



ADEQUAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC COM DETECTOR ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE CIANOCOBALAMINA EM ALIMENTOS FORTIFICADOS

Felipe Augusto Batista **Barbosa**¹; Enieluce dos Santos **Brito**²; Priscila Francisca Corrêa
Marcolino³; Marta Gomes da **Silva**⁴

Nº 20213

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método para determinação de vitamina B12 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico, HPLC-ED. Embora o detector eletroquímico apresente sensibilidade adequada para avaliar a concentração de B12 em alimentos fortificados, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Foram avaliados a composição da fase móvel, pH da fase móvel, o uso do detector eletroquímico no modo corrente contínua e modo pulsado, e concentrações de B12. No modo pulsado, foi considerado diferentes potenciais, tempo de amostragem e tabelas de eventos.

Palavras-chaves: Vitamina B12, Cromatografia, Detector eletroquímico, Alimentos fortificados

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; felipe-a-batista@hotmail.com.

2 Colaborador: Assistente técnico, CCQA/Ital, Campinas-SP.

3 Colaborador, Técnico de laboratório, CCQA/Ital, Campinas-SP.

4 Orientadora: Pesquisadora, CCQA/Ital, Campinas-SP, martags@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT – *The objective of this work was to optimize and validate a method for the determination of vitamin B12 by high performance liquid chromatography coupled to the electrochemical detector, HPLC-ED. Although the electrochemical detector has adequate sensitivity to measure the concentration of B12 in fortified foods, the results obtained were not satisfactory. The composition of the mobile phase, pH of the mobile phase, the use of the electrochemical detector in direct current and pulsed mode, and B12 concentrations were evaluated. In the pulsed mode, different potentials, sampling time and event tables were considered.*

Keywords: Vitamin B12, Chromatography, Electrochemical detector, Fortified foods

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vitamina B12

A vitamina B12 ou cianocobalamina faz parte de uma família de compostos denominados genericamente de cobalaminas, é hidrossolúvel, não sintetizada pelo organismo humano, e está presente em alimentos de origem animal. Sua deficiência é muito frequente entre idosos, vegetarianos, indivíduos que adotam uma baixa dieta protéica ou apresentam problemas de absorção gastrintestinal. A deficiência de vitamina B12 leva a transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares, principalmente, por interferir no metabolismo da homocisteína e nas reações de metilação do organismo. Muitas vezes, a deficiência pode permanecer assintomática por longos períodos, desencadeando uma deficiência crônica que, se mantida, pode levar a manifestações neurológicas irreversíveis (VILLOTA e HAWKWS, 2007; PAWLAK et al., 2013; GREEN et al., 2017).

O termo cianocobalamina é atribuído as substâncias compostas por um anel tetrapirrólico circundando um átomo central de cobalto, um grupo nucleotídico na base 5,6-dimetilbenzimidazol e numa ribose fosforilada esterificada com 1-amino, 2-propanol, Figura 1 (GREEN e MILLER, 2007).

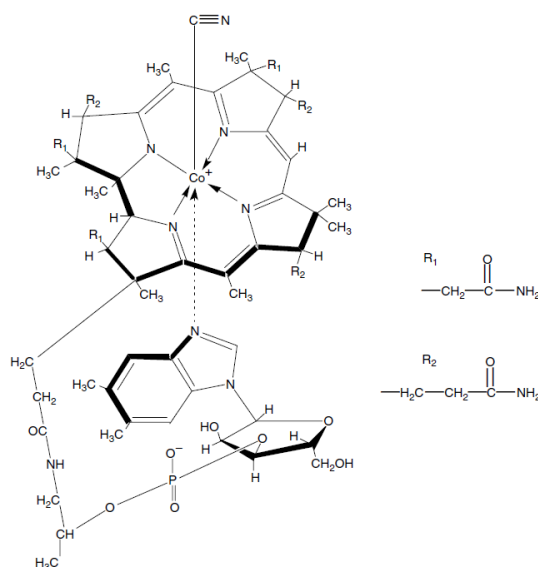


FIGURA 1: Fórmula estrutural da vitamina B12 (GREEN E MILLER, 2007).

1.2 Cromatografia de alta eficiência e detector eletroquímico

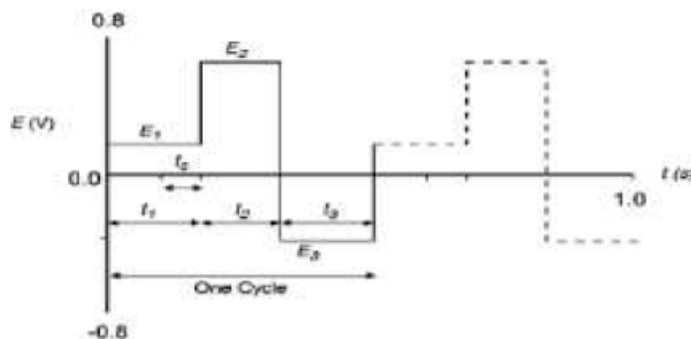
Cromatografia é um termo aplicado a uma ampla variedade de técnicas de separação com base na distribuição de uma amostra (soluto) entre uma fase que pode ser móvel ou estacionária. A interação entre o soluto e as fases é descrita pelo coeficiente de partição (K) ou distribuição (D), que é a razão entre a concentração do soluto na fase estacionária e a concentração do soluto na fase móvel. A fase móvel pode ser um gás, líquido ou um fluido supercrítico, e a fase estacionária pode ser um material líquido ou sólido. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) opera a pressões relativamente altas, é compatível com vários detectores e permite a recuperação da amostra. A separação dos componentes de uma mistura ocorre por adsorção (líquido-sólido), partição (líquido – sólido), afinidade ou diferença de peso molecular (KOVÁCS e CSAPÓ, 2015; COSKUN, 2016; BRADLEY, 2017).

O detector eletroquímico é um instrumento bastante simples e barato quando comparado com outros detectores para HPLC. Consiste basicamente de uma célula eletroquímica de fluxo, composta por um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência. A seleção do material do eletrodo, em especial do eletrodo de trabalho, permite alta sensibilidade, baixo nível de ruído, ampla faixa dinâmica e resposta seletiva. O material de um eletrodo de trabalho deve proporcionar boa condutividade elétrica, baixo potencial para medição eletroquímica e robustez mecânica para os produtos formados e fluxo constante, além de ser inerte ao eluente e suas impurezas, componentes da amostra e espécies reativas que possam ser formadas por eletrólise do analito (MENDONZA et al., 2015; SANTAMARÍA et al., 2015).

As reações eletroquímicas envolvem espécies carregadas, cuja energia depende do potencial da fase contendo as espécies, ou seja, a transferência de espécies carregadas (íons ou elétrons) através da interface das duas fases adjacentes. A taxa do processo corresponde à diferença de potencial entre as fases. A reação envolve processos como reação química, reorganização estrutural e adsorção (SANTAMARÍA et al., 2015; WEISS, 2016).

O detector eletroquímico opera no modo corrente contínua (DC), pulsado (PAD) e varredura (SCAN). O modo DC opera com aplicação de um potencial contínuo e pode fornecer uma conversão eletroquímica incompleta do analito. O modo PAD promove a completa conversão eletroquímica dos analitos, gera sinais mais intensos, mas pode aumentar o sinal ruído. O modo SCAN otimiza o potencial de trabalho com a construção de varredura voltamograma, que plota potencial (E) em volts versus corrente (I) em nanoamperes (WATERS CORPORATION).

A detecção no modo PAD permite a regeneração do eletrodo de trabalho com uma frequência de 0,5 a 3,0 Hz pela aplicação de mudanças de potenciais. As mudanças de potenciais são úteis em aplicações em que o eletrodo é incrustado devido a adsorção de produtos de reação insolúvel (WATERS CORPORATION). As etapas de potenciais que são aplicáveis na detecção PAD estão apresentadas na Figura 2.



Onde: E_1 , t_1 : período de detecção. t_s é o tempo de amostragem e deve ser \leq que 60 ms do valor t_1 . A diferença $t_1 - t_s$ corresponde ao tempo de estabilização.

E_2 , t_2 : período de limpeza. Ocorre formação de uma monocamada do metal oxidado no eletrodo de trabalho devido ao alto potencial positivo.

E_3 , t_3 : período de condicionamento. A monocamada do metal oxidado é eletroquimicamente reduzido pela aplicação do potencial negativo, renovando a superfície do eletrodo.

FIGURA 2: Etapas de potenciais aplicáveis na detecção eletroquímica no modo PAD (WATERS CORPORATION)

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

O padrão de cianocobalamina (B12) foi fornecido pela Sigma (USA), produto V2876, CAS 68-19-9. A concentração da solução padrão foi confirmada com a leitura em espectrofotômetro nos

comprimentos de onda de 278 nm, 361 nm e 548 nm e uso dos coeficientes de absorção de 115, 207 e 63 unidades de absorbância, respectivamente (STROHECKER e HENNING, 1967).

Todos os reagentes utilizados no estudo foram de grau analítico ou superior. Água deionizada foi purificada utilizando um sistema de osmose reversa (Gekara, São Paulo, Brasil).

2.2 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

No estudo foi utilizado um sistema cromatográfico composto por bomba modelo E2695 e detector eletroquímico modelo 2465 munido de célula de fluxo composto de eletrodo de trabalho CU WE e eletrodo de referência HYREF (Waters, Milford, USA). A separação ocorreu em coluna de RP 18 Lichrospher (C18, 5µm, 125 x 4, Merck, Alemanha).

2.3 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Foram realizados testes com variações na fase móvel, detector no modo DC com vários potenciais; detector no modo pulsado com diferentes potenciais, tempo de amostragem e tabelas de eventos, e concentrações de B12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FASE MÓVEL

As composições de fase móveis avaliadas estão apresentadas na Tabela 1. As fases móveis testadas apresentaram alterações quanto a adição e concentração de trietilamina e ácido heptanosulfônico sódico, pH e modificador orgânico. Foram avaliadas a fase móvel, condições do detector eletroquímico e concentrações de B12, conforme descrição de Marszalt et al. (2005) e Lebiezinska et al. (2007), e variações nas condições descritas. Também foi avaliada a fase móvel utilizada na avaliação de B12 com uso do detector DAD (detector de arranjo de diodos) por apresentar resolução satisfatória (MAEDA et al., 1989).

TABELA 1: Composição das fases móveis avaliadas.

Fase móvel	Composição
1	94 mM Na ₂ HPO ₄ , 10,8 mM trietilamina aquoso, pH 3,5 com H ₃ PO ₄ : acetonitrila (90 : 10, v/v)
2	94 mM Na ₂ HPO ₄ , 4,5 mM ácido heptanosulfônico sódico, 35,9 mM trietilamina, 100 mL de acetonitrila, pH 2,8 com H ₃ PO ₄
3	94 mM Na ₂ HPO ₄ , 4,5 mM ácido heptanosulfônico sódico, 35,9 mM trietilamina, 100 mL de acetonitrila, pH 3,0 com H ₃ PO ₄
4	94 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,1 mM ácido heptanosulfônico sódico, 8,5 mM trietilamina aquoso, pH 3,5 com H ₃ PO ₄ : acetonitrila (90:10, v/v)
5	94 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,1 mM ácido heptanosulfônico sódico, 8,5 mM trietilamina aquoso, pH 3,1 com H ₃ PO ₄ : acetonitrila (90:10, v/v)



6	94 mM Na ₂ HPO ₄ aquoso : metanol (90:10, v/v), 8,5 mM trietilamina, pH 3,0 com H ₃ PO ₄
---	--

3.2 DETECTOR MODO DC, CORRENTE CONTÍNUA

As condições testadas no modo DC estão apresentadas na Tabela 2, e os cromatogramas que apresentaram resposta promissoras correspondem as Figuras 3 a 6. Os cromatogramas apresentaram ruído baixo, linha de base estável, pressão adequada, mas não foi possível visualizar o pico cromatográfico que correspondesse a B12, embora tenha sido avaliadas concentrações entre 0,0612 µg mL⁻¹ a 8,028 µg mL⁻¹. Foram avaliadas variações na fase móvel (composição e pH), condições do detector eletroquímico e concentrações de B12, conforme descrição de Marszalt et al. (2005), Lebiezinska et al (2007) e Kreft et al. (2012), que utilizaram eletrodo de grafite.

TABELA 2: Condições cromatográficas e concentrações de B12 avaliadas com o detector no modo DC – corrente contínua

Condição cromatográfica	Fase móvel	Temperatura detector e coluna (°C)	Constante tempo (s)	Range (µA)	Potencial (E _c , v)	B12 (µg mL ⁻¹)
1	1	30	1,0	20	0,30	0,408
2	1	30	1,0	20	0,40	0,408
3	1	30	1,0	20	0,50	0,408
4	1	30	1,0	20	0,60	0,408
5	1	30	1,0	20	0,70	0,408
6	1	30	1,0	20	0,90	0,408
7	2	30	1,0	20	0,30	0,408
8	5	30	1,0	20	0,20	0,0612
9	6	25	1,0	20	0,96	0,1605
10	6	25	1,0	20	1,60	0,1605
11	6	25	1,0	20	-1,30	0,1605
12	6	25	1,0	20	0,34	0,1605
13	6	25	1,0	20	0,40	0,1605
14	6	25	1,0	20	0,35	0,1605
15	6	25	1,0	20	0,64	0,1605
16	6	25	1,0	20	1,30	0,1605
17	6	25	1,0	20	-0,96	0,1605
18	6	25	1,0	20	-0,75	0,105
19	6	25	1,0	20	-0,72	0,1605
20	6	25	1,0	20	-0,85	0,1605
21	6	25	1,0	20	-0,73	0,1605
22	6	25	1,0	20	-0,71	0,1605
23	6	25	1,0	20	-0,72	0,321

24	6	25	1,0	20	-0,71	0,321
25	6	25	1,0	20	-0,70	0,321
26	6	25	1,0	20	0,34	0,321
27	6	25	1,0	20	-0,69	0,321
28	6	25	1,0	20	-0,69	8,028

s, segundo; μA , micro amper; E_c , potencial; v, volts

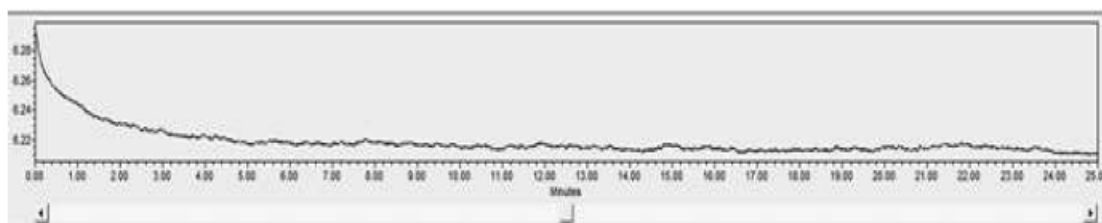


FIGURA 3: Condição cromatográfica 13

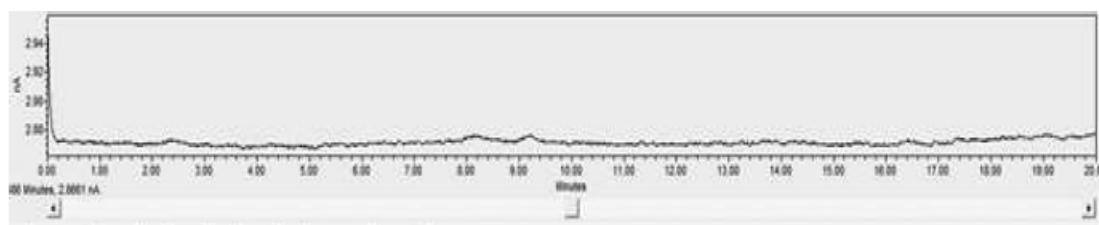


FIGURA 4: Condição cromatográfica 22

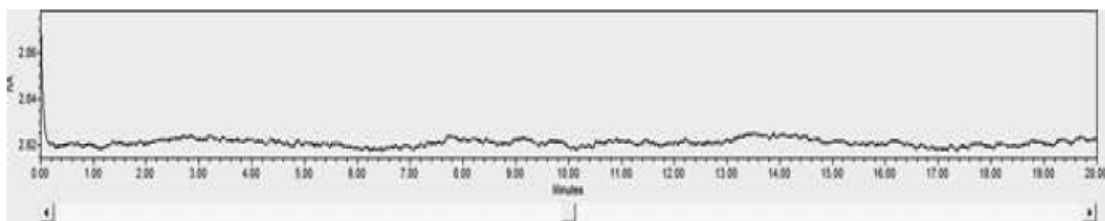


FIGURA 5: Condição cromatográfica 25

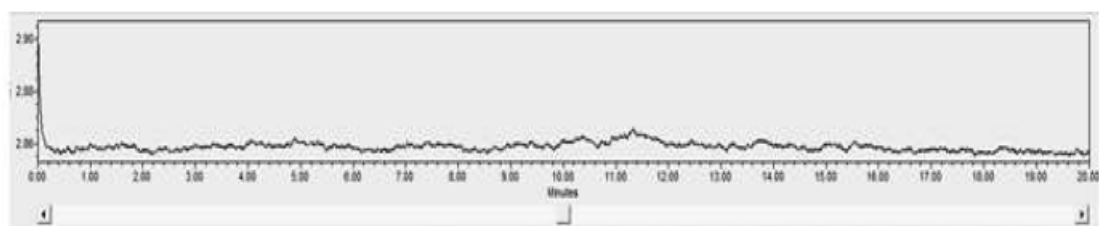


FIGURA 6: Condição cromatográfica 26

3.3 DETECTOR MODO PAD, MODO PULSO

As condições testadas no modo PAD estão apresentadas na Tabela 3, sendo que foram obtidos no modo positivo (+) e constante de tempo 1,0 segundo. Os cromatogramas que



apresentaram as melhores respostas estão apresentados nas Figuras 7 a 10. Embora tenha sido observado nível de ruído e sinal adequado não foi observado o sinal de B12.

TABELA 3: Condições cromatográficas e concentrações de B12 avaliadas com o detector no modo PAD - pulsado

Cond.	F.M.	Temp. (°C)	Range (nA)	Potencial		ts	eventos		B12 (µg mL ⁻¹)
				E (v)	t (ms)		Time	Even.	
1	4	25	20	E1: +0,35 E2: +0,60 E3: -0,30	300 150 150	80	-	-	0,408
2	4	25	10	E1: -0,90 E2: +0,60 E3: -0,90	200 350 200	100	0,00 0,01 0,20 0,30 0,31 0,32 0,33 0,34 0,44	Auto 0 0,35 0,35 0,90 -2,00 -2,00 0,60 -0,90 -0,90	0,408
3	4	25	10	E1: -0,20 E2: +0,40 E3: -1,00	400 200 200	100	0,00 0,10 0,20 0,40 0,41 0,42 0,43 0,44 0,50	Auto 0 -1,20 -1,20 -1,20 -0,73 -0,73 0,40 -0,40 0,40	0,408
4	4	25	10	E1: +0,35 E2: +0,60 E3: -0,90	400 200 200	60	0,00 0,01 0,15 0,30 0,31 0,32 0,33 0,34 0,40	Auto 0 -1,20- 1,20 -1,20 2,00 2,00 -0,65 1,20 1,20	0,408
5	4	25	50	E1: +0,73 E2: +0,60 E3: -0,75	400 200 200	100	0,00 0,01 0,20 0,40 0,41 0,42 0,43 0,44 0,50	Auo 0 0,73 0,73 0,35 -1,30 -1,30 0,60 -0,73 -0,73	0,408
6	5	25	10	E1: +0,20 E2: +0,60	400 200	40	0,00 0,20	0,30 0,30	0,408



				E3: -0,30	200		0,40 0,41 0,42 0,43 0,44 0,55	0,35 -1,30 -1,30 0,60 -0,30 -0,30	
7	5	25	10	E1: +0,20 E2: +0,60 E3: -0,30	400 200 200	60	0,00 0,20 0,40 0,41 0,42 0,43 0,44 0,55	0,30 0,30 0,35 -1,30 -1,30 0,60 -0,30 0,35	0,408
8	5	25	10	E1: -0,20 E2: +0,60 E3: -0,30	400 200 200	200	0,00 0,20 0,40 0,41 0,42 0,43 0,44 0,55	0,30 0,30 0,35 -1,30 -1,30 0,60 -0,30 0,35	0,408
9	5	25	10	E1: -0,90 E2: +0,60 E3: -1,30	600 200 200	100	0,00 0,10 0,20 0,30 0,32 0,33 0,43	Auto 0 2,00 0,30 -0,60 -1,30 -1,30 0,30	0,0612
10	6	25	20	E1: +0,48 E2: +0,68 E3: -0,68	300 200 200	60	0,00 0,20 0,24 0,30 0,32 0,50 0,51 0,60	Auto 0 0,35 0,48 0,48 0,38 0,68 -0,68 -0,68	0,0417
11	6	25	20	E1: -0,34 E2: 0 E3: -0,94	300 200 200	60	0,00 0,20 0,30 0,33 0,35 0,50 0,70	-0,15 -0,30 -0,90 0 -0,34 -0,90 -0,15	0,0417
12	6	25	20	E1: -0,34 E2: +0,97 E3: -0,34	300 200 200	40	0,00 0,20 0,30 0,40 0,50 0,70	-0,15 -0,34 -0,90 0,70 -0,15 -0,34	0,0417
13	6	25	20	E1: +0,97 E2: +1,64	400 200	60	0,01 0,20	-1,30 0	0,1605

				E3: -1,30	200		0,30 0,40 0,50 0,70	0,97 0,97 1,64 -1,30	
14	6	25	20	E1: -0,96 E2: -0,15 E3: +0,34	300 200 200	40	0,00 0,20 0,30 0,35 0,40 0,50	-0,34 -0,64 -0,96 -0,96 -0,50 0,34	0,1605
15	6	25	20	E1: +0,15 E2: +0,34 E3: -0,96	400 200 200	100	0,00 0,30 0,40 0,45 0,50 0,60 0,70 0,80	0 0,10 0,15 0,30 0,30 0,10 -0,30 -0,34	0,1605
16	6	25	20	E1: -0,85 E2: -0,30 E3: -0,85	400 200 200	40	0,00 0,30 0,36 0,40 0,45 0,60 0,70 0,80	-0,30 -0,60 -0,85 -0,85 -0,85 0,45 0,45 -0,30	0,1605

Cond., condição; F.M., fase móvel; nA, nano amper; E, potencial; v, volts; t, tempo; ms, milivolts; ts, tempo em segundos.

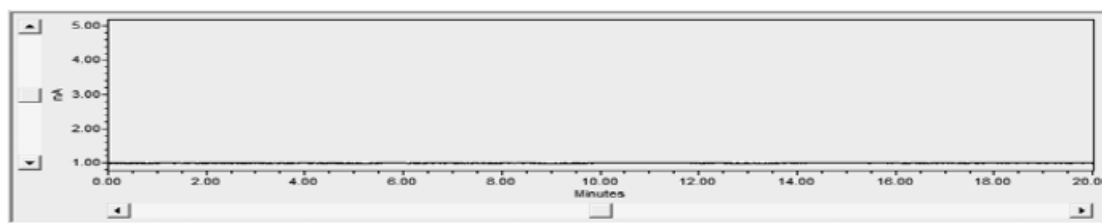


FIGURA 07: Condição cromatográfica 02

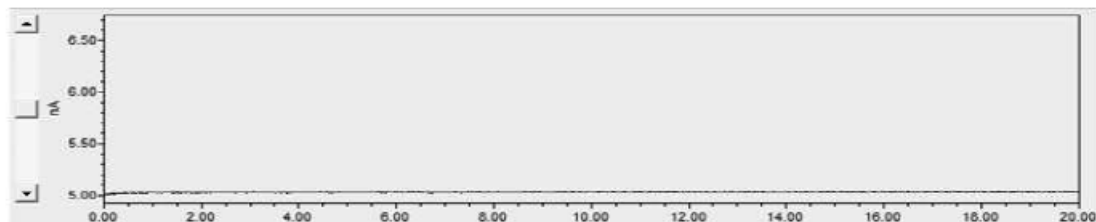


FIGURA 08: Condição cromatográfica 04

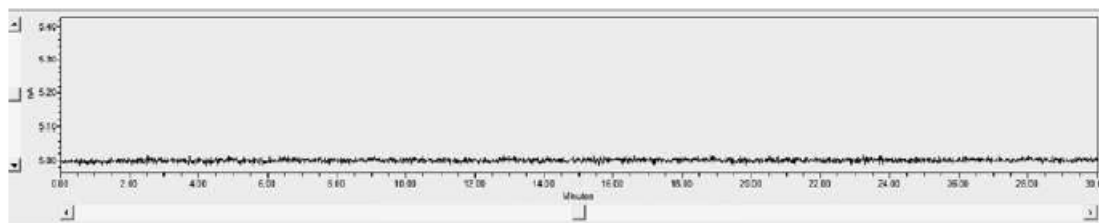


FIGURA 09: Condição cromatográfica 06

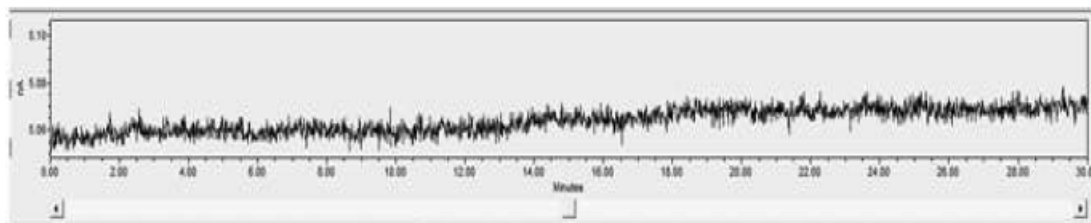


FIGURA 10: Condição cromatográfica 15

4 CONCLUSÃO

As condições cromatográficas testadas não permitiram evidenciar o pico cromatográfico correspondente à B12. O resultado não satisfatório pode ser devido ao uso do eletrodo de cobre, disponível para a condução do estudo.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

6 REFERÊNCIAS

- BRADLEY, L. R. High-Performance Liquid Chromatography. In: NIELSEN, S. **Food Analysis**, : New York: Springer International Publishing. 2017, Chap. 13, p.213-226. Doi: 10.1007/978-3-319-45776-5_13.
- COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **North Clin Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156-60, 2016. DOI: 10.14744/nci.2016.32757.
- GREEN, R.; MILLER, J. W. Vitamin B12. In: ZEMPLINI, J.; RUCKER, R. B., McCORMICK, D. B., SUTTIE, J. W. **Handbook of Vitamins**, fourth edition. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2007, Chap. 13, p. 413-458.
- GREEN, R.; ALLEN, L.H.; BJORKE-MONSEN, A-L; BRITO, A.; GUÉANT., J-L.; MILLER, J. W.; MOLLOY, A. M.; NEXO, E.; STABLER, S. .S.; TOH, B-H.; UELAND, P.M.; YAJNIK, C. Vitamin B 12 deficiency. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 1-20, 2017 DOI:10.1038/nrdp.2017.40.



KOVÁCS, B.; CSAPÓ, J. Modern methods of food analysis. University of Debrecen, 2015. TÁMOP-4.1.2.D-12/1/KONV-2012-0008. 203 p.

KREFT, G.; BRAGA, O. C.; SPINELLI, A. Analytical electrochemistry of vitamin B12 on a bismuth-film electrode surface. **Eletrochimica Acta**, v. 83, p. 125-132, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.132>.

MAEDA, Y.; YAMAMOTO, M.; OWADA, K.; SATO, S.; MASUI, T. Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Water-Soluble Vitamins, Caffeine, and Preservative in Oral Liquid Tonics. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 72, nº 2, p. 244-247, 1989.

MARSZALL ML; LIDIEDZINSKA A; CZARNOWSKI W; SZEFER P. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 91-98, 2005. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.07.091.

MENDONZA, S.; BUSTOS, E.; MARÍQUEZ, J.; GODÍNEZ, L. A. Voltammetric Techniques. In ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; LÓPEZ, M. A. **Agricultural and Food Electroanalysis**. The Atrium: John Wiley & Sons Ltda. 2015. P.23-44.

PAWLAK, R.; JAMES, P. S.; RAJ, S.; CULLUM-DUGAN, D.; LUCUS, D. Understanding Vitamina B12. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 3, p. 60-65, 2013. DOI: 10.1177/1559827612450688.

SANTAMARÍA, M. C.; BARAMBIO, M. M.; ARRIBAS, A. S. HPLC techniques with Electrochemical Detection. In ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; LÓPEZ, M.A. **Agricultural and Food Electroanalysis**. The Atrium: John Wiley & Sons Ltda. 2015. P.73-105.

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Análisis de Vitaminas - Métodos Comprobados**, Paz Montalvo, Madrid, 1967.

VILLOTA, R.; HAWKES, J. G. Reaction kinetics in food systems. In: HELDMAN, D. R.; LUND, D. B. **Handbook of Food Engineering**, second edition, Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2007, Chap. 2, p. 125-286.

WATERS CORPORATION. **Waters 2465 Electrochemical Detector Operator's Guide**. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500246502rb.pdf>.

Acessado em 24 de fev de 2020.

WEISS, J. Detection Methods in Ion Chromatography. In: Handbook of Ion Chromatography. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2016. Chap. 8a, p. 731-810. DOI: 10.1002/9783527651610.