de matriz o valor de C de 0,922 maior que o valor $C_{\text{crítico}}$ indica heterocedasticidade, o que significa que não há homogeneidade das variâncias ao longo dos pontos da curva. Sendo assim foi necessário utilizar o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados para regressão linear. A Equação 16 foi utilizada para calcular o fator de ponderação ou peso (Filho, 2022) e então foram obtidos os coeficientes da reta, sendo r^2 maior que 0,99. O valor $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} indica significância estatística do modelo de ajuste linear.

$$\text{Fator de ponderação} = \frac{DP_x^{-2}}{\left(\sum_n DP^{-2}/n\right)} \quad (16)$$

onde:

DP = desvio padrão do sinal;

x = concentração;

n = número de pontos da curva.

Tabela 16 – Parâmetros das curvas de calibração de solução padrão de ácido fólico no sistema NaOH/DES com matriz suplemento alimentar e diluições 1:4 e 1:8 (v/v) de metanol

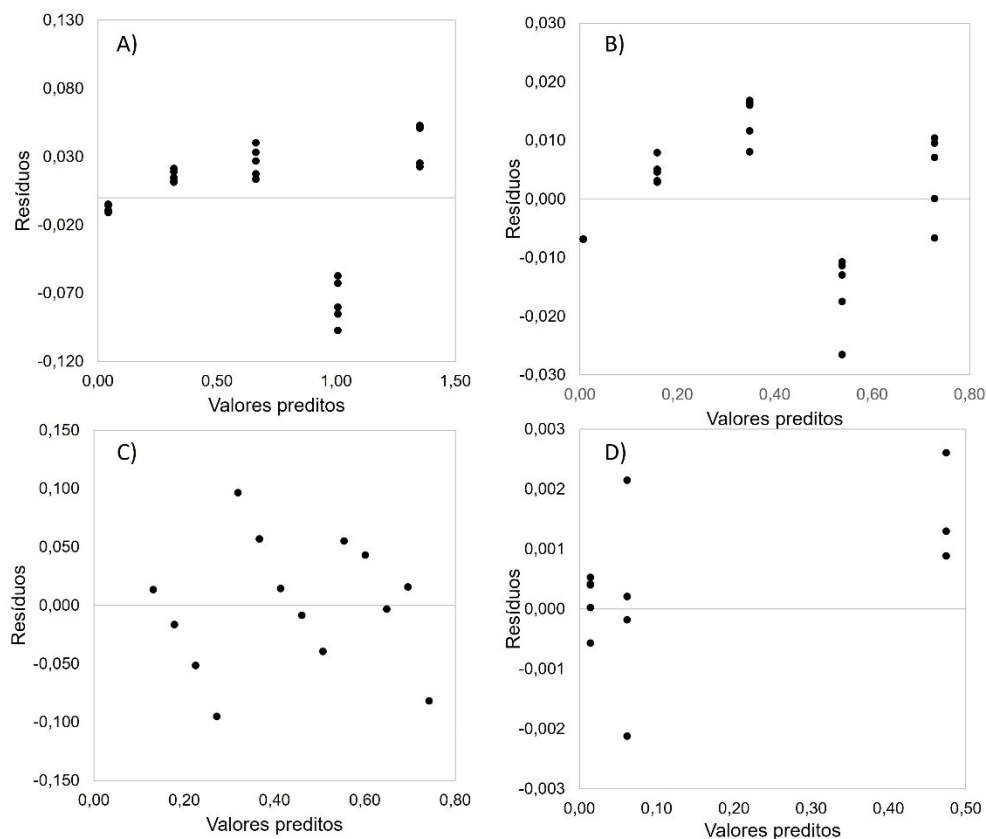
Parâmetros	Diluição 1:4	Diluição 1:8
<i>Coeficiente angular (b)</i>	0,0609	0,0293
<i>Coeficiente linear (a)</i>	0,1151	0,0662
<i>Coeficiente de determinação (r^2)</i>	0,9290	0,99998
<i>Coeficiente de correlação (r)</i>	0,9638	0,99995
<i>Valor Cochran (C)¹</i>	0,6240	0,922
<i>Valor Shapiro-Wilk (W)²</i>	0,979	0,873
<i>Valor F</i>	383 ³	117.955 ⁴

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: 1 - valor $C_{\text{crítico}}$ com 5% de significância = 0,746; 2 - valor $W_{5;0,05}$ tabelado com 5% de significância = 0,866; 3 - valor F_{tabelado} com 0,05% de significância = 4,7; 4 - valor F_{tabelado} com 0,05% de significância = 3,9.

A partir dos valores obtidos no teste de Shapiro-Wilk conclui-se que três dos modelos apresentaram distribuição normal dos resíduos uma vez que os valores $W_{\text{calculado}}$ foram maiores que os valores W_{tabelado} com significância de 5%, com exceção da extração sem matriz e diluição 1:4 (v/v) em metanol, para a qual o valor W foi menor que o tabelado indicando que os resíduos não seguem uma distribuição normal. A Figura 27 apresenta os gráficos de distribuição de resíduos.

Figura 27 – Gráficos de resíduos para extração de ácido fólico sem matriz e diluição 1:4 (v/v) metanol (A), sem matriz e diluição 1:8 (v/v) metanol (B), com matriz e diluição 1:4 (v/v) metanol (C), com matriz e diluição 1:8 (v/v) metanol (D)



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: A - resíduos não normalizados; B, C e D - resíduos normalizados.

A curva de calibração por padronização externa sem matriz, na diluição 1:4 (v/v) de metanol não apresentou uma distribuição normal dos resíduos. Sendo assim para as demais etapas foram consideradas apenas as diluições 1:8 (v/v).

4.4.2 Seletividade

As curvas obtidas a partir da diluição 1:8 (v/v), atenderam aos parâmetros de linearidade, portanto a seletividade do método foi avaliada por efeito de matriz utilizando o teste *F* para avaliar as variâncias das curvas e o teste *t* para duas amostras presumindo variâncias equivalentes, comparando a curva sem matriz e curva com matriz. A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para os testes *F* e *t*.

Tabela 17 – Resultados para teste F e teste t das curvas de ácido fólico com e sem matriz

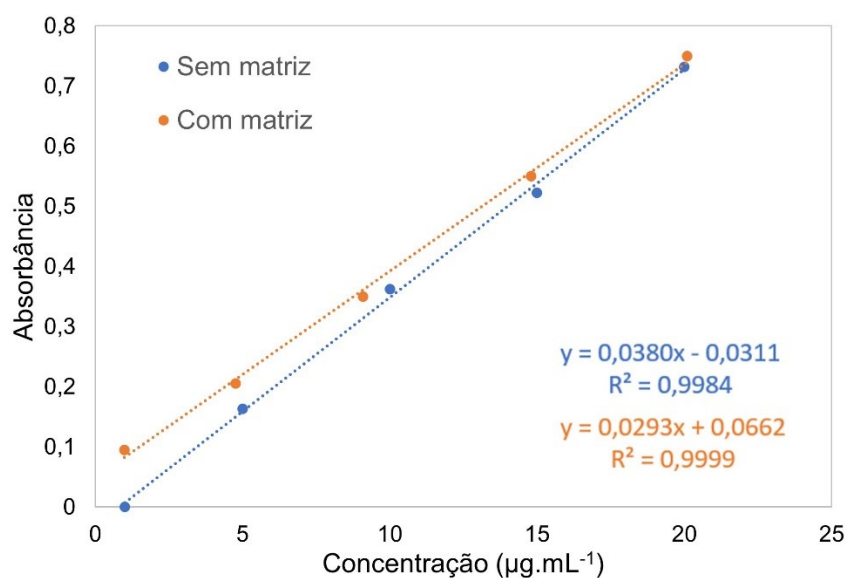
Parâmetros	Resultados
Equação da reta sem matriz	$y = 0,0380x - 0,0311$
Equação da reta com matriz	$y = 0,0293x + 0,0662$
Teste - $F_{calculado}^1$	4,89
Teste t^2	
$t_{calculado}$	0,95
p_{valor}	0,395

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: 1 - valor de $F_{tabelado} = 6,39$ (4 graus de liberdade (n-1), 95% de significância); 2 - valor $t_{crítico, bicaudal} = 2,78$ ($\alpha = 0,05$).

O valor de $F_{calculado}$ menor que o $F_{tabelado}$ indicou que não existe diferença significativa a um nível de 95% entre as variabilidades das duas curvas, com e sem matriz, logo não houve efeito de matriz, indicando seletividade do método. Esse resultado é corroborado pelo valor encontrado no teste t que foi menor que o valor $t_{tabelado}$ (2,78) e o valor $p_{calculado}$ foi maior que o p_{valor} de significância ($\alpha = 0,05$), pode-se concluir que a matriz não causou efeito sobre a precisão e o resultado, por nível de concentração, podendo ser observado visualmente na Figura 28.

Figura 28 – Gráficos das curvas sem e com matriz suplemento alimentar para extração de ácido fólico pelo sistema DES/NaOH, diluição 1:8 (v/v) em metanol



Fonte: elaborado pelo autor.

Os demais parâmetros analíticos de mérito foram calculados a partir da curva sem matriz, por ter sido comprovada a ausência de efeito de matriz.

4.4.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as Equações 6 e 7, a partir de 10 repetições do branco correspondente a diluição 1:8 sem matriz e sem analito, por não haver disponibilidade de matriz sem analito. O valor encontrado para o LOD foi de $0,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o LOQ = $0,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.4.4 Exatidão e precisão

Os estudos de exatidão do método foram realizados na faixa de 1,0 a 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cálculo da recuperação relativa (%), conforme a Tabela 18. Os valores variaram de 81,8 a 103,5 % estando de acordo com os critérios da AOAC (INMETRO, 2020).

Os resultados para precisão foram calculados em função da repetibilidade e constam na Tabela 18. Os valores do desvio padrão relativo (DPR) foram considerados satisfatórios quando menores que o valor calculado pela equação de Horwitz. A repetibilidade na condição mesmo analista, mesmo dia, mesmo equipamento apresentou valores de 0,3 a 1,2 %, menores que os valores de Horwitz (Tabela 18).

Tabela 18 – Resultados dos ensaios de exatidão e precisão

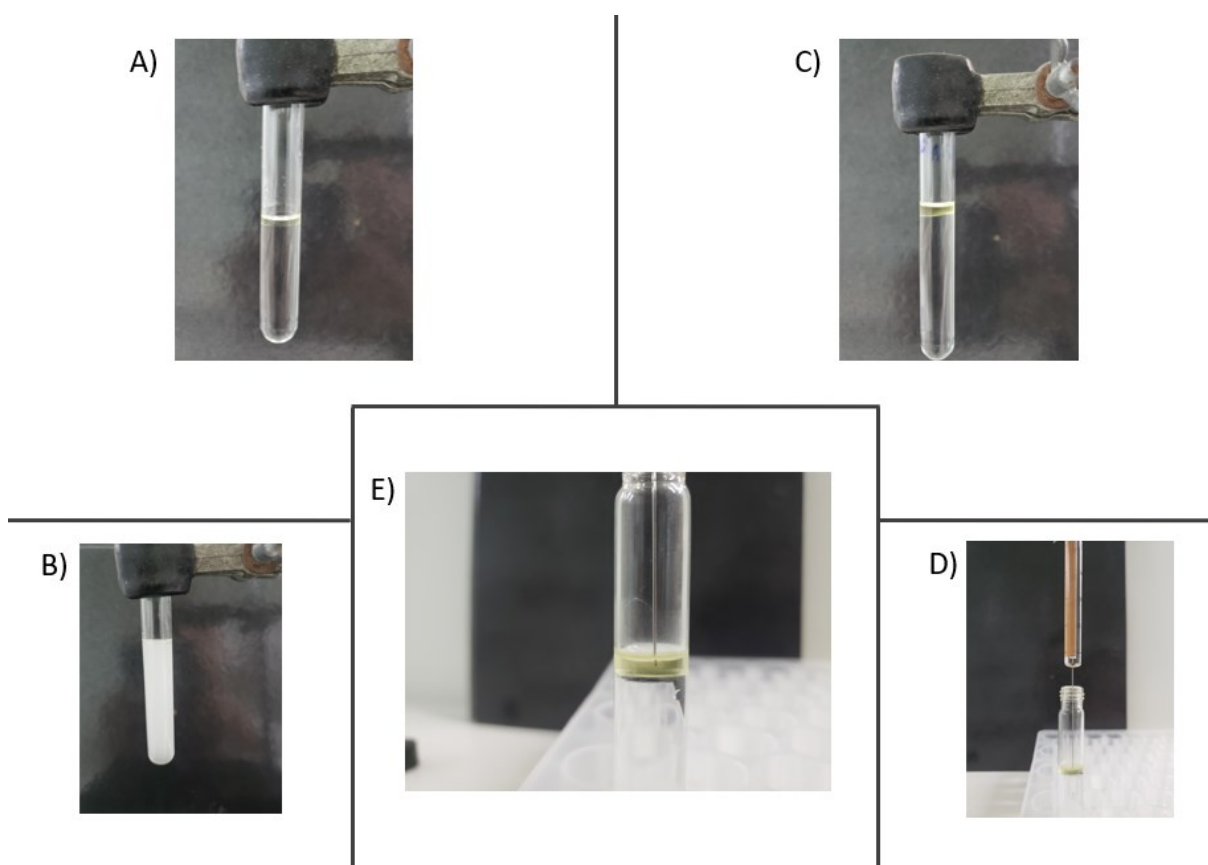
Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio padrão($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação relativa (%)	DPR(%)	Valor Horwitz
1	0,8	0,003	81,8	0,3	16
5	5,1	0,053	102,4	1,0	12,5
10	10,4	0,100	103,5	1,0	11,3
15	14,6	0,172	97,1	1,2	10,6
20	20,1	0,190	100,4	0,9	10,2

Fonte: elaborado pelo autor.

4.4.5 Comparação entre o método desenvolvido e o método de referência

O método desenvolvido foi aplicado a uma amostra de suplemento alimentar de ácido fólico, obtida a partir do conteúdo homogeneizado de 20 cápsulas do suplemento com a concentração de 1000 μg de ácido fólico por cápsula, conforme declarado no rótulo do produto. Foi realizada a pesagem do conteúdo de 20 cápsulas, que foi homogeneizado e então pesado 10 μg (valor intermediário da curva de calibração). Após os procedimentos descritos no item 3.9.6 foi realizada leitura em espectrofotômetro na faixa de 200 a 800 nm. A Figura 29 apresenta a microextração líquido-líquido dispersiva com o DES.

Figura 29 – Etapas da extração de suplemento alimentar de ácido fólico por microextração líquido-líquido assistida por vórtex e solvente eutético profundo



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: a - amostra em NaOH com DES antes da agitação mostrando sistema bifásico; b - Amostra logo após agitação, mostrando efeito de turbidez característico da DLLME; c - amostra após centrifugação mostrando aumento da intensidade de cor amarela característica do ácido fólico; d - retirada da alíquota com microseringa; e) detalhe da ponta da agulha da microseringa mergulhada no DES para retirada da alíquota da amostra concentrada.

O teor de ácido fólico encontrado para o método desenvolvido foi de 1425,02 µg por cápsula, valor 42,5% maior que o declarado no rótulo do produto e 11,2% acima do valor máximo estabelecido pela Instrução Normativa nº 102, de 15 de outubro de 2021 (Brasil, 2021). Para o método referência o teor de ácido fólico encontrado no suplemento alimentar foi de 1471,02 µg por cápsula. A recuperação relativa foi igual a 96,87 % e valor de tendência de 0,56 % (Tabela 19), indicando que os valores encontrados para o teor de ácido fólico entre o método desenvolvido e o método referência foram próximos.

Tabela 19 – Resultados dos testes estatísticos aplicados à comparação dos métodos desenvolvido e referência para quantificação de ácido fólico em suplemento alimentar

Recuperação		Teste t^1		Teste F^2	
<i>b</i> (%)	0,56	<i>t</i>_{calculado}	0,14	<i>F</i>_{calculado}	215,12
<i>R'</i> (%)	96,87	<i>t</i>_{crítico}	2,77	<i>F</i>_{tabelado}	215,71
		<i>p</i>_{valor}	0,89	<i>p</i>_{valor}	0,05007

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: *b* - tendência; *R'* - recuperação relativa; 1 - valor $t_{crítico, bicaudal}$, ($\alpha = 0,05$); 2 -valor de $F_{tabelado, bicaudal}$, (4 graus de liberdade (n-1), 95% de confiabilidade).

As variâncias entre os dois métodos foram avaliadas pelo teste *F*, assumindo como hipótese nula a igualdade de variâncias considerando um nível de confiança de 95%. O valor encontrado no teste *F* foi menor que o $F_{tabelado}$ de 215,71 e p_{valor} maior que o p_{valor} de significância ($\alpha = 0,05$). A análise das médias de concentrações encontradas pelo método desenvolvido e pelo método referência foram avaliadas pelo teste *t* para dados emparelhados, com nível de confiança de 95%, assumindo como hipótese nula que estatisticamente as médias entre os métodos são iguais. O valor encontrado no teste *t* foi menor que o $t_{crítico}$ de 2,77 e p_{valor} maior que o p_{valor} de significância ($\alpha = 0,05$) (Tabela 19). Portanto, aceitam-se as hipóteses nulas, para ambos os testes e conclui-se que o método desenvolvido é estatisticamente igual ao método cromatográfico de referência.

4.4.6 Incerteza de medição

O mensurando determinado pela Equação 17 relaciona as grandezas medidas utilizadas para a quantificação da concentração de ácido fólico.

$$C_{AF} = \frac{C_{amostra} \times volume_{diluição} \times m_{cápsula}}{m_{amostra}} \times C_{precisão} \quad (17)$$

onde:

C_{AF} = concentração de ácido fólico, em $\mu\text{g}/\text{cápsula}$;

$C_{amostra}$ = valor médio da concentração em, $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (obtido a partir da equação da reta);

$volume_{diluição}$ = volume de amostra usado para diluição, em mL;

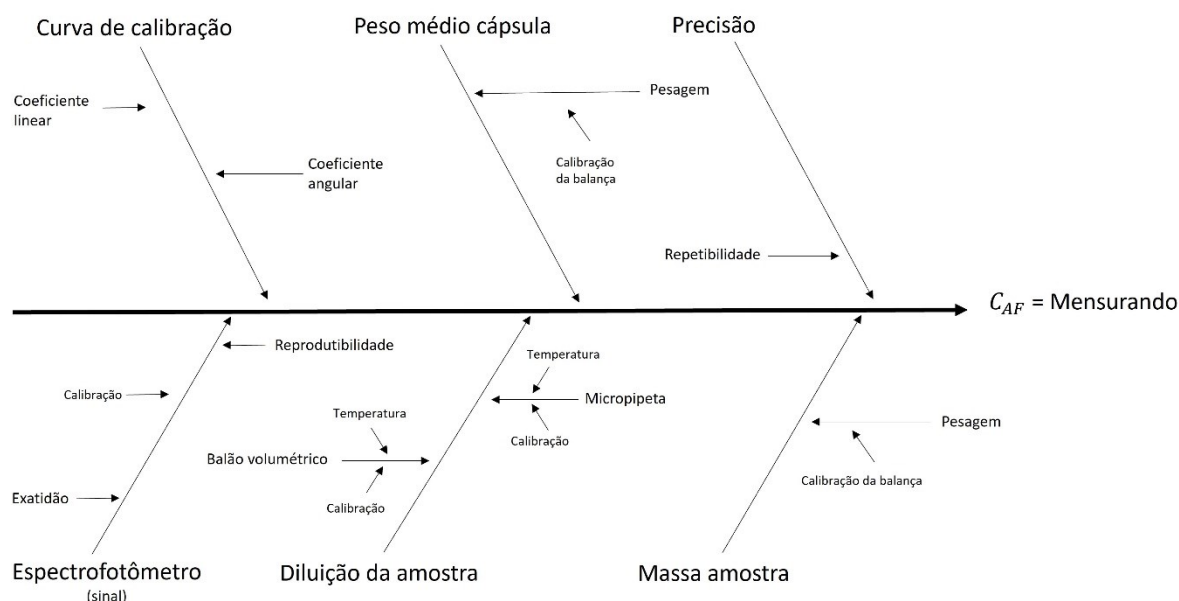
$m_{cápsula}$ = peso médio por cápsula, em mg;

$m_{amostra}$ = massa de amostra, em mg;

$C_{precisão}$ = componente da incerteza oriundo da repetibilidade.

As fontes estabelecidas pela equação do mensurando, incluindo outras fontes relacionadas às grandezas apresentadas do mensurando estão ilustradas na Figura 30.

Figura 30 – Diagrama de Ishikawa para identificação das fontes de incerteza para a determinação de ácido fólico



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: C_{af} - concentração de ácido fólico (μg por cápsula).

As fontes de entrada identificadas para estimativa da concentração de ácido fólico foram: massa da amostra, volume de diluição da amostra, peso médio da cápsula, sinal (absorbância), precisão (repetibilidade) e curva de calibração (coeficiente linear e coeficiente angular). Para cada uma das fontes foram identificadas fontes secundárias, apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Identificação de cada fonte de entrada e tipo de distribuição utilizada no cálculo de incerteza de medição

Tipo de fonte	Fontes	Identificação da fonte de entrada	Valor de entrada	Tipo de distribuição
B	Massa da amostra	Calibração balança (tara)	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro balança (tara)	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Resolução balança (tara)	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Calibração balança	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro balança	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Resolução balança	Valor certificado de calibração	Retangular
B	Peso médio da cápsula	Calibração balança (tara)	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro balança (tara)	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Resolução balança (tara)	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Calibração balança	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro balança	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Resolução balança	Valor certificado de calibração	Retangular
B	Diluição amostra	Calibração balão volumétrico 250 mL	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro balão volumétrico 250 mL	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Calibração balão volumétrico 10 mL	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro balão volumétrico 10 mL	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Micropipeta 10 mL	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro micropipeta 10 mL	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Micropipeta 1 mL	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro micropipeta 1 mL	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Micropipeta 100 µL	Valor certificado de calibração	Normal
B		Erro micropipeta 100 µL	Valor certificado de calibração	Retangular
A		Variação de temperatura (vidraria)	Coeficiente de variação	Retangular
A		Variação de temperatura (micropipeta)	Coeficiente de variação	Retangular
B	Sinal (absorbância)	Calibração espectrofotômetro	Valor certificado de calibração	Retangular
B		Exatidão fotométrica	Valor manual fabricante	Retangular
B		Reprodutibilidade fotométrica	Valor manual do fabricante	Retangular
A	Curva de calibração	Coeficiente angular	Desvio padrão	Normal
A		Coeficiente linear	Desvio padrão	Normal
A	Repetibilidade	Repetibilidade do método	Desvio padrão	Normal

Fonte: elaborado pelo autor.

Os coeficientes de sensibilidade para cada componente foram calculados e os resultados encontrados para incerteza combinada e expandida estão apresentados na Tabela 21. As equações utilizadas para os cálculos dos coeficientes de sensibilidade e dos graus de liberdade efetivos constam no APÊNDICE B.

Tabela 21 – Valores de incerteza combinada, incerteza expandida, graus de liberdade efetivos e fator de abrangência

Incerteza combinada ($\pm \mu_c$) *	Incerteza expandida ($\pm U_{exp}$) *	Graus de liberdade efetivos (v_{eff})	Fator de abrangência ($k_{95,45\%}$)
40,14	80,27	836 (∞)	2

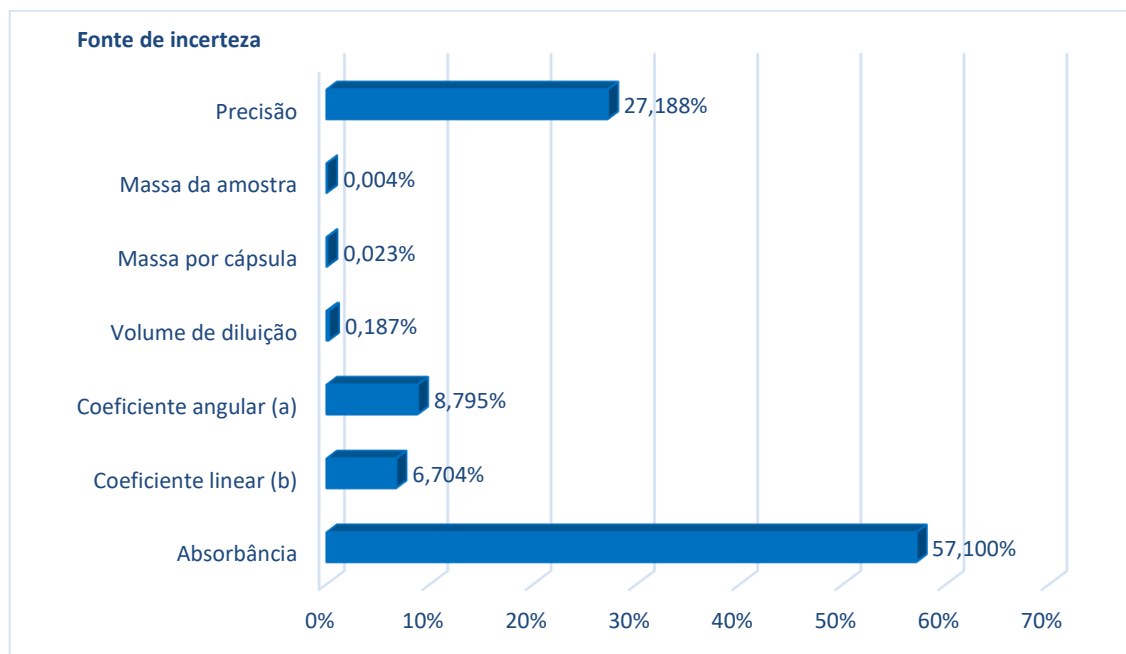
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: * incertezas em $\mu\text{g.cápsula}^{-1}$.

O valor encontrado para incerteza de medição foi avaliado de acordo com o estabelecido pelo Guia de validação e controle de qualidade analítica do ministério da Agricultura (Brasil, 2011). De acordo com a Equação 13, o valor calculado para a razão entre a incerteza combinada e a concentração analítica foi de 2,8, que é menor que 6 (valor obtido a partir da multiplicação do coeficiente de variação pela razão 8/9) na faixa de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, logo o valor estimado para a incerteza de medição pode ser considerado adequado.

A contribuição de cada fonte de incerteza para a estimativa da incerteza de medição pode ser observada na Figura 31. A contribuição do sinal gerado pelo espectrofotômetro responde por mais de 50 % do valor da incerteza, seguido pela contribuição da precisão (repetibilidade) e da curva analítica (coeficientes angular e linear). De acordo com estudo de revisão realizado por Sooväli *et al.* (2006) a incerteza originária de medições por espectrofotometria é principalmente atribuída a alterações químicas no meio de extração modificando a absorbância, interferências espectrais ou da matriz, a deriva instrumental, desvio da linha de base e falta de linearidade da escala de absorbância do espectrofotômetro.

Figura 31 – Contribuições das fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição do método de microextração líquido-líquido em fase dispersiva, agitação por vórtex e solvente eutético profundo para quantificação de ácido fólico em suplemento alimentar

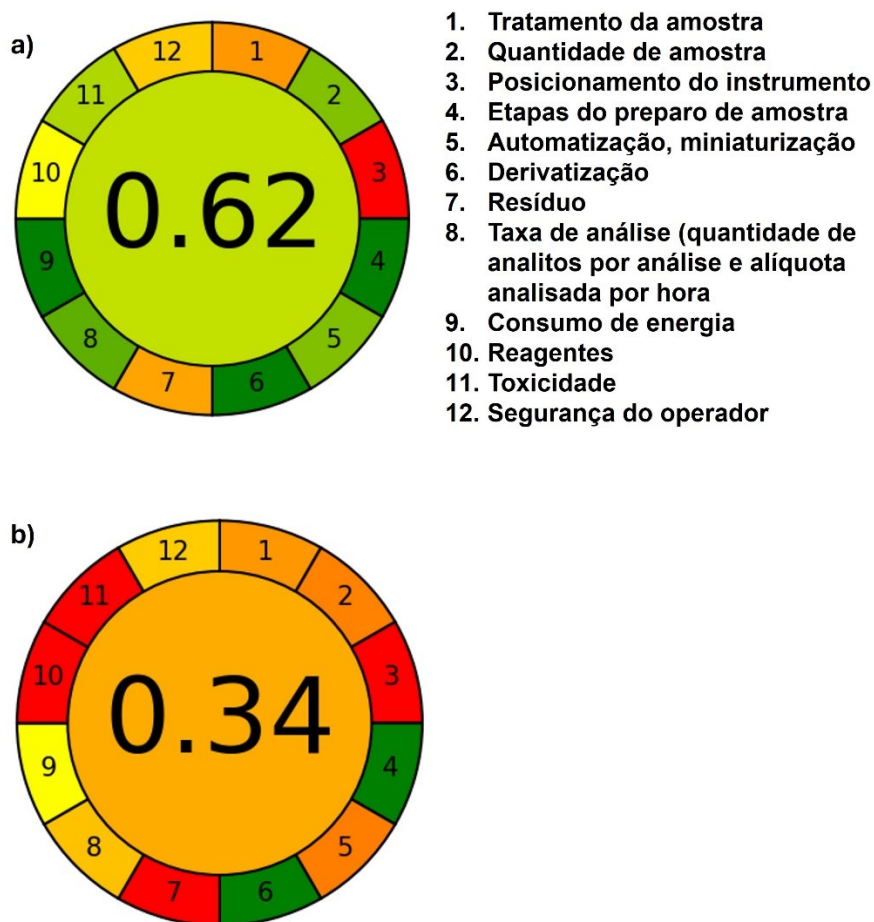


Fonte: elaborado pelo autor.

4.5 VERIFICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO FRENTE AOS PARÂMETROS DA QUÍMICA VERDE

Os gráficos gerados pela calculadora AGREE, para avaliação dos métodos desenvolvido e referência de acordo com os 12 princípios da química analítica verde estão apresentados na Figura 32. O peso para cada parâmetro foi mantido como o padrão da ferramenta.

Figura 32 – Resultados da análise pelo sistema métrico AGREE



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: a - método desenvolvido; b - método referência.

O método desenvolvido no presente trabalho (Figura 32 A) apresentou valor maior que 0,6 e pode ser dito como um método verde (Kayan; Hemn, 2022). As maiores pontuações para o método desenvolvido, devem-se a: poucas etapas de análise, miniaturização pela DLLME, uso de baixas quantidades de reagentes, não utilização de derivatização e baixo consumo de energia. Apenas para o item 3, a pontuação foi zerada, devido a análise ser realizada no laboratório e não “*in situ*” ou “*in line*”. Outros parâmetros que influenciaram na menor pontuação foram relacionados a análise ter um pré-tratamento de amostra, apresentar ainda valor relativo de resíduos químicos e segurança para o operador.

Em relação ao método farmacopeico de referência, o valor obtido pela análise foi de 0,34 (Figura 32 B), aproximadamente metade do valor obtido para o método

desenvolvido, o qual não pode ser considerado um método verde. Tanto a não utilização de técnicas miniaturizadas, além do alto consumo de energia e geração de resíduos, característicos do método HPLC, e ainda a utilização de acetonitrila na fase móvel foram os principais parâmetros que influenciaram na baixa pontuação deste método.

Com base nestes resultados, é possível afirmar que além das características intrínsecas ao método desenvolvido, como aumento da sensibilidade para análise de ácido fólico na faixa de 370 nm, o método ainda exhibe comportamento adequado aos princípios da química analítica verde, contribuindo para diminuir o impacto das atividades de laboratório ao meio ambiente e ao analista.

5 CONCLUSÃO

Durante a execução deste trabalho foi possível desenvolver e otimizar um método miniaturizado para extração de ácido fólico utilizando solvente eutético profundo hidrofóbico e detecção por espectrofotometria UV-Vis.

O método desenvolvido e otimizado demonstrou que o tratamento da amostra com solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ apresentou resultados melhores do que a extração utilizando tampão fosfato de sódio e potássio devido a solubilização do ácido fólico no meio. A técnica de microextração líquido-líquido em fase dispersiva assistida por agitação em vórtex e solvente eutético profundo foi capaz de extrair e concentrar o ácido fólico na fase orgânica. Ainda, mesmo sendo necessário uma diluição da fase orgânica, a qual foi obtida por uso de metanol, o método apresentou sensibilidade maior que o método sem utilização de solvente eutético profundo.

A metodologia proposta para a determinação de ácido fólico de suplemento alimentar apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão. A incerteza de medição expandida indicou dispersão de valores aceitáveis em torno do valor médio. Quando comparado ao método farmacopeico de referência (HPLC), o método desenvolvido por espectrofotômetro em UV-Vis apresentou resultado estatisticamente igual ao método cromatográfico.

A ferramenta AGREE possibilitou demonstrar que o método desenvolvido é um método verde, uma vez que está de acordo com os princípios da química analítica verde, sendo um método com potencial de sustentabilidade e risco reduzido ao meio ambiente e ao analista quando comparado ao método cromatográfico de referência.

O aumento da sensibilidade, capacidade de extração e concentração de ácido fólico proporcionados pelo uso do DES à base de cloreto de trioctilmetilamônio, aliado a detecção em comprimento de onda de 370 nm, tornam promissoras a aplicação deste método para outras matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, Ehab A.; ROBERSON, Cindy Leslie A.; ELSHARKAWY, Nancy. Content variation of catechin markers, total phenolics and caffeine in green tea dietary supplements. **Journal of Dietary Supplements**. v.13, p.171-184, out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/19390211.2014.965868>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- ACHKAR, Tracy El. **Deep eutectic solvents: characterization, interaction with synthetic and biological membranes, and solubilization of bioactive volatile compounds**. 2020. 176 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Libanesa e Universidade do Litoral da Costa d' Opale, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://theses.hal.science/tel-0311985>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- AHMED, S.G.; KHAYOON, W.S. A solvent collection technique using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with spectrophotometry for the trace determination of folic acid in pure, dosage forms and flaxseed. **Chemical Papers**. v. 76, p. 2485-2494, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-021-02027-6>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- AL-SHAMMARY, Fahad Jaber; AL-RASHOOD, Khalid A.; MIAN, Neelofur Abdul Aziz; MIAN, Mohammad Saleem. ANALYTICAL PROFILE OF FOLIC ACID. In FLOREY, Klaus. (ed.) **Analytical profiles of drug substances**. v. 18. San Diego: Academic Press. 1990. 666p. Disponível em: Analytical Profiles of Drug Substances | Vol 19, Pages ii-xi, 1-666 (1990) | ScienceDirect.com by Elsevier. Acesso em: 09 nov 2023.
- ALABURDA, Janete; SHUNDO, Luzia. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, p. 95-102, maio 2007. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-477248>. Acesso em: 03 fev. 2021.
- ALENCAR, Daniel Barroso; PIRES-CAVALCANTE; Kelma Maria dos Santos; SABOYA, Jefferson Pablo de Souza; SOUZA, Márcia Barbosa; FARIAS, Wladimir Ronald Lobo; SAKER-SAMPAIO, Silvana. Teores de β -caroteno em suplementos e biomassa de Spirulina. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 35(2), p. 386-391, abr. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000200021>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- ALERTAS sanitários. **SC.GOV.BR**, 2023. Disponível em: <https://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/noticias/alertas-sanitarios.html>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- ALLEGRIINI, Franco; OLIVIERI, Alejandro C. Recent advances in analytical figures of merit: heteroscedasticity strikes back. **Analytical Methods**. v. 9, p. 739–743, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6ay02916g>. Acesso em: 02 mar. 2024.
- ALTUNDAG, Özlem; ÇELEBI-SALTIK, Betül. From embryo to adult: one carbon metabolism in Steam Cells. **Current Steam Cell Research and Therapy**. v. 16, p. 175-188, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1574888X15666200712191308>. Acesso em: 14 out 2021.

AOAC International, Official methods of analysis of AOAC. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements** (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016. Disponível em: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf. Acesso em: 02 mar. 2024.

AOAC International, Official methods of analysis of AOAC. **Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals** (Appendix K). Gaithersburg: AOAC International, 2023. Disponível em: <https://academic.oup.com/book/45491/chapter/392389499>. Acesso em: 02 mar. 2024.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. v. 2, 6. ed. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/insumos-farmaceuticos-e-especialidades-ate-2a-errata-p-pdf-com-capa.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2023.

ARAÚJO, Izabela Rosa. **Verificação da adequação da rotulagem de suplementos alimentares segundo a legislação vigente**. 2019. 49p. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/38784>. Acesso em: 10 nov. 2023.

AREVALO, Rafael de Carvalho; SANCHEZ, Fabiane La Flor Ziegler. Avaliação de rótulos de suplementos alimentares frente à legislação brasileira vigente. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 25, e2021120. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.12021>. Acesso em: 10 nov. 2023.

ARMENTA, Sergio; GARRIGUES, Salvador; ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A.; GUARDIA, Miguel de la. Green extraction techniques in green analytical chemistry, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 116, p. 248-253, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>. Acesso em: 30 nov. 2021.

ASBAGHI, Omid; GHANAVATI, Matin; ASHTARY-LARKY, Damoon; BAGHERI, Reza; KELISHADI, Mahnaz Rezaei; NAZARIAN, Behzad; NORDVALL, Michael; WONG, Alexei; DUTHEIL, Frédéric; SUZUKI, Katsuhiko; NAEINI, Amirmansour Alavi. Effects of Folic Acid Supplementation on Oxidative Stress Markers: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Antioxidants**. v. 10, p. 871, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10060871>. Acesso em: 15 out 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 Requisitos Gerais para Competências de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. Rio de Janeiro: ABNT. 2017.

BAILEY, Lynn B.; DA SILVA, Vanessa; WEST, Allyson A.; CAUDILL, Marie A. Folate. Em ZEMPLENI, Janos; SUTTIE, John W.; GREGORY III, Jesse F.; STOVER, Patrick J. (ed.). **Handbook of vitamins**. Boca Raton: CRC Press. 2014. 576 p.

BALL, G. F. M. **Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods**, 1 ed. NY, Nova York: Springer. 1998. Doi 0.1007/978-1-4899-3414-7. 569 p.

BEEBE, Kenneth, R.; PELL, Randy J.; SEASHOLTZ, Mary Beth. **Chemometrics: A Practical Guide**. New York: Wiley Interscience. 1998. 348 p.

BOISON, Joe O. The role of validated analytical methods in JECFA drug assessments and evaluation for recommending MRLs. **Drug Testing and Analysis**. v. o, p. 578-583. Jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dta.2017>. Acesso em: 11 nov. 2023.

BOTTARI, Emilio; D'AMBROSIO, Antonietta; De TOMMASO, Gaetano; FESTA, Maria Rosa; IULIANO, Mauro; MECHINO, Martina. Solubility of folic acid and protonation of folate in NaCl at different concentrations, even in physiological solution. **Analyst**. v. 146, p. 2339-2347, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d1an00013f>. Acesso em: 12 out 2021.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Perguntas e respostas: Suplementos alimentares**. 8ª edição. Brasília: ANVISA, 1 set. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/perguntas-e-respostas-arquivos/suplementos-alimentares.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2023.

BRASIL(b). Instrução Normativa-IN nº 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, edição 144, p.141, 27 jul. 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380639/do1-2018-07-27-instrucao-normativa-in-n-28-de-26-de-julho-de-2018-34380550. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL(a). Instrução Normativa-IN nº 75, de 8 de outubro de 2020. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, edição 195, p. 113-124, 09 out. 2020. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/%284%29IN_75_2020_COM_P.pdf/933f425e-85f3-4c4d-8ec9-44541b5c229a. Acesso em: 05 maio 2024.

BRASIL(b). Instrução Normativa-IN nº 76, de 5 de novembro de 2020. Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, edição 215, p. 75-77, 11 nov. 2020. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5809185/IN_76_2020_COMP.pdf/28f071f8-8079-4671-a1ec-b47c8dd30917. Acesso em: 11 nov. 2023.

BRASIL(b). Instrução Normativa-IN nº 102, de 15 de outubro de 2021. Altera a Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018, que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, edição 198, p.113, 20 out. 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-102-de-15-de-outubro-de-2021-353319501>. Acesso em: 10 jan. 2024.

BRASIL(a). **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. 227 p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-de-produtos-origem-vegetal/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/manual-de-garantia-da-qualidade-analitica_2015.pdf. Acesso em: 17 jan. 2024.

BRASIL. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição**. 1ª edição, 1ª impressão. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_alimentacao_nutricao.pdf. Acesso em: 02 fev. 2021.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 4. Consolidação das normas sobre os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde: ANEXO II Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB). **Diário Oficial da União**. Seção 1, Brasília: DF, n 190, p 288, 03 out. 2017. Disponível em: http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/U_PRC-MS-GM-4_280917.pdf. Acesso em: 04 fev. 2021.

BRASIL(b). Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, edição 141, p.87, 25 jul. 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 11 nov. 2023.

BRASIL(a). Resolução-RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, edição 144, p.100, 27 jul. 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917. Acesso em: 09 nov. 2023.

BRASIL. Resolução-RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, p. 58, 18 dez. 2002. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0344_13_12_2002.html. Acesso em: 02 fev. 2021.

BRASIL. Resolução-RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**. Seção 1, Brasília: DF, n. 251, 26 dez. 2003. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0360_23_12_2003.html. Acesso em: 02 fev. 2021.

BRASIL(a). Resolução-RDC nº 604, de 10 de fevereiro de 2022. Dispõe sobre o enriquecimento obrigatório do sal com iodo e das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, seção

1, Brasília, DF, edição 33, p. 139, 16 fev. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-604-de-10-de-fevereiro-de-2022-380753427>. Acesso em: 09 nov. 2023.

BUTREDDY, Pravalika; LAWS, Selina; PANSALAWATTE, Premitha; LAWS, Eric; RATHNAYAKE, Hemali. Supramolecular chemistry of folic acid – experimental and computational investigation. **Biophysical Reviews and Letters**. v. 16, p. 95-109, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1142/s1793048021500053>. Acesso em: 24 dez. 2023.

CAI, Suang, QUAN, Shuang, YANG, Guangxin, YE, Qianhong, CHEN, Meixia, YU, Haitao, WANG, Gang, WANG, Yuming, ZENG, Xiangfang, QIAO, Shiyang, One Carbon Metabolism and Mammalian Pregnancy Outcomes. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 65, p. 2000734, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000734>. Acesso em: 14 out 2021.

CAMPOS, Júlia Reis; SOUTO, João Vitor Oliveira; MACHADO, Lara Cândida de Sousa. Estudo epidemiológico de nascidos vivos com espinha bífida no Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**. v. 4, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n3-008>. Acesso em: 24 out. 2021.

CAO, Jun; SU, Erzhang. Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. **Journal of Cleaner Production**. v. 314, p. 127965, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127965>. Acesso em: 16 nov. 2023.

CARASEK, Eduardo; SCUR, Rafael; BERNARDI, Gabrieli. High-throughput analytical methods employing microextraction techniques: Towards fast analyses lasting a few seconds. **Advances in Sample Preparation**. v. 8, p. 100095, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2023.100095>. Acesso em: 15 dez. 2023.

CASSINI, Sérgio Túlio Alves ; ANTUNES, Paulo Wagner Pereira; KELLER, Regina. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. v. 36, p. 1208–1213, jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000800019>. Acesso em: 26 dez. 2023.

CASTAÑO-MORENO, Erika; PIÑUÑURI, Raúl; PEÑAILILLO, Reyna; CASANELLO, Paola; LLANOS, Miguel; RONCO, Ana María. Folate transport in placentas. Em PATEL, Vinood B. **Molecular Nutrition: vitamins**. Londres: Academic Press. 2020.

CATHARINO, Rodrigo Ramos. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. 2000. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254283>. Acesso em: 01 fev. 2021.

CAUDILL, Marie A. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 91, p. 1455S-1460S, maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674E>. Acesso em: 06 jan. 2024.

CHANDRA-HIOE, Maria Veronica.; BUCKNALL, Martin P.; ARCOT, Jayashree. Evaluating folate extraction from infant milk formulae and adult nutritional's: Enzymatic digestion versus enzyme-free heat treatment. **Food Chemistry**. v. 234, p. 365-371, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.179>. Acesso em: 08 ago. 2021.

CHEMAXON . **Chemicalize**. 2023. Disponível em: <https://chemicalize.com/>. Acesso em: 18 nov. 2023.

CHEN, Yu; ZHAO, Di; BAI, Yue; DUAN, Yaoting; LIU, Cong; GU, Jiaming; WANG, Xin; SUN, Xuanchao; LI, Yuting; ZHANG, Lijuan. Tuning refractive index of deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**. v. 348, p. 118031, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118031>. Acesso em: 19 dez. 2023.

CHITAYAT, David; MATSUI, Doreen; AMITAI, Yona; KENNEDY, Deborah; VOHRA, Sunita; RIEDER, Michael; KOREN, Gideon. Folic acid supplementation for pregnant women and those planning pregnancy: 2015 update. **Journal of Clinical Pharmacology**. v. 56, p. 170-175, fev. 2016. doi: 10.1002/jcph.616. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcph.616>. Acesso em: 14 out 2021.

COMBS, Gerald F. Jr; McCLUNG, James P. **The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. [s.l.]: Academic Press. 5 ed. Elsevier. 2017. 628p.

CSIZMADIA, FERENC; TSANTILI-KAKOULIDOU, ANNA; PANDERI, IRENE; DARVAS, FERENC. Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 1. Estimation Method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 86, p. 865–871, jul, 1997. Disponível em: <https://doi:10.1021/js960177k>. Acesso em: 12 dez 2023.

CUNHA, Sara C.; FERNANDES, José O. Extraction techniques with deep eutectic solvents, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 105, p. 225-239, ago 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>. Acesso em: 01 nov. 2021.

DALMAZ, Aslihan; ÖZAK, Sezen Sivrikaya. Green deep eutectic solvent assisted liquid–liquid microextraction procedure for Sunset Yellow dye in effervescent vitamin C tablets. **Journal of the Iranian Chemical Society**. v. 19, p. 2359–2366, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02454-y>. Acesso em: 01 mar. 2024.

DJAUDENE, Ouarda; ROMANO, Anabela; BRADAI, Yasmine Djedjiga; ZEBIRI, Feriel; OUCHENE, Amina; YOUSFI, Yasmine; AMRANE-ABIDER, Meriem; SAHRAOUI-REMINI, Yasmine; MADANI, Khodir. A Global Overview of Dietary Supplements: Regulation, Market Trends, Usage during the COVID-19 Pandemic, and Health Effects. **Nutrients**. v. 15, p. 3320, jul. 2023 Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Fnu15153320>. Acesso em: 11 nov. 2023

DMITRIENKO, S. G.; APYARI, V. V.; TOLMACHEVA, V. V.; GORBUNOVA, M. V. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Organic Compounds: An Overview of Reviews. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 75, p. 1237-1251, abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1061934820100056>. Acesso em: 27 nov. 2021.

DONG, Michael, LIANAS, Andrea. The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. **Lc Gc North America**. v. 31, p. 472, jun. 2013. Disponível em: (PDF) The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities (researchgate.net). Acesso em: 17 nov. 2023.

DWAMENA, Amos, K.; RAYNIE, Douglas, E. Solvatochromic Parameters of Deep Eutectic Solvents: Effect of Different Carboxylic Acids as Hydrogen Bond Donor. **Journal of Chemical & Engineering Data**. v. 65, p. 640-646, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00872>. Acesso em: 25 dez. 2023.

ELKHAZEIN, Takreem A.; ABDELJABAR, Tahani A.; ABDELRAHMAN, Amal. N.; ADAM, Mohamed E.; SHANTIER, Shaza W. Development and validation of UV-spectrophotometric method for the determination of folic acid in bulk and tablet dosage forms. **Journal of Applied Pharmaceutical Research**. v. 10, p. 19-23, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.18231/j.joapr.2022.19.23>. Acesso em: 12 nov. 2023.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (ed). EURACHEM/CITAC. Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3 ed. [s.l.]. 2012.

FARAJI, Mohammad. Novel hydrophobic deep eutectic solvent for vórtex assisted dispersive liquid-liquid micro-extraction of two auxins in water and fruit juice samples and determination by high performance liquid chromatography. **Microchemical Journal**. v. 150, p. 104130, nov. 2019. Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104130>. Acesso em: 24 dez. 2023.

FARAJI, Mohammad; MAHMOODI-MAYMAND, Masoumeh; DASTMALCHI, Farnaz. Green, fast and simple dispersive liquid-liquid microextraction method by using hydrophobic deep eutectic solvent for analysis of folic acid in fortified flour samples before liquid chromatography determination, **Food Chemistry**. v. 320, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126486>. Acesso em: 31 out. 2021.

FATIMA, Zakia; JIN, Xiangzi; ZOU, Yilin; KAW, Han Yeong; QUINTO, Maurizio; LI, Donghao. Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. **Journal of Chromatography A**. v. 1606, p. 360245, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.025>. Acesso em: 03 nov. 2021.

FERREIRA, Juliana Lima; OLIVEIRA, Hysa Caroline Carvalho; OLIVEIRA; Sheila Jaqueline Gomes dos Santos; NERY, Felipe Souza. Impacto da fortificação da farinha de milho e trigo nos casos de espinha bífida na região Nordeste. **2º Congresso Internacional de Enfermagem**. v. 1, maio 2019. Disponível em: <https://eventos.set.edu.br/cie/article/view/11599>. Acesso em: 24 out. 2021.

FILHO, Edenir Pereira. **4: Guia da ANVISA, Método dos mínimos quadrados ponderados**. [S. l.]. Youtube, 24 ago. 2022. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=ktVMHkljKQo&t=121s&ab_channel=EdenirPereiraFilho. Acesso em: 11 nov. 2023.

FOLATE – Fact sheet for health professionals. **ODSODNIH.GOV**, 2022. Disponível em: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/>. Acesso em: 11 nov. 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Codex Alimentarius Commission – Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals (CXG 71-2009)**. 2014. 42 p. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>. Acesso em: 28 dez. 2023.

GABER, Yasser; TÖRNVAL, Ulrika; HUMAR, M. A.; AMIN, Magdy, Ali; HATTI-KAUL, Rajni. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**. v. 13, maio 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C0GC00667J>. Acesso em: 17 nov. 2023.

GAMA, Mariana R; MELCHERT, Wanessa R.; PAIXÃO, Thiago R. L. C.; ROCHA, Fábio R. P. An overview of the Brazilian contributions to Green Analytical Chemistry. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**. v. 91, e20180294. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180294>. Acesso em: 05 maio 2024.

GAZZALI, Amirah Mohd; LOBRY, Mathilde; COLOMBEAU, Ludovic; ACHERAR, Samir; AZAÏS, Henri; MORDON, Serge; ARNOU, Philippe; BAROS, Francis; VANDERESSE, Régis; FROCHOT, Céline. Stability of folic acid under several parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 93, p. 419-430, out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.045>. Acesso em: 11 out 2021.

GE, Dandan; WANG, Ying; JIANG, Qian; DAI, Enrui. A Deep Eutectic Solvent as an Extraction Solvent to Separate and Preconcentrate Parabens in Water Samples Using in situ Liquid-Liquid Microextraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 30, p. 1203–1210, maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190014>. Acesso em: 25 dez. 2023.

GONZÁLEZ, A. Gustavo; M. HERRADOR, Ángeles. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, p. 227-238, mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>. Acesso em: 28 nov. 2021.

GOMES, Yasmin Serpa. **Sistemas de liberação mistos vetorizados para moléculas fotoativas: efeitos de auto-organização e fotoproteção**. 2021. 94p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química,

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/229317>. Acesso em: 17 dez. 2023.

GÜRKAN, R; ALTUNAY, N. A simple and efficient ultrasonic-assisted extraction procedure combined with UV-Vis spectrophotometry for the pre-concentration and determination of folic acid (vitamin B9) in various sample matrices. **Food Additives & Contaminants: Part A**. v. 33, p. 1127-1138, jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1191380>. Acesso em: 12 nov. 2023.

HANSEN, Benworth B.; SPITTLE, Stephanie; CHEN, Brian; POE, Derrick; ZHANG, Yong; KLEIN, Jeffrey M.; HORTON, Alexandre; ADHIKARI, Laxmi; ZELOVICH, Tamar; DOHERTY, Brian W; GURKAN, Burcu; MAGGIN, Edward J.; RAGAUSKAS, Arthur; DADMUN, Mark; ZAWODZINSKI, Thomas A.; BAKER, Gary A.; TUCKERMAN, Mark E.; SAVINELLI, Robert F.; SANGORO, Joshua R. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. **Chemical Reviews**. v. 121, p. 1232-1285, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>. Acesso em: 16 nov. 2023.

HERBAUT, Antoine; BARANOFF, Etienne. UV-Visible Absorption Study of the Self-association of Non-ionic Chromonic Triphenylenes TP6EOnM (n = 2, 3, 4) in Dilute Aqueous Solutions: Impact of Chain Length on Aggregation. **CHIMIA International Journal for Chemistry**. v. 69, p. 520–523, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2533/chimia.2015.520>. Acesso em: 24 dez. 2023.

HOUSE, Simon H; NICHOLS, John A. A.; RAE, Sarah. Folates, Folic Acid and Preconception Care – A Review. **Journal of the Royal Society of Medicine Open**. v. 12, p. 1-7, maio 2021. Disponível em: . Acesso em: 15 out 2021 <https://doi.org/10.1177/2054270420980875>. Acesso em: 24 out. 2021

IJARDAR, Sushma P.; SINGH, Vickramjeet; GARDAS, Ramesh L. Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents. **Molecules**. v. 27, p. 1368, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27041368>. Acesso em: 14 nov. 2023.

INMETRO. **DOC-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos analíticos. rev. 09, jun. 2020.

INMETRO. **Vocabulário internacional de metrologia**: conceitos fundamentais e gerias e termos associados (VIM, 2012). Duque de Caxias: INMETRO. 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline**. Washington: National Academy Press. 2000.196-305. Disponível em: <https://www.nap.edu/read/6015/chapter/10#216>. Acesso em: 17 out 2021.

JOSHI, Dirgha Raj; ADHIKARI, Nisha. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. **Journal of Pharmaceutical Research International**. v. 28, p. 1–18, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v28i330203>. Acesso em: 10 mar. 2024.

KANNAIAH, Kanaka Parvathi; SUGUMARAN, Abimanyu Sugumaran; CHANDULURU, Hemanth Kumar; RATHINAM, Seetharaman. Environmental impact of greenness assessment tools in liquid chromatography – A review.

Microchemical Journal, v. 170, p. 106685, nov. 2021. Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106685>. Acesso em: 17 nov. 2023.

KARMIN, O.; WOO, COONIE W. H.; SID, Victoria; SLOW, Yaw L. Nonalcoholic fat liver disease and use of folate. Em PATEL, Vinood B. **Molecular Nutrition: vitamins**. Londres: Academic Press. 2020.

KAYAN, S. Aziz; HEMN, A. Qader. Greenness assessment of developed derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of ascorbic acid and folic acid in pharmaceutical formulation. **PREPRINT** (Version 1). Dez. 2022 Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2352885/v1>. Acesso em: 12 nov. 2023.

KIZIL(a), Nebiye; BEYDAGI, Buse Bozan; YOLA, Mehmet Lütfi; SOYLAK Mustafa. Deep eutectic solvent liquid phase microextraction, powered by ultrasonic system, for determination of β -carotene in food samples. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 125, p. 105807, jan, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105807>. Acesso em: 01 mar. 2024.

KIZIL(b), Nebiye; BASARN, Erkan; YOLA, Mehmet Lütfi; SOYLAK Mustafa. Deep eutectic solvent dispersive liquid–liquid microextraction methods for the analysis of chlorophyll natural colorant (E140) via microwave assisted sample preparation. **Microchemical Journal**. v. 196, p. 109577, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109577>. Acesso em: 01 mar. 2024.

KORAQI, Hyrije; PETKOSKA, Anka Trajkovska; KHALID, Waseem; KUMAR, Nishant; PAREEK Sunil. Optimization of experimental conditions for bioactive compounds recovery from raspberry fruits (*Rubus idaeus* L.) by using combinations of ultrasound-assisted extraction and deep eutectic solvents. **Applied Food Research**. v. 3, p. 100346, dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100346>. Acesso em: 01 jan. 2024.

KORSMO, Hunter W.; JIANG, Xinyin. One carbon metabolism and early development: a diet-dependent destiny. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. v. 32, p. 579-593, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.05.011>. Acesso em: 15 out 2021.

KUMAR, Manish; KUMAR, Abhishek; PANDEY, Siddharth. Effective Recognition of Lithium Salt in (Choline Chloride: Glycerol) Deep Eutectic Solvent by Reichardt's Betaine Dye 33. **Liquids**. v. 3, p. 393-401, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/liquids3040024>. Acesso em: 25 dez. 2023.

LI, Mengyue; LI, Wen; GAO, Yiming; CHEN, Yongjie; BAI, Dong; WENG, Jinxi; DU, Yue; MA, Fei; WANG, Xinyan; LIU, Huan; HUANG, Guowei. Effect of folic acid combined with docosahexaenoic acid intervention on mild cognitive impairment in elderly: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. **European Journal of Nutrition**. v. 60, p. 1795-1808, ago.2021.. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02373-3>. Acesso em: 15 out 2021.

LI-YUAN, Xie; JIE Bai; XIAO-XIA Zhang; XUAN Chen; XIAO-HONG Bai; SHUANG Hu. Simultaneous determination of curcuminoids in *Curcumae Longae* Rhizoma and turmeric tea using liquid-phase microextraction based on solidification of floating deep eutectic solvent drop. **Microchemical Journal**. v. 159, p. 105341, dez. 2020. Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105341>. Acesso em : 01 mar. 2024.

LYON, Peter; STRIPPOLI, Victoria; FANG, Byron; CIMMINO, Luisa. (2020). B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. **Nutrients**. v. 12, 2867, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12092867>. Acesso em: 15 out 2021.

MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. (eds.) **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2 ed. 2014. Disponível em: www.eurachem.org. Acesso em: 15 ago. 2021.

MAKOŚ, Patrycja; STUPEK, Edyta; GEBICKI, Jacek. Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review. **Microchemical Journal**. v. 152, p. 104384, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384>. Acesso em 14 dez. 2023.

MARCHETTI, Claudia; PALAIA, Innocenza; GIORGINI, Margherita; De MEDICI, Caterina; IADAROLA, Roberta; VERTECHY, Laura; DOMENICI, Lavinia; Di DONATO, Violante; TOMAO, Federica; MUZII, Ludovico; BENEDETTI, Panici P. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. **Onco Targets and Therapy**. v. 10, p. 1223-1236, jul. 2014. doi: 10.2147/OTT.S40947. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25031539/>. Acesso em: 23 out. 2021.

MARTINELLO, Tiago. **Desenvolvimento de comprimidos de paracetamol de 500 mg por compressão direta utilizando o planejamento estatístico de mistura**. 2005. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, [São Paulo], 2005. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-31082006-160216/publico/Tiago_Martinello.pdf. Acesso em: 13 jan. 2024.

MATIAS, R.; RIBEIRO, P. R. S.; SARRAGUÇA, M. C.; LOPES, J. A. A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3065-3071, fev. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY41874J>. Acesso em: 13 nov. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Suplementação de Ferro**: manual de condutas gerais. 1. ed. Brasília, 2013. 26 p. Disponível em: [manual_suplementacao_ferro_condutas_gerais.pdf](http://saude.gov.br/manual_suplementacao_ferro_condutas_gerais.pdf) (saude.gov.br). Acesso em: 17 nov. 2023.

MODUPE, Oluwasegun; MAURRAS, Julie Bloquet; DIOSADY Levente, L. A spectrophotometric method for determining the amount of folic acid in fortified salt.

Journal of Agriculture and Food Research. v. 2, p. 100060. dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100060>. Acesso em: 14 nov. 2021.

NAGARAJA, Padmarajaiah; VASANTHA, Ramanathapura A.; YATHIRAJAN, Hemmige S. Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical preparations by coupling reactions with iminodibenzyl or 3-aminophenol or sodium molybdate-pyrocatechol. **Analytical Biochemistry.** v. 7, p. 316-321, ago. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00038-6). Acesso em: 12 nov. 2023.

NAJM, Mazin A., A.; ABD-ALRASSOL, Khawla; Salman, QASIM; Qutaiba A.; HUSSEIN, Hussein H.; AL-SALMAN, H. N. K. Spectrophotometric determination of folic acid using 1,10- phenanthroline materials with ninhydrin reagent. **Materials Today: Proceedings.** v. 61, p. 865-872, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.09.453>. Acesso em: 13 nov. 2023.

NASSER, Carina; NOBRE, Cássia; MESQUITA, Suely; RUIZ, José Gomes; CARLOS, Hosana Reis; PROUVT, Lígia; YACUBIAN, Elza Márcia Targas. Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology.** v. 11, p. 199-203, dez. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-26492005000400009>. Acesso em: 13 out 2021.

NGHIA, Nguyen Ngoc; HUY, Bui The; LEE, Yong-Il Lee. Paper-based colorimetric probe for highly sensitive detection of folic acid based on open-ring form amplification of rhodamine B derivative. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry.** v. 81, p. 352-359, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.09.025>. Acesso em: 12 nov. 2023.

NOJAVAN, Yones; KAMANKESH, Marzieh; SHAHRAZ, Farzaneh; HASHEMI, Maryam; MOHAMMADI, Abdorreza. Ion pair-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography as a new method for determining five folate derivatives in foodstuffs. **Talanta.** v. 137, 31-37, maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.010>. Acesso em: 01 nov. 2021.

OFF, Morten. Kristian; STEINDAL, Engest Arnfinn; POROJNICU, Alina Carmen; JUZENIENE, Asta; VOROBAY, Alexander; JOHNSON, Andres; MOAN, Johan. Ultraviolet photodegradation of folic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.** v. 80, p. 47–55, abr. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.03>. Acesso em: 17 dez 2023.

OWEN, Tony. **Fundamentals of modern UV-Visible spectroscopy.** Germany: Agilent Technologies. 2000. 136 p.

PACZKOWSKI, Ingrid Maliszewski; CAMPO, Leandra Franciscato. Solvatocromismo e as escalas empíricas de polaridade do solvente: uma revisão. **Química Nova.** v. 46, p. 998–1004, jul. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230080>. Acesso em: 24 dez. 2023.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary, M.; KRIZ, George, S.; VYVYAN, James, R. **Introduction to spectroscopy**. 5 ed. NY, Stamford: Cengage Learning. 2015. 786 p.

PAWLISZYN, Janusz. New direction in sample preparation for analysis of organic compounds. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 14, p. 113-122, mar. 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(95\)94044-F](https://doi.org/10.1016/0165-9936(95)94044-F). Acesso em: 31 out. 2021.

PENA-PEREIRA, F; WOJNOWSKI, W; TOBISZEWSKI, M. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**. jun. 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.0c01887>. Acesso em: 14 jan. 2023.

PÉREZ, Lisbeth Joana Pineda. **Evaluación de retinol (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) y ácido fólico (vitamina B₉) en tres flores comestibles nativas de Guatemala**. 2017. 65p. Tesis – Faculdade de Ciência Químicas e Farmacêuticas, Universidade de São Carlos da Guatemala, Guatemala, 2017. Disponível em: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1467.pdf>. Acesso em: 12 out 2021.

PESQUISA de mercado ABIAD. **ABIAD.ORG.BR**, 2021. Disponível em: <https://abiad.org.br/pesquisa-de-mercado-suplementos-alimentares/>. Acesso em: 10 nov. 2023.

POURMOHAMMAD, Mahsa; FARAJI, Mohammad; JAFARINEJAD, Shahryar Jafarinejad. Extraction of chromium (VI) in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent and determination by UV–Vis spectrophotometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. v. 100, p. 1146-1159, ago. 2019. Disponível em: <https://10.1080/03067319.2019.1650920>. Acesso em: 25 dez. 2023.

QU, Qi; LV, Yaying; LIU, Lingling; ROW, Kyung Ho; Zhu, Tao. Synthesis and characterization of deep eutectic solvents (five hydrophilic and three hydrophobic), and hydrophobic application for microextraction of environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 411, p. 7489-7498, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02143-z>. Acesso em: 15 nov. 2023.

RAYNIE, Douglas E. Modern extraction techniques. **Analytical Chemistry**. v. 78, p. 3997-4004, maio 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac060641y>. Acesso em: 14 nov. 2021.

RIBEIRO, Marco Vinícius de Moura; MELO, Ingrid da Sila; LOPES, Francisco das Chagas da Costa; MOITA, Graziella Ciaramella. Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 52, p. 741-750, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502016000400019>. Acesso em: 12 nov. 2023.

RUGGERI, S.; POLETTI, F.; ZANARDI, C.; PIGANI, L.; ZANFROGNINI, B.; CORSI, E.; DOSSI, N.; SALOMÄKI, M.; KIVELÄ, H.; LUKKARI, J.; TERZI, F. Chemical and electrochemical properties of a hydrophobic deep eutectic solvent. **Electrochimica Acta**. v. 295, p. 124-129, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.086>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SANTANA, Ana. P. R.; ANDRADE, Daniel. F.; GUIMARÃES, Taciana. G. S.; AMARAL, Clarice. D. B.; OLIVEIRA, Andrea.; NOGUEIRA, Ana. R. A.; GONZALEZ, Mario. H. Solventes eutéticos naturais profundos (NADES) no preparo de amostras de rocha fosfática e suplemento mineral para determinação elementar por técnicas de plasma. **Química Nova**. v. 44, p. 689-695, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170723>. Acesso em: 15 nov. 2023.

SANTOS, Luana Bastos. **Solventes verdes e colorimetria digital: novas abordagens em micro extração em fase líquida para a determinação de elementos traço**. 2022. 120p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022. Disponível em: https://ppgq.ufba.br/sites/ppgq.ufba.br/files/tese_-_luana_bastos_santos.pdf. Acesso em: 10 out. 2023.

SANTOS, Marcela da Silva; SANTOS, Helen Mara dos; MELO, Ivone Maria; SANTOS, Elisa Norberto Ferreira; TEIXEIRA, Estelamar Maria Borges; NONNAS, Deborah Santesso; JARDIM, Fernanda Barbosa Borges. Análise crítica dos rótulos de suplementos alimentares comercializados em Uberaba, MG. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 95046-95061, dez. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n12-116>. Acesso em: 10 nov. 2023

SANTOS, Sandra Maria Chaves; RAMOS, Flávia Pascoal; MEDEIROS, Maria Angélica Tavares; MATA, Mayline Menezes; VASCONCELOS, Franciso de Assis Guedes. Avanços e desafios nos 20 anos da Política Nacional de Alimentação e Nutrição. **Cadernos De Saúde Pública**. v. 37, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00150220>. Acesso em 11 nov. 2023.

SAVITZKY, Abraham; GOLAY, Marcel J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**. v. 36, p. 1627-1639, 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>. Acesso em 10 set. 2023.

SCHETTINO, Gabriela; RAMOS-SILVA, Valmin; SARTI, Thiago Dias. Folic Acid Protection in Congenital Neural Tube Defects: A Narrative Review. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**. v. 36, p. 173-177, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/jammr/2024/v36i15361>. Acesso em: 02 mar. 2024.

SHALATONIN, Valery; POLLACK, Gerald H. Effect of unipolar magnetic fields on UV absorption and evaporation of water. **Chemical Physics Impact**. v. 4, p. 100077, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2022.100077>. Acesso em: 11 dez. 2023.

SHANE, Barry. Folate chemistry and metabolism. Em BAILEY, Lynn B (ed.). **Folate in health and disease**. 2. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 583 p.

SHCHELOKOVA, E. A.; KOPKOVA, E. K.; GROMOV, P. B., & KOROTKOVA, G. V. Solubility of monohydric aliphatic alcohols in water and aqueous HCl solutions. **Russian Journal of Applied Chemistry**. v. 85, p. 465–469, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/s1070427212030251>. Acesso em: 19 dez. 2023.

SHIMADZU. 7 Key Differences in the Use of Methanol and Acetonitrile. **SHIMADZU**. 2020. Disponível em: <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/technical-support/lib/methanol-acetonitrile.html#a>. Acesso em: 18 dez. 2023.

SHISHEHBORE, M. Reza; SHEIBANI, A.; HAGHDOST, A. kinetic spectrophotometric method as a new strategy for the determination of vitamin B9 in pharmaceutical and biological samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 81, p. 304-307, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.06.015>. Acesso em: 13 nov. 2023.

SHULPEKOVA, Yulia; NECHAEV, Vladimir; KARDASHEVA, Svetlana; SEDOVA, Alla; KURBATOVA, Anastasia; BUEVEROVA, Elena; KOPYLOV, Arthur; MALSAGOVA, Kristina; DLAMINI, Jabulani C.; IVASHKIN, Vladimir. The Concept of Folic Acid in Health and Disease. **Molecules**. v. 26, p. 3731, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26123731>. Acesso em: 15 out 2021.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, James F.; NIEMAN, Timothy A. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookman. 5 ed. Elsevier. 2002. 836 p.

SKULKOVA, Andrea; RUSS, Albert; JABLONSKY, Michal; SIMA, Jozef. The pH Behavior of Seventeen Deep Eutectic Solvents. **BioResources**. v. 13. P. 5042-5051, maio. 2018. Disponível em: <https://doi.org/0.15376/biores.13.3.5042-5051>. Acesso em: 16 nov. 2023.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; TORRES-CORNEJO, M.V.; ÁLVAREZ-RIVERA, G.; MENDIOLA, J.A. Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products. **Applied Sciences**. v. 11, 4897, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app11114897>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SOEST, Annick P. M. van; REST, Ondine van de; WITKAMP, Renger F.; GROOT, Lisette C. P. G. M. de. Positive effects of folic acid supplementation on cognitive aging are dependent on ω -3 fatty acid status: a post hoc analysis of the FACIT trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 113, p. 801-809, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa373>. Acesso em: 15 out. 2021.

SOOVÄLI, Lilli; RÕÕM, Eva-Ingrid; KÜTT, Agnes; KALJURAND, Ivari; LEITO, Ivo. Uncertainty sources in UV-Vis spectrophotometric measurement. **Accreditation and Quality Assurance**. v. 11, p. 246–255, abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0124-x>. Acesso em: 21 jan. 2024.

STELUTI, Josiane. **Consumo dietético, variantes genéticas e relação com os níveis sanguíneos de folato, ácido fólico não metabolizado e homocisteína após a fortificação mandatória de ácido fólico: estudo de base populacional – ISA-Capital**. 2014. 119p. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6138/tde-26052015-091804/publico/JosianeSteluti.pdf>. Acesso em: 24 out. 2021.

STOVER, Patrick J. Folate biochemical pathways and their regulation. Em BAILEY, Lynn B (ed.). **Folate in health and disease**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

STOVER, Patrick J.; FOX, Jennifer T. Folate-mediated one carbon metabolism. Em LITWACK, Gerald (ed). **Folic acid and folates**. 1. ed. [s.l]: Academic Press, 2008.

SZAKÁCS, Zoltán; NOSZÁL, Béla. Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 27, p. 3399–3409, abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.200600128>. Acesso em: 15 dez. 2023.

TAIRA, Junsei. Oxidative stress modulators and functional foods. **Antioxidants**. v. 10, p. 191, jan. 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3390/antiox10020191>. Acesso em: 15 out 2021.

TAIRA, Junsei; TAKAYUKI Ogi. Nitric Oxide Modulation by Folic Acid Fortification. **Antioxidants**. v. 9, p. 393, maio 2020, doi:10.3390/antiox9050393. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox9050393>. Acesso em: 15 out 2021.

TANG, Sheng; ZHANG, Hong; LEE, Hian Kee. Advances in Sample Extraction. **Analytical Chemistry**. v. 5, p. 228-249, jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04040>. Acesso em: 14 nov. 2021.

TANG, Weiyang; AN, Yena; ROW, Kyung Ho. Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 136, p. 116187, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116187>. Acesso em: 15 nov 2023.

THABET, Romany, H.; ALESSA, Raneem Eid Mustafa; AL-SMADI, Zahraa Khaldoon Khaleel; ALSHATNAWI, Banah Saleh Gabr; AMAYREH, Batool Mahmoud Ibrahim; AL-DWAAGHREH, Renad Bilal Ahmad; SALAH, Sereen Khalid Ahmad. Folic acid: friend or foe in cancer therapy. **Journal of International Medical Research**. v. 52, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/03000605231223064>. Acesso em: 02 mar. 2024.

THANGAVEL, Neelaven; AL-BRATTY, Mohammad; AL-HAZMI, Hassan; NAJMI, Asim; SIVADASAN, Durgaramani. Structural Attributes of Organic Compounds for UV-Spectrophotometric Determination of Dissociation Constant – A Systematic Review. **Oriental Journal of Chemistry**. v. 38, fev. 2022. Disponível em: <https://bit.ly/3rOsGAe>. Acesso em: 17 dez. 2023.

TOBISZEWSKI, Marek; MECHLIŃSKA, Agata; NAMIEŚNIK, Jacek. Green analytical chemistry - Theory and practice. **Chemical Society reviews**. v. 39, p. 2869-2878, maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b926439f>. Acesso em: 30 nov. 2021.

TONG, Angxin; TANG, Xiaojun; ZHANG, Feng; WANG, Bin. Study on the shift of ultraviolet spectra in aqueous solution with variations of the solution concentration, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 234, p. 18259, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118259>. Acesso em: 11 dez. 2023.

TONG, Hanzhi; WALKER, Neff. Current levels of coverage of iron and folic acid fortification are insufficient to meet the recommended intake for women of reproductive age in low- and middle-income countries. **Journal of global health**. v. 11, p. 18002, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7189/jogh.11.18002>. Acesso em: 24 out. 2021.

TUNA, Begüm Hatice; GÜRBÜZ Murat; UĞUR Halime; ÇATAK Jale; YAMAN Mustafa. Vitamin C bioaccessibility of commercially available dietary supplements: Quantity vs efficiency, does it matter? **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 123, p. 10558, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105558>. Acesso em: 11 nov. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (WHO). **Human Vitamin and Mineral requirements: report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand**. Rome: FAO. 2001. Disponível em: <https://www.fao.org/3/y2809e/y2809e.pdf>. Acesso em: 18 out. 2021.

WU, Zhen; LI, Xiuxi; HOU, Chunyan; QIAN, Yu. (2010). Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at Temperatures (298.15, 303.15, and 313.15) K. **Journal of Chemical and Engineering Data**. v. 55, p. 3958-3961, jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jc1000268>. Acesso em: 09 nov 2023.

WYK, Jesse van; DOLLEY, Larry; MSHICILELI, Ndumiso. Chapter 5. HPLC analysis of Vitamin B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂ and vitamin C in various food matrices. Em VALDEZ, Lindsey (ed.). **Encyclopedia of vitamins: new research**. Nova York: Nova Science Publishers. Volume 1. 2019. 1271 p.

YAKUPOVA, Zilya; YAKUBENKO, Artyom; BOGDANOVA, Polina; GODUNOV, Pavel; VAKH, Christina; GARMANOV, Sergey; BULATOV, Andrey. Solidified floating organic drop microextraction procedure based on deep eutectic solvent for the determination of melatonin in pharmaceuticals and dietary supplements, **Microchemical Journal**. v. 187, p. 108373, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108373>. Acesso em: 01 mar. 2024.

YAMAN, Mustafa; ÇATAK, Jale; UĞUR, Halime; GÜRBÜZ, Murat; BELLİ, İsmail; TANYILDIZ, Sena Nur; YILDIRIM, Hatice; CENGİZ, Serdar; YAVUZ, Bilal Burak; KIŞMIROĞLU, Cemalettin; ÖZGÜR, Bahtiyar; YALDIZ, Muhammet Cihan. The bio accessibility of water-soluble vitamins: A review. **Trends in Food Science and**

Technology. v. 109, p. 552-563, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.056>. Acesso em: 27 set. 2021.

YUVALI, Donay; SEYHANEYILDIZI, Müslüm; SOYLAK, Mustafa; NARIN, İbrahim; YILMAZ, Erkan. An environment-friendly and rapid liquid-liquid microextraction based on new synthesized hydrophobic deep eutectic solvent for separation and preconcentration of erythrosine (E127) in biological and pharmaceutical samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 244, p. 118842, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118842>. Acesso em: 01 mar. 2024.

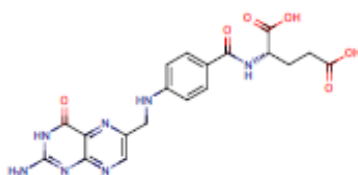
ZAINAL-ABIDIN, Mohamad Hamdi; HAYYAN, Maan; WONG, Won Fen. Hydrophobic deep eutectic solvents: Current progress and future directions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 97, p. 142-162, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.03.011>. Acesso em: 01 nov. 2021.

ZAMANI, M; REZAIJAN, F; SAADATI, S; NASERI, K; ASHTARY-LARKY, D; YOUSEFI, M; GALOLIPOUR, E; CLARCK, C. C T; RASTGOO, S; ASBAGHI, O. The effects of folic acid supplementation on endothelial function in adults: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition Journal**. v. 24, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12937-023-00843-y>. Acesso em: 17 nov. 2023.

ZHANG, Yuyang; ZHANG, Wei; DAI, Yutian; JIANG, Hui; ZHANG; Xiansheng. Serum Folic Acid and Erectile Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sexual Medicine**. v. 9, p. 100356, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.esxm.2021.100356>. Acesso em: 15 out 2021.

APÊNDICE A – RESULTADOS DE CÁLCULOS DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÁCIDO FÓLICO OBITIDAS PELOS PROGRAMA CHEMICALIZE

Results



Input	folc acid
Use major tautomer	✓ <chem>NC1=NC2=NC=C(CNC3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)N=C2C(=O)N1</chem>
Molar mass	441.404 g/mol
Exact mass	441.13968136 Da
Formula	$C_{19}H_{19}N_7O_5$
Composition	C (51.70%), H (4.34%), N (22.21%), O (21.75%)
Lipinski's rule of five	✗

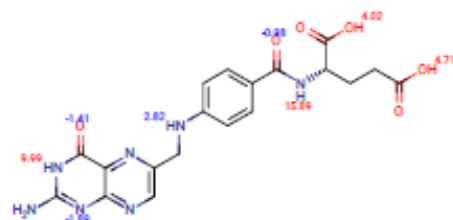
Structural properties

Atom count	51
Heavy atom count	32
Asymmetric atom count	1
Rotatable bond count	9
Ring count	3
Aromatic ring count	3
Hetero ring count	2
FSP3	0.21
Hydrogen bond donor count	6
Hydrogen bond acceptor count	11
Formal charge	0
Topological polar surface area	208.99 Å ²
Polarizability	40.27 Å ³
Molar refractivity	111.44 cm ³ /mol

Names and identifiers

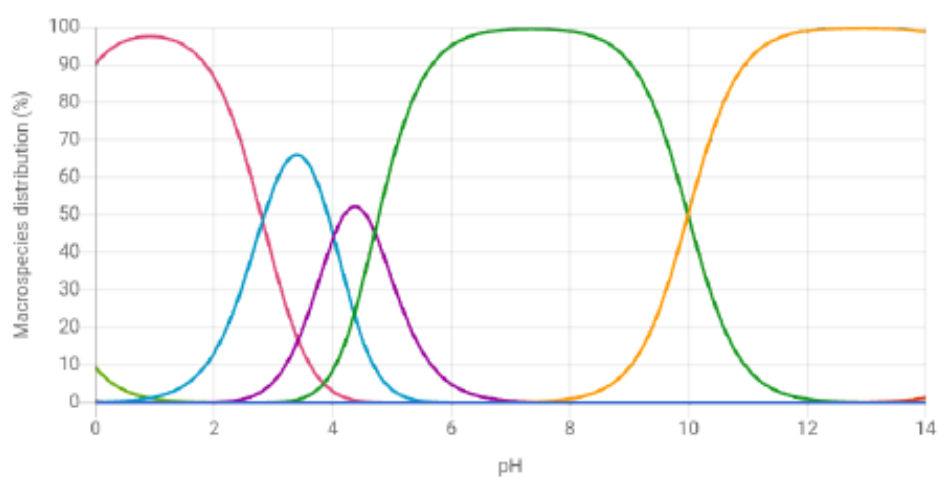
IUPAC name	(2S)-2-[(4-[(2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methyl]amino)phenyl]formamido]pentanedioic acid
Traditional name	PteGlu
Common names	PteGlu; folsaeure
SMILES	<chem>NC1=NC2=NC=C(CNC3=CC=C(C=C3)C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)O)N=C2C(=O)N1</chem>
InChI	InChI=1S/C19H19N7O6/c20-19-25-15-14(17(30)26-19)23-11(8-22-15)7-21-10-3-1-9(2-4-10)16(29)24-12(18(31)32)5-6-13(27)28/h1-4,8,12,21H,5-7H2,(H,24,29)(H,27,28)(H,31,32)(H3,20,22,25,26,30)/t12-/m0/s1
InChIKey	OVBPIULPVIDEAO-LBPRGKRZSA-N
CAS Registry Numbers®	Click here, to check CAS Registry Numbers®

pKa

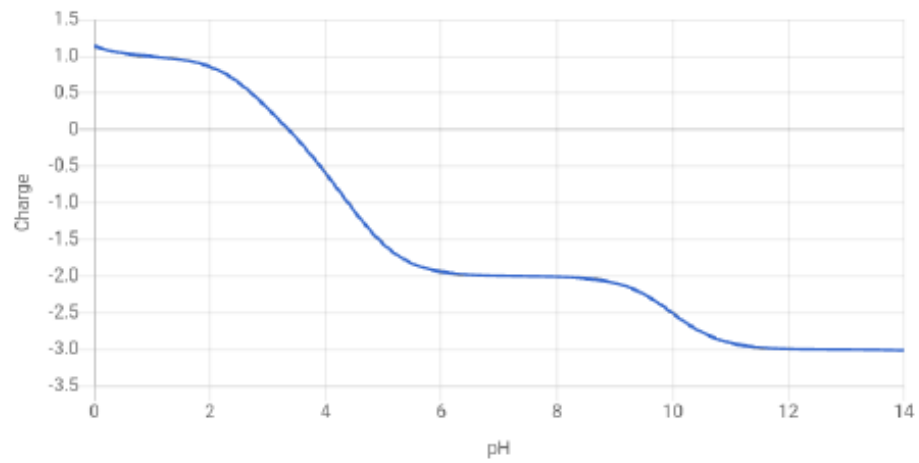


Strongest acidic pKa: 4.02

Strongest basic pKa: 2.82



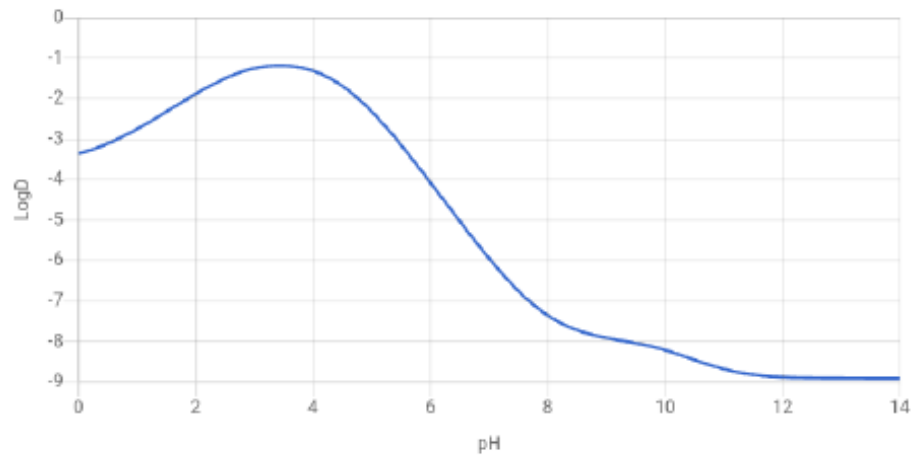
Isoelectric point



Isoelectric point: 3.36

pH	Charge
1.7	0.93
4.6	-1.21
6.5	-1.98
7.4	-2.00
8.0	-2.01

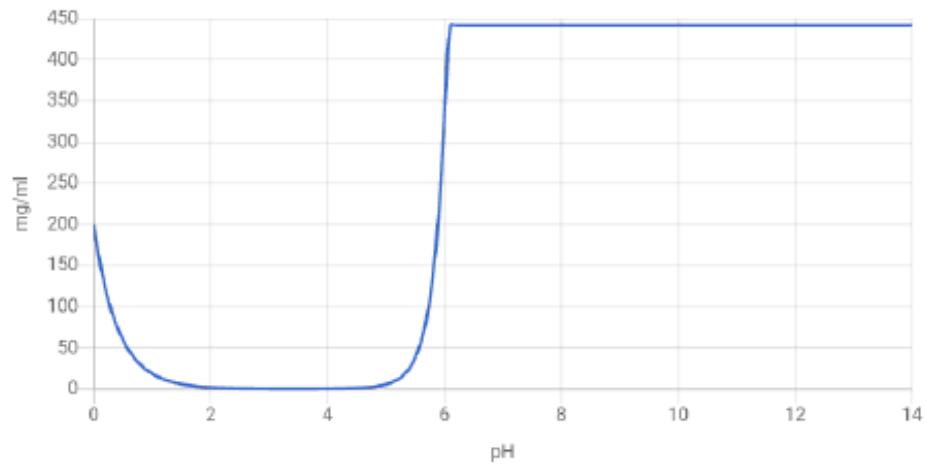
Lipophilicity



LogP: -1.252
HLB: 16.963

pH	logD
1.7	-2.14
4.6	-1.80
6.5	-5.03
7.4	-6.61
8.0	-7.36

Solubility



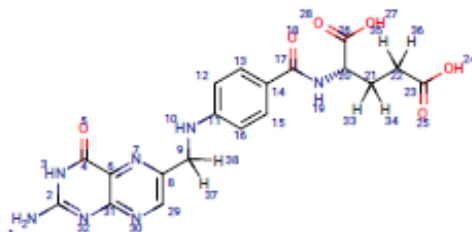
Intrinsic solubility: -3.208 mg/ml
Solubility category: High

pH	Solubility [mg/ml]
1.7	3.88
4.6	1.67
6.5	441.40
7.4	441.40
8.0	441.40

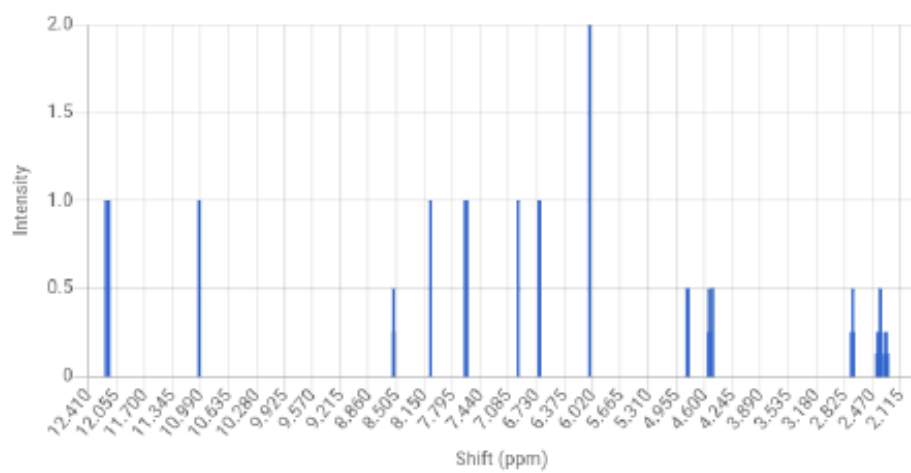
Geometry

Van der Waals volume	363.38 Å ³
Van der Waals surface area	558.31 Å ²
Solvent accessible surface area	653.91 Å ²
Topological polar surface area	208.99 Å ²
Minimum projection area	52.98 Å ²
Maximum projection area	112.55 Å ²
Minimum projection radius	5.34 Å
Maximum projection radius	10.67 Å

H-NMR



Atoms	Shift	Intensity	Multiplet	Quality
33	1.960 ppm	1	sx	good
34	2.098 ppm	1	sx	good
35	2.114 ppm	1	t	good
36	2.505 ppm	1	t	good
37	4.316 ppm	1	d	good
20	4.405 ppm	1	t	good
38	4.712 ppm	1	d	good
1, 1	5.989 ppm	2	s	rough
12, 16	6.668 ppm	2	d	good
10	6.980 ppm	1	s	rough
13, 15	7.678 ppm	2	d	good
19	8.170 ppm	1	s	rough
29	8.675 ppm	1	t	good
3	11.179 ppm	1	s	rough



APÊNDICE B – EQUAÇÕES DOS COEFICIENTES DE SENSIBILIDADE E GRAUS DE LIBERDADE EFETIVOS PARA ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

$$C_{AF,ABS} = \frac{\partial C_{AF}}{\partial ABS} = \frac{V_{diluição} \times m_{cápsula}}{b \times m_{amostra}} \quad (\text{Equação B1})$$

$$C_{AF,a} = \frac{\partial C_{AF}}{\partial a} = -\frac{V_{diluição} \times m_{cápsula}}{b \times m_{amostra}} \quad (\text{Equação B2})$$

$$C_{AF,b} = \frac{\partial C_{AF}}{\partial b} = \left[\frac{(ABS-a) \times V_{diluição} \times m_{cápsula}}{m_{amostra}} \right] \times \left(-\frac{1}{b^2} \right) \quad (\text{Equação B3})$$

$$C_{AF,V_{diluição}} = \frac{\partial C_{AF}}{\partial V_{diluição}} = \frac{(ABS-a) \times m_{cápsula}}{b \times m_{amostra}} \quad (\text{Equação B4})$$

$$C_{AF,m_{cápsula}} = \frac{\partial C_{AF}}{\partial m_{cápsula}} = \left[\frac{(ABS-a) \times V_{diluição}}{b \times m_{amostra}} \right] \quad (\text{Equação B5})$$

$$C_{AF,m_{amostra}} = \frac{\partial C_{AF}}{\partial m_{amostra}} = \left[\frac{(ABS-a) \times V_{diluição} \times m_{cápsula}}{b} \right] \times \left(-\frac{1}{m_{amostra}^2} \right) \quad (\text{Equação B6})$$

$$C_{AF,Precisão} = \frac{\partial C_{AF}}{\partial Precisão} = \left[\frac{(ABS-a) \times V_{diluição} \times m_{cápsula}}{b \times m_{amostra}} \right] \quad (\text{Equação B7})$$

$$v_{eff} = \frac{\mu_{C_{AF}}^4}{\frac{(C_{AF,ABS} \times \mu_{C_{AF}})^4}{n-1} + \frac{(C_a \times \mu_a)^4}{n-1} + \frac{(C_b \times \mu_b)^4}{n-1} + \frac{(C_{V_{diluição}} \times \mu_{V_{diluição}})^4}{\infty} + \frac{(C_{m_{cápsula}} \times \mu_{m_{cápsula}})^4}{\infty} + \frac{(C_{m_{amostra}} \times \mu_{m_{amostra}})^4}{\infty} + \frac{(C_{Precisão} \times \mu_{Precisão})^4}{\infty}} \quad (\text{Equação B8})$$

ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO ÁCIDO FÓLICO – MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO



www.sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis – Certified Reference Material

FOLIC ACID

Product no.: PHR1035-1G

Lot no.: LRAC7879

Description of CRM: Yellow Powder

Expiry date: 31 October 2024

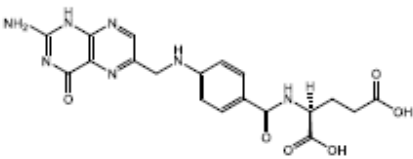
Storage: 2 °C to 30 °C

Certificate version: LRAC7879.03 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopelal Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigmaaldrich.com for the most current version.)

Chemical formula: C₁₉H₁₉N₇O₆

Molecular mass: 441.4

CAS No.: 59-30-3



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty U , $U=k \cdot u$ ($k=$) (Mass Balance/basis)
Folic Acid	99.0 % $U_{\text{CRM}} = \pm 0.3 \%$, $k = 2.0$ (anhydrous basis) 94.3 % $U_{\text{CRM}} = \pm 0.3 \%$, $k = 2.0$ (as is basis)

Metrological traceability: Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

Measurement method: Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

Intended use: Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses

Minimum sample size: 8 mg

Instructions for handling and correct use: For USP applications, determine water content prior to use, and use on the anhydrous basis. For EP and BP applications, use on the as is. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

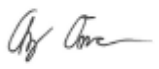
Health and safety information: All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

Accreditation: Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

Certificate issue date: 22 June 2023



ISO 17034
AR-1470


 [Andy Ommen; Quality Control]


 Shawn Stetler- QA Manager

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;
Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; www.sigmaaldrich.com
Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Certificate Page 1 of 6
Certificate version 03

Packaging: 1g in amber vial

Details on metrological traceability:

This standard has been gravimetrically prepared using balances that have been fully qualified and calibrated to ISO 17025 requirements. All calibrations utilize NIST traceable weights which are calibrated externally by a qualified ISO 17025 accredited calibration laboratory to NIST standards. Qualification of each balance includes the assignment of a minimum weighing by a qualified and ISO 17025 accredited calibration vendor taking into consideration the balance and installed environmental conditions to ensure compliance with USP tolerances of NMT 0.10% relative error. Fill volume to predetermined specifications is gravimetrically verified throughout the dispensing process using qualified and calibrated balances. Further traceability to a corresponding Primary Standard may be achieved through a direct comparison assay. Where a Primary Standard is available, the assay value will be included in the specified section of the COA.

Associated uncertainty:

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U_{CRM}) corresponding to the 95% confidence interval. U_{CRM} is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k , which is obtained from a t -distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

Traceability Assay:

Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards

ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (anhydrous)

ASSAY VALUE	vs. USP LOT
98.9 %	R056H0
	Labeled Content = 0.989 mg/mg

ASSAY vs. EP CRS (as is basis)

ASSAY VALUE	vs. EP BATCH
91.8 %	9.0
	Labeled Content = 90.7 %

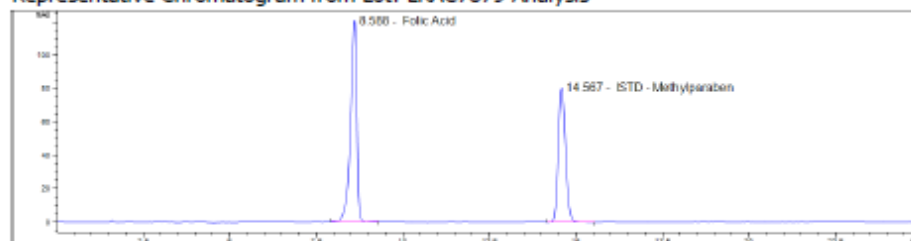
ASSAY vs. BP CRS (as is basis)

ASSAY VALUE	vs. BP BATCH
92.5 %	3282
	Labeled Content = 91.2 %

Method: HPLC (ref.: Folic Acid, Current Compendial Monographs)

Column: Ascentis Express C18, 25 cm x 4.6mm, 5 μ m particle size
 Mobile Phase: 2.0 g/L Potassium Phosphate Monobasic in 70.8% Water, 0.7% 3N Phosphoric Acid, 1.5% 0.5M Tetrabutylammonium Hydroxide in Methanol, 27% Methanol, pH: 5.0
 Mobile Phase Ratio: 100
 Flow Rate: 1.2 mL/min
 Column Temperature: 25 °C
 Injection Volume: 10 μ L
 Detector: Wavelength: 280 nm

Representative Chromatogram from Lot: LRAC7879 Analysis



Certification process details:

The certified purity is determined by mass balance and calculated as

$$\% \text{ Purity} = (100 - \text{ROI} - \text{LOD} - \text{H}_2\text{O} - \text{RS}) * \left(\frac{100 - \text{TCI}}{100} \right)$$

- TCI = Total Chromatographic Impurities
- LOD = Loss on Drying
- H₂O = Water content determined by Karl Fischer analysis
- ROI = Residue on Ignition
- RS = Residual Solvents

Methods for impurity determination may be added or deleted as required. The following techniques are applied:

CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS

METHOD: HPLC (ref.: Folic Acid, Current Compendial Monographs)

Column: Ascentis Express C18, 250 mm x 4.6mm, 5µm particle size

Mobile Phase: 2.0g Potassium phosphate monobasic, 15 mL 0.5M TBA-OH (in MeOH), 7.0 mL of 3N phosphoric acid in 650 mL water + 270 mL Methanol. (Adjust to pH = 5.0 with 3N phosphoric acid or 6N ammonium hydroxide)

Flow Rate: 1.2 mL/min

Column Temperature: 30 °C

Injection Volume: 5 µL

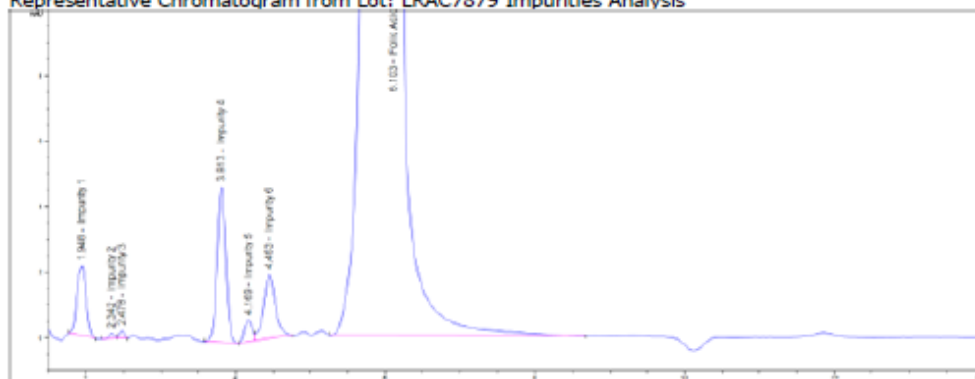
Detector: DAD, Wavelength: 280 nm

Impurities Detected:

Impurity 1:	0.202 %	Impurity 2:	0.010 %
Impurity 3:	0.025 %	Impurity 4:	0.456 %
Impurity 5:	0.073 %	Impurity 6:	0.191 %

Total Impurities: 0.956 %

Representative Chromatogram from Lot: LRAC7879 Impurities Analysis



RESIDUAL SOLVENTS

Method: GC-MS Headspace (ref.: Adapted from Residual Solvents USP <467>)

Column: SPB-624, 30 m x 0.25 mm x 1.4 µm

Carrier gas: He

Flow: 1.2 mL/min

Split Ratio: 1:5

Injection/Temperature: 1 mL/220 °C

Temperature Program: 40 °C for 5 min, 8 °C/min to 200 °C, hold 5 min

Solvents Detected: **None**

WATER DETERMINATION

Method: Karl Fischer (ref.: Current Compendial Monographs)

Mean of three measurements, Water Content = **4.78 %****RESIDUE ANALYSIS**

Method: Sulfated Ash (ref.: Current Compendial Monographs)

Sample Size: ~ 90 mg

Mean of three measurements, Residue = **0.048 %****CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE**99.0 % U_{CRM} = ± 0.3 %, k = 2.0 (anhydrous basis)94.3 % U_{CRM} = ± 0.3 %, k = 2.0 (as is basis)

Homogeneity assessment: Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical method: HPLC

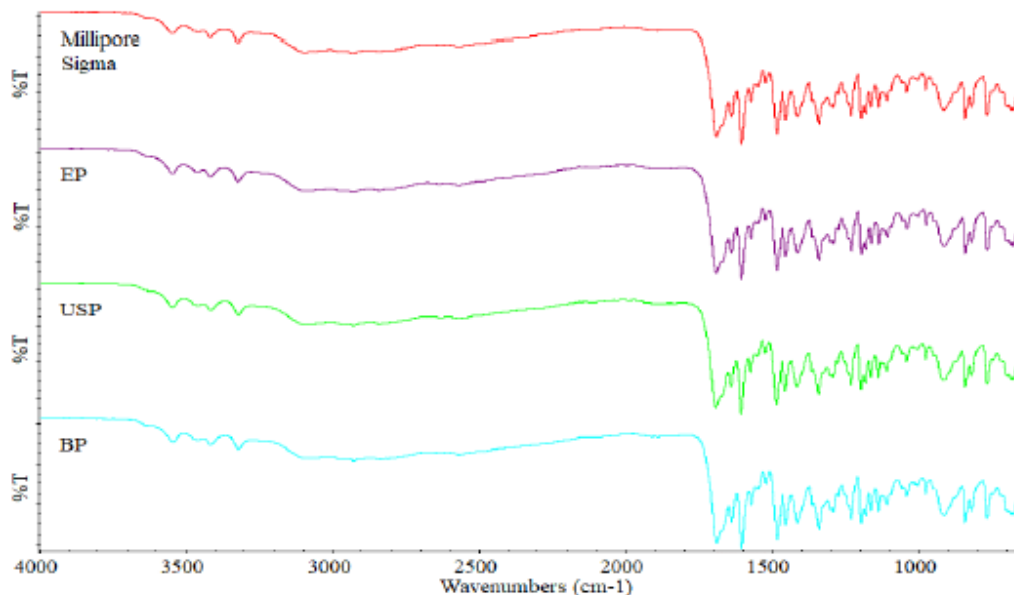
Sample size: 8 mg

Stability assessment: Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial evaluation.

Long Term Stability Evaluation - An assessment, or re-test, versus a Compendial Reference Standard may be scheduled, within the 3 year anniversary date of a release of a Secondary Standard. The re-test interval will be determined on a case-by-case basis. Short Term Stability Study - It is useful to assess stability under reasonably anticipated, short term transport conditions by simulating exposure of the product to humidity and temperature stress. This type of study is conducted under controlled conditions of elevated temperature and humidity.

Identification Test:

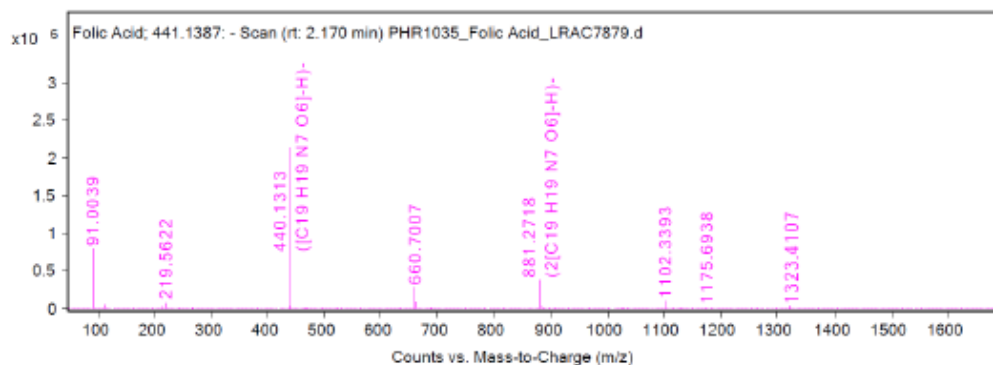
INFRARED SPECTROPHOTOMETRY (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopeial standards)



MilliporeSigma Lot: LRAC7879 vs. EP 9.0 / USP R056H0 / BP 3282
Indicative Values:

MASS SPECTRUM

Method: HR-QTOF; 4.0 kV ESI-; temperature: 325 °C

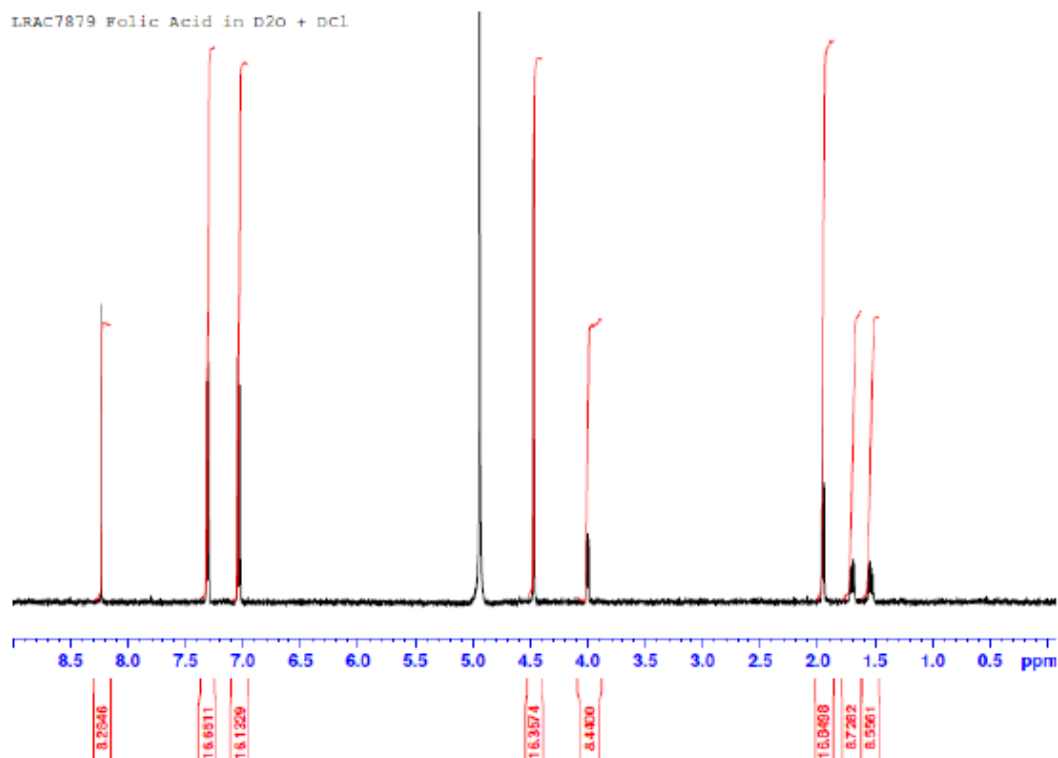


Theoretical value: 440.1319 m/z

The signal of the MS spectrum is consistent with the theoretical value and its interpretation is consistent with the structural formula.

¹H NMR (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)

LRAC7879 Folic Acid in D₂O + DCl



Consistent with structure

OPTICAL ROTATION

Specification: +18 to +22 ° (EP)

Perkin Elmer Polarimeter 343

Wavelength: 589 nm

Concentration: ~10 mg/mL in NaOH

Cell Path: 100 mm

Mean of three Measurements = **18.715 °****Certificate of analysis revision history:**

Certificate version	Date	Reason for version
LRAC7879.01	02 February 2021	Original Release
LRAC7879.02	13 April 2022	Added NMR
LRAC7879.03	22 June 2023	Update Mass Balance and Impurity values after investigation by new method

Disclaimer:

The purchaser is required to determine the suitability of this product for any particular application. Sigma-Aldrich RTC makes no warranty of any kind, express or implied, other than its products meet all quality control standards set by Sigma-Aldrich RTC. We do not guarantee that the product can be used for any particular application.

The vibrant M, Supelco, TraceCERT and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. © 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada.



ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO CLORETO DE TRIOCTILMETILAMÔNIO

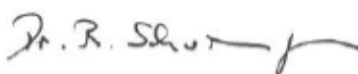
SIGMA-ALDRICH™

 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
 Email USA: techserv@sigmaaldrich.com Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

Product Name: Methyltrioctylammonium chloride
 >= 97.0 % AT
Product Number: 69485
Batch Number: BCCD0534
Brand: Aldrich
CAS Number: 5137-55-3
Formula: $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2]_3\text{N}(\text{Cl})\text{CH}_3$
Formula Weight: 404.16
Quality Release Date: 29 APR 2020

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO LIGHT YELLOW	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS OR CHUNK(S)	POWDER
ARGENTOMETR. TITRATION	97.0 - 102.0 %	100.1 %
WATER	≤ 1.0 %	0.2 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Reinhold Schwenninger
 Quality Assurance
 Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

BIOTEC
REAGENTES ANALITICOS

BIOTEC
COM DE PROD P LABORATÓRIO EIRELI
CNPJ. 23.852.432/0001-26
Rua John Lennon, 627
83050-380 - Parque da Fonte
Tel/Fax: (41) 3035-2600
SÃO JOSÉ DOS PINHAIS - PARANÁ

Produto	Álcool Iso-Amílico P.A. AC5	CAS	123-51-3
Formula	C5H12O		
Peso Molecular	88.15		

[illegible]

Emitido eletronicamente, válido sem assinatura.

* Este é o laudo do produto adquirido, para os itens considerados críticos, o comprador deverá efetuar a reanálise.

Aprovado		Classificação		Aprovado com restrições	
	X	Não Aprovado			

Karla Efigênio da Cruz / CRQ.09403526

Responsável Técnica

lot: 51224
val: 08/24