



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

KAMILLA VIRGÍNIO DA SILVA NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO**

**CAMPINA GRANDE - PB
2022**

KAMILLA VIRGÍNIO DA SILVA NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Me. Carlos Arthur Gouveia Veloso

Coorientadora: Me. Fernanda Pontes Nóbrega

**CAMPINA GRANDE - PB
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

N244c Nascimento, Kamilla Virginio da Silva.
Caracterização e desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (clae) para quantificação de ácido fólico [manuscrito] / Kamilla Virginio da Silva Nascimento. - 2022.
49 p. : il. colorido.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.
"Orientação : Prof. Me. Carlos Arthur Gouveia Veloso , Departamento de Farmácia - CCBS."
"Coorientação: Profa. Ma. Fernanda Pontes Nóbrega , UFPE - Universidade Federal de Pernambuco"
1. Ácido fólico. 2. Cromatografia. 3. Vitamina hidrossolúvel.
I. Título

21. ed. CDD 615.328

KAMILLA VIRGÍNIO DA SILVA NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Controle e desenvolvimento de medicamentos.

Aprovada em: 25/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Carlos Arthur G. Veloso

Prof. Me. Carlos Arthur Gouveia Veloso (Orientador)
Me. Fernanda Pontes Nóbrega (Coorientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Paulo César Dantas da Silva

Prof. Dr. Paulo César Dantas da Silva
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Mônica Oliveira da Silva Simões

Profª. Dra. Mônica Oliveira da Silva Simões
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

A Deus pela sua infinita bondade, meus pais, minha família, em especial minha avó, Maria do Socorro Virgínio da Silva (*in memoriam*), por toda dedicação, amor e cuidado que me trouxeram até aqui, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A trajetória não foi fácil, mas isso nunca foi um requisito para a desistência! Noites de estudo, renúncias, ausências e muito esforço para alcançar a concretização de mais um objetivo, uma grande e importante conquista. Por trás dela, o reconhecimento do empenho, dedicação e da persistência individual.

Porém, diante de toda essa verbalização, a certeza de quanto é real a necessidade do coletivo, do quanto precisamos uns dos outros! E nessa realização, tenho apenas uma convicção, não estou sozinha!

A Deus e à Nossa Senhora, minha mais sincera gratidão, por todo o direcionamento nos planos e sonhos que já estavam designados para minha vida e por serem minha fortaleza.

Aos meus pais, Kátia e Joseilton, por serem meu porto seguro, espelho e maiores incentivadores, tudo de mais importante que tenho, e a minha irmã, Klarice, pelo companheirismo e por todo apoio oferecido.

À minha avó, Maria do Socorro (*in memoriam*), ela que foi sinônimo de amor, cuidado, presença, doação, força e total encorajamento, minha eterna gratidão! Nosso amor, permanece!

À toda minha família, por todo incentivo, muito obrigada!

Ao meu grande amigo, irmão, Jonas, por todos esses anos de trajetória na Universidade, companheirismo e apoio que sempre foram nossa maior característica.

Aos meus amigos, da Universidade e da vida, por todo o suporte e por deixarem essa caminhada mais leve, foi maravilhoso viver cada momento com vocês!

Ao meu orientador, professor Arthur, por toda disponibilidade e boa vontade em acompanhar esse trabalho e se fazer presente nesse momento, e a minha coorientadora, Fernanda, pela atenção, auxílio e por cada ensinamento.

A Paulo, por toda motivação, parceria, paciência, por ter repassado cada conhecimento e auxiliado tanto a cada dia no CertBio, sendo tão essencial em cada passo.

À professora Mônica, por sua disponibilidade em se fazer presente nesse momento, contribuindo de forma tão significativa.

À Universidade Estadual da Paraíba, por ter proporcionado minha formação, com ensino de qualidade, apresentando um excepcional corpo docente ao qual obtive a honra de receber cada ensinamento durante toda caminhada acadêmica.

Ao CNPQ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

A todos, o meu muito obrigada!

"Contudo, seja qual for o grau a que chegamos, o que importa é prosseguir decididamente." (Filipenses 3, 16)

RESUMO

As vitaminas se enquadram como moléculas orgânicas fundamentais no contexto gestacional. Dentre essas, o ácido fólico, que é uma vitamina hidrossolúvel, também conhecida como vitamina B9, participa do mecanismo de síntese de ácidos nucleicos, DNA e RNA. Quando em deficiência pode vir a causar alterações, como a anemia megaloblástica na gestante e malformações congênitas no feto. Empenhando-se em proporcionar uma suplementação vitamínica segura e eficaz, o controle de qualidade se sobressai como essencial para que tais requisitos sejam atendidos. Baseado nisto, os objetivos deste estudo foram, realizar as caracterizações térmicas e espectroscópicas do ácido fólico e desenvolver a validação do método analítico por CLAE para a sua quantificação. Para caracterizar o insumo farmacêutico, foram realizadas as técnicas de Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). No processo de validação do método analítico, as análises deram-se através da CLAE, com soluções em seis níveis de concentração (10,0 a 60,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), seguindo os parâmetros propostos pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA, sendo estes: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de qualidade (LQ) e robustez. As análises térmicas e espectroscópicas mostraram-se compatíveis com as características físicas e moleculares da vitamina, respectivamente. O método de quantificação foi desenvolvido e validado, apresentando seletividade, linearidade, com coeficiente de determinação (R^2) muito próximo ao preconizado (0,9996), baixos limites de detecção e quantificação, exato, preciso e robusto, demonstrando um percentual dentro da faixa de 5% em desvio padrão relativo, como proposto pela RDC. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que as caracterizações realizadas e o desenvolvimento do método analítico colaboram e incentivam de forma significativa o controle de qualidade de suplementos alimentares, tendo em vista, a importância destes na busca pelo êxito da suplementação das necessidades nutricionais que são advindas do período periconcepcional e gestacional.

Palavras-chave: Ácido fólico; Cromatografia; Vitamina hidrossolúvel.

ABSTRACT

Vitamins fit as fundamental organic molecules in the gestational context. Among these, folic acid, which is a water-soluble vitamin, also known as vitamin B9, participates in the synthesis mechanism of nucleic acids, DNA and RNA. When in deficiency, it can cause changes, such as megaloblastic anemia in the pregnant woman and congenital malformations in the fetus. Committed to providing safe and effective vitamin supplementation, quality control stands out as essential for such requirements to be met. Based on this, the objectives of this study were to perform the thermal and spectroscopic characterizations of folic acid and to develop the validation of the analytical method by HPLC for its quantification. To characterize the pharmaceutical ingredient, Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques were performed. In the process of validation of the analytical method, the analyzes were carried out through HPLC, with solutions at six concentration levels (10,0 to 60,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), following the parameters proposed by RDC No. 166, of 24 of July 2017, from ANVISA, namely: selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit (LD), quality limit (LQ) and robustness. The thermal and spectroscopic analyzes were compatible with the physical and molecular characteristics of the vitamin, respectively. The quantification method was developed and validated, presenting selectivity, linearity, with a coefficient of determination (R^2) very close to the recommended (0,9996), low detection and quantification limits, exact, precise and robust, demonstrating a percentage within the range of 5% in relative standard deviation, as proposed by the RDC. Based on the results obtained, it can be concluded that the characterizations performed and the development of the analytical method collaborate and significantly encourage the quality control of food supplements, in view of their importance in the search for the success of supplementation of nutritional needs that are arising from the periconceptual and gestational period.

Keywords: Folic acid; Chromatography; Water-soluble vitamin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do Ácido Fólico.....	18
Figura 2 – Curva TG/DTG do Ácido Fólico.....	32
Figura 3 – Curva DSC do Ácido Fólico.....	33
Figura 4 – Espectro de FTIR do Ácido Fólico.....	34
Figura 5 – Cromatograma do padrão de Ácido Fólico.....	35
Figura 6 – Espectro UV/Vis do Ácido Fólico.....	36
Figura 7 – Curva de Calibração do Ácido Fólico.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da robustez e suas variações.....	31
Tabela 2 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR do Ácido Fólico.....	35
Tabela 3 – Valores médios das áreas obtidas na construção da curva analítica.....	37
Tabela 4 – Características analíticas obtidas pelo método proposto.....	38
Tabela 5 – Limite de detecção e quantificação do Ácido Fólico.....	38
Tabela 6 – Valores da exatidão em três níveis de concentração do Ácido Fólico.....	38
Tabela 7 – Valores obtidos no ensaio de precisão interdia.....	39
Tabela 8 – Valores obtidos no ensaio de precisão interdia.....	40
Tabela 9 – Valores obtidos no ensaio de precisão interanalista.....	40
Tabela 10 – Valores obtidos no ensaio de precisão interanalista.....	41
Tabela 11 – Valores do efeito da variação da temperatura no ensaio de robustez	42
Tabela 12 – Valores do efeito da variação da detecção no ensaio de robustez.....	43
Tabela 13 – Valores do efeito de vazão no ensaio de robustez.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-10-MTHF	5-10-metilenotetrahidrofolato
5-MeTHF	5-metiltetrahidrofolato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DHF	Diidrofolato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectrometer</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MTHFR	metil-tetrahidrofolato redutase
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A	Para análise
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
SQR	Substância Química de Referência
SHMT	Serina hidroximetiltransferase
TG/DTG	<i>Thermogravimetry / Derived Thermogravimetry</i>
THF	Tetrahidrofolato
UV/Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μ	Mi
®	Marca Registrada
σ	Sigma
Δ	Delta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Ácido Fólico	18
3.2 Métodos térmicos de caracterização	19
3.2.1 Análise termogravimétrica	20
3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	20
3.3 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	21
3.4 Validação e Legislação brasileira	21
3.4.1 Seletividade	22
3.4.2 Linearidade	22
3.4.3 Intervalo	23
3.4.4 Precisão	23
3.4.5 Limite de detecção	23
3.4.6 Limite de quantificação	24
3.4.7 Exatidão	25
3.4.8 Robustez	25
3.5 Determinação de vitaminas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Material	27
4.1.1 Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)	27
4.1.2 Solventes e reagentes	27
4.1.3 Equipamentos e materiais	27
4.2 Métodos	27
4.2.1 Caracterização do Ácido Fólico	27
4.2.1.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	27
4.2.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	28
4.2.2 Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação do Ácido Fólico	28

4.2.2.1 Condições Cromatográficas.....	28
4.2.2.2 Preparo da solução tampão.....	29
4.2.2.3 Preparo da solução-estoque e soluções-trabalho.....	29
4.2.2.4 Seletividade.....	29
4.2.2.5 Linearidade.....	30
4.2.2.6 Limite de detecção.....	30
4.2.2.7 Limite de quantificação.....	30
4.2.2.8 Exatidão.....	30
4.2.2.9 Precisão.....	31
4.2.2.10 Robustez.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Caracterização térmica do Ácido Fólico.....	32
5.1.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG).....	32
5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	33
5.2 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	34
5.3 Validação do método analítico para quantificação de Ácido Fólico.....	35
5.3.1 Seletividade.....	35
5.3.2 Linearidade.....	36
5.3.3 Limite de detecção e quantificação.....	38
5.3.4 Exatidão.....	38
5.3.5 Precisão.....	39
5.3.6 Robustez.....	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O período gestacional é acompanhado de alterações marcantes no metabolismo materno, evidenciando um aumento importante das necessidades nutricionais que são essenciais para a manutenção metabólica da gestante e para o desenvolvimento fetal. As vitaminas se enquadram como moléculas orgânicas fundamentais para o funcionamento adequado do organismo no contexto de uma gestação, elas devem integrar a composição do quadro nutricional para proporcionar suporte na interação existente entre placenta e compartimento fetal, promovendo o desenvolvimento de uma gravidez saudável (BRAGA et al., 2018; SOUSA et al., 2020).

Existem importantes evidências na literatura e na vivência clínica do valor fundamental das vitaminas como determinantes no contexto da gestação. Dentre essas, pode-se destacar o Ácido fólico ou ácido pteroilglutâmico que é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B, também conhecida como vitamina B9. É encontrada em fontes alimentares na forma reduzida, em torno de 90% como derivados de poliglutamatos, denominados folatos. O ácido fólico é a forma sintética da vitamina, possuindo uma maior biodisponibilidade que o folato em sua forma natural (LINHARES; CESAR, 2017; JIALAL; KHAN, 2020; OLIVEIRA; GERMANO; KRAMER, 2021).

Os folatos possuem atuação através do mecanismo de síntese de ácidos nucleicos, DNA e RNA, mediante a biossíntese de purinas e do timidilato. São de fundamental importância na eritropoiese, no neurodesenvolvimento, na prevenção de alterações congênitas no tubo neural e na evolução fetal. Quando em deficiência, podem estar associados ao surgimento de algumas alterações, como principalmente a anemia megaloblástica na gestante e malformações congênitas (LINHARES; CESAR, 2017; JIALAL; KHAN, 2020). No contexto das malformações congênitas, essas podem vir a propiciar um incompleto desenvolvimento da medula espinhal ou do cérebro, podendo ocasionar quadros de espinha bífida, anencefalia encefalocele e hidrocefalia (BATISTUTI; SANTOS; SILVA, 2013; JIALAL; KHAN, 2020).

De acordo com os estudos clínicos e científicos, é comprovada a suma importância da suplementação de ácido fólico no período periconcepcional, perdurando até o final da gestação, tendo em vista, a ocorrência do desenvolvimento embrionário, produção, reparação e funcionamento do DNA. A Organização Mundial da Saúde, em sua diretriz, recomenda que a dose diária seja de 400µg (0,4 mg). Essa recomendação é implantada como parte de um programa integrado de cuidados pré-natais e neonatais (OMS, 2013; OMS, 2016).

Tendo em vista o caráter crucial desta suplementação de ácido fólico, torna-se necessário que a dispensação do mesmo ocorra de forma apropriada e que a forma farmacêutica utilizada contenha o princípio ativo em quantidade correta e suficiente para atender a demanda metabólica devida no período gestacional, para assim garantir a eficácia e confiabilidade do produto. Partindo desse pressuposto, as indústrias de medicamentos e alimentos recorrem a métodos analíticos eficientes, confiáveis e reproduzíveis para que sejam realizados os controles da qualidade. Assim, para que determinada metodologia analítica de quantificação ou identificação venha a servir como base para um parâmetro que determina a qualidade e que possa conferir resultados para isso, é necessário que passe por um processo de validação, que consiste em um sistema de testes e verificações, de modo que resulte em confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017; PAGAN et al., 2019).

A RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019, dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF), que desencadeia o sistema da qualidade farmacêutica, de forma a garantir que medicamentos sejam fabricados e correspondam a finalidade pretendida, satisfazendo requisitos mínimos, garantindo que não ocorra risco ao paciente devido à segurança, eficácia inadequada ou qualidade. Como consequência das ideias vindas das BPF, o processo de validação de métodos é integrado como fundamental para o controle da qualidade e fidedignidade de resultados, sendo deliberados pela RDC nº 166 de 24 de julho de 2017, que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017; FERREIRA, 2018; BRASIL, 2019).

Os conceitos e aplicações de validação metodologias analíticas, assim como as técnicas termoanalíticas, não-termoanalíticas e espectroscópicas estão se expandindo constantemente no que diz respeito às inúmeras áreas as quais se fazem presentes e no processo de caracterização de fármacos e substâncias orgânicas, considerando a indispensabilidade de um processo controle da qualidade adequado. Visando a busca e necessidade por técnicas rápidas, simples e sensíveis, às indústrias farmacêuticas apontam as técnicas cromatográficas como notáveis, que possuem vasta aplicabilidade e vem a garantir por fim um processo de segurança e eficácia (SILVA, 2014).

Nesse contexto, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é considerada como uma das técnicas com alta eficácia mais úteis para a determinação e quantificação de inúmeros compostos e vem ganhando destaque na determinação de folatos. Consiste em um tipo de cromatografia em coluna, onde se encontra uma fase estacionária e uma fase móvel. As interações entre as moléculas contidas em determinada amostra e a fase estacionária,

promovem diferentes tipos de retenção, tornando possível a separação dos compostos (AMORIM, 2019).

Baseado nas inferências citadas e na perspectiva de colaborar para o controle de qualidade de medicamentos e alimentos seguros e eficazes, neste estudo serão realizadas as caracterizações do ácido fólico através de técnicas térmicas e espectroscópicas e seguindo as diretrizes da RDC nº 166 de 24 de julho de 2017, determinados os parâmetros para a validação de um método analítico por CLAE para a sua quantificação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar as caracterizações do ácido fólico e desenvolver um método analítico, validá-lo, por CLAE, para a sua quantificação.

2.2 Objetivos específicos

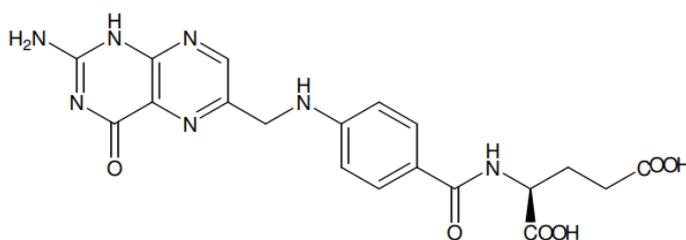
- Caracterizar o ácido fólico, por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC); Termogravimetria (TG); Termogravimetria derivada (DTG); Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Validar o método analítico para quantificação de ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência, avaliando os seguintes parâmetros: seletividade; linearidade; precisão; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão e robustez.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Ácido Fólico

Fazendo parte das vitaminas hidrossolúveis e pertencente ao complexo B, referida como vitamina B9, o ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico) ou ácido pteroilglutâmico é essencial para uma gestação saudável. Possui em sua estrutura química um anel de pteridina, ácido p-aminobenzóico e uma molécula de ácido L-glutâmico. Nas fontes alimentares, em torno de 90% é presente na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, tendo de dois a sete resíduos de L-glutamato interligados por ligações peptídicas ao ácido p-aminobenzóico, denominados folatos (BATISTUTI; SANTOS; SILVA, 2013; OLIVEIRA; GERMANO; KRAMER, 2021).

Figura 1 – Estrutura química do ácido fólico.



Fonte: RAOUF et al. (2014).

Ao ser ingerido, a forma sintética do ácido fólico passa por determinadas reações, onde é reduzido a diidrofolato (DHF) e por sequência em tetrahydrofolato (THF), forma bioativa, pela ação da enzima diidrofolato redutase. O THF é indispensável nos sistemas metabólicos através da formação de muitas coenzimas importantes, principalmente para a síntese de purinas e pirimidinas, nucleoproteínas e manutenção na eritropoiese. Também, ocorre a adição de unidades de carbono e reduções, conduzindo o THF a ser convertido em 5-10-metilenotetrahydrofolato (5-10-MTHF), pela ação da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT). O 5-10-MTHF é necessário para a síntese de ácidos nucleicos como o DNA, e posteriormente passa pela conversão em 5-metiltetrahydrofolato (5-MeTHF) monoglutamato, que caracteriza a forma circulante do folato. O ácido fólico possui um potencial de absorção mais rápido que o folato, por ser estruturado como um monoglutamato. Para que ocorra a absorção do folato é necessário que a enzima glutamato carboxipeptidase II encontrada no epitélio intestinal realize a modificação necessária para a

forma de monoglutamato (MAIA et al., 2020; MERRELL; MCMURRY, 2020; OLIVEIRA; GERMANO; KRAMER, 2021).

Com relação às malformações congênitas, ressalta-se que estas podem ser causadas por fatores ambientais, genéticos ou até mesmo desconhecidos, promovendo o estabelecimento de interferências no desenvolvimento fetal. Geneticamente, a enzima metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR) pode sofrer uma série de polimorfismos, acarretando maiores chances do surgimento de alterações como síndrome de Down, hidrocefalia, microcefalia e espinha bífida, como também pode ocasionar comprometimento da divisão celular, das transmissões de reações para regulação da expressão gênica e acúmulo de metabólitos tóxicos, assim como, também é observado em casos de déficit de ácido fólico, que ainda pode vir a gerar anemia megaloblástica na gestante (ALBUQUERQUE; SILVA; CELESTINO, 2020; JIALAL; KHAN, 2020; ANHÊ; PIRES; GUERRA, 2021).

O organismo humano é incapaz de realizar a síntese de ácido fólico por si só, o que torna importante a sua ingestão a partir da dieta tradicional, presente em alimentos como vegetais de folhas verdes, nozes, feijão, fígado e frutas, como também, na sua forma sintética para atingir as quantidades necessárias e recomendadas por dia, principalmente no contexto gestacional, ao qual essa necessidade torna-se aumentada, tendo em vista que o consumo diário de vitamina B9 em alimentos é de 150 a 250 μg , o que está consideravelmente abaixo da recomendação dietética preconizada (RATAJCZAK et al., 2021).

Mediante ao contexto da suplementação, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua diretriz, recomenda que a dose diária seja de 400 μg (0,4 mg) de ácido fólico no período periconcepcional, perdurando até o final da gestação. Essa recomendação surge no ano de 2013 com a introdução ao programa integrado de cuidados pré-natais e neonatais (OMS, 2013; OMS, 2016).

3.2 Métodos térmicos de caracterização

As análises térmicas podem ser definidas como o conjunto de técnicas que determinam as propriedades físicas de substâncias, como: perda de massa, calor envolvido nos processos físicos e nas reações químicas em encargo da temperatura. Dentre essas técnicas estão a análise termogravimétrica (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (Differential Scanning Calorimetry - DSC), que possuem diversas aplicações na indústria farmacêutica, como na caracterização de substâncias, pureza, compatibilidade fármaco-excipiente, determinação de umidade, estabilidade, polimorfismo e degradação.

Constituem métodos simples, sensíveis e rápidos, que necessitam de pouca amostra, apontando um fator desejável para sua utilização, inclusive na área de fármacos e medicamentos (MARQUI, 2019; SILVA, 2019).

3.2.1 Análise termogravimétrica

A termogravimetria (TGA) é uma técnica de análise térmica que consiste na observação da mudança de massa de uma determinada amostra em função da temperatura e/ou tempo, sob uma atmosfera específica a qual possui temperatura controlada. A variação que se observa pode ser relacionada a fenômenos químicos como: oxidação, sublimação, desidratação, combustão e decomposição. Em contrapartida, a termogravimetria derivada (DTG) é a ordenação matemática, na qual a derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) possui registro em função da temperatura ou tempo (SILVA, 2019; SCALIZE et al., 2020; CUNHA; GOES, 2022).

As análises são realizadas em uma termobalança, possuindo sensores de temperatura que permitem a medida de massa contínua em função da temperatura. Os dados obtidos são expressos por meio de gráficos, denominados de curvas termogravimétricas, que fornecem dados em relação à estabilidade térmica da amostra, sua composição e a estabilidade dos produtos intermediários e finais (SILVA, 2019; OLIVEIRA, 2021).

3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para a realização de medidas relacionadas à diferença de fluxo de calor entre determinada amostra e um material de referência em função de uma temperatura controlada. É uma técnica que permite a caracterização de fármacos e outras substâncias, como excipientes e misturas (COSTA et al., 2020).

A partir desta, ocorre a viabilidade de comparação através dos valores de entalpia, faixa de temperatura dos eventos térmicos, que podem ser exotérmicos ou endotérmicos, alterações no ponto de fusão, aparecimento, desaparecimento ou alterações nos picos, caracterizando fatores que podem ser possíveis problemas de incompatibilidade (LOPES et al., 2019; COSTA et al., 2020).

3.3 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), baseia-se em uma técnica rápida, utilizada para a obtenção de informações qualitativas acerca dos constituintes de uma determinada amostra. É um método vibracional bem estabelecido, onde nas transições do infravermelho, as vibrações moleculares resultam em mudanças no momento dipolo elétrico dos grupos funcionais no decorrer da absorção da luz recebida, permitindo a identificação do tipo de ligação presente (PETIT; PUSKAR, 2018; SILVA, 2019; SPIEKERMANN, 2021).

Os estiramentos e as deformações angulares são os tipos de vibrações apresentadas, consistindo em alterações da distância intermolecular dos átomos e mudança no ângulo de ligação de um determinado grupo de átomos de uma molécula, respectivamente. Essas vibrações são nomeadas como bandas de absorção (SILVA, 2019).

As principais vantagens em relação a FTIR, são referentes a rapidez da aquisição de dados, a elevada precisão que a técnica apresenta e a melhoria significativa da razão sinal/ruído, participando fundamentalmente do controle de qualidade na indústria farmacêutica (SANTOS, 2020).

3.4 Validação e Legislação brasileira

Com o atual crescimento e competitividade do mercado global, que vem tornando-se cada vez mais exigente, as indústrias farmacêuticas estão sempre em busca de uma maior visibilidade. Para isso, ressaltam a priorização da segurança, confiança e satisfação do usuário, assim como, da qualidade de seus produtos. Em vista disso, é fundamental a existência do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas, para que por meio de uma série de operações, programação, coordenação e execução, seja assegurado e verificado que os produtos estão em conformidade com as especificações farmacopeicas e se estão atendendo os devidos padrões de qualidade (DIAS, 2019).

Os métodos analíticos são de suma importância para o desenvolvimento, a produção e controle de qualidade de um produto farmacêutico, estes possuem a capacidade de avaliar a conformidade de resultados de identificação e quantificação de analitos com suas devidas especificações de acordo com o produto ou processo. Para o uso cotidiano de um método analítico é necessário que o mesmo esteja validado, a fim de garantir que a metodologia é

exata, flexível e reprodutível sobre determinada faixa de concentração que uma substância será analisada (FERREIRA, 2018; DIAS, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é uma das responsáveis por regular os procedimentos utilizados durante a validação de métodos analíticos e em 24 de julho de 2017 deliberou a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, a qual estabelece critérios para a validação de métodos analíticos, definindo a validação analítica como: “A avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos” (BRASIL, 2017).

Dessa forma, com o êxito do método implementado e validado, assegura-se a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros utilizados para a validação de uma metodologia analítica são a seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e a robustez (BRASIL, 2017).

3.4.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade de avaliar de forma exata, substâncias presentes em determinada amostra contida de múltiplos constituintes que podem vir a interferir na sua identificação ou quantificação. Tais constituintes podem ser desde impurezas, produtos de degradação, excipientes como diluentes e também componentes da matriz. Pode esta ser avaliada, como por exemplo, através da comparação de uma matriz isenta da substância de interesse e uma matriz com adição da substância a ser determinada. É um parâmetro que deve passar por uma contínua verificação no decorrer dos testes para os demais parâmetros que serão analisados (BRASIL, 2017; FERREIRA 2018; PAGAN et al., 2019).

3.4.2 Linearidade

Em um método analítico quantitativo é importante que seja realizada a determinação das diferentes concentrações onde o método do ensaio possui sua aplicabilidade. Para isso, é necessário que sejam estabelecidos estudos de linearidade, que corresponda a capacidade de demonstrar que a obtenção de resultados é diretamente proporcional à concentração do analito em análise na amostra dentro de um intervalo específico. Para que seja certificada a garantia da linearidade em determinada metodologia, a avaliação da associação linear entre as

variáveis por meio do coeficiente de correlação, obtido através da equação da reta ($y = ax + b$) da curva analítica deve encontrar-se acima de 0,990 (BRASIL, 2017; GIERTYAS, 2020).

3.4.3 Intervalo

O intervalo de um método analítico pode ser analisado através da faixa correspondente do maior ao menor nível que venha a ser determinado a partir da exatidão e da precisão, com base nos estudos da linearidade do método (BRASIL, 2017).

3.4.4 Precisão

No processo de realização de medições é comum a presença de erros. Tendo em vista, que esses erros não podem ser erradicados, é importante que seja realizado o processo de estimativa dos mesmos, para que assim se conheça a possível causa do problema e se obtenha a minimização máxima de alguma imprecisão. Para afirmar que um método é preciso, os ensaios realizados de forma independente, com repetição das mesmas amostras, amostras semelhantes ou padrões devem apresentar proximidade ao valor central entre os resultados obtidos de acordo com o método aplicado. A precisão pode ser verificada por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (BRASIL, 2017; DIAS, 2019).

Na repetibilidade é realizada a avaliação das amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, observando a proximidade de resultados realizado por nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis determinações a 100% da concentração do teste. A precisão intermediária pode ser expressa pela proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos, utilizando as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade. Por fim, a reprodutibilidade ocorre a partir da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes. Vale ressaltar que os erros que afetam a precisão são expressos através do desvio padrão (BRASIL, 2017).

3.4.5 Limite de detecção

O limite de detecção é representado pela menor concentração do analito que pode vir a ser detectado em uma determinada amostra, porém não necessariamente quantificado, de acordo com as condições do método. Em baixa concentração é possível apenas uma identificação de forma qualitativa do analito em estudo. A determinação do limite de detecção pode ser realizada através do método visual pela razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado (BRASIL, 2017).

A análise da razão sinal-ruído se dá pela relação entre a resposta analítica de uma amostra com baixa concentração de analito e o ruído direcionado na linha de base do método, que indica a menor concentração do analito que pode ser identificada com real segurança e tendo uma razão que deve ser maior ou igual a 2:1. Em relação aos parâmetros da curva de calibração, estes podem ser realizados em função do desvio padrão da resposta analítica do branco e da inclinação presente na curva definida pela linearidade do método, utilizando a equação (BRASIL, 2017):

$$LD = 3,3. \sigma IC$$

Onde IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido através do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção, a partir do desvio padrão residual da linha de regressão e da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (BRASIL, 2017; FERREIRA, 2018).

3.4.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação representa a mais baixa concentração de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições analíticas estabelecidas pelo método. Pode ser determinado através da relação sinal/ruído através de concentrações conhecidas do analito, sendo aceitável uma razão de no mínimo de 10:1. Para a determinação baseada nos parâmetros da curva analítica, pode ser realizada através da equação (BRASIL, 2017):

$$LQ = 10. \sigma$$

Onde IC, é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido das três formas também evidenciadas no limite de detecção (BRASIL, 2017).

3.4.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é obtida através do grau de concordância entre os valores avaliados de forma individual da análise com relação a um valor aceito como verdadeiro. Pode ser analisada através de substâncias de pureza conhecida (SQR), ensaios interlaboratoriais ou por meio de ensaios de recuperação. Deve ser verificada a partir de, pelo menos, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com 3 três replicatas em cada nível (BRASIL, 2017; DIAS, 2019).

Com isso, a exatidão pode ser expressa através da correlação entre a concentração média, obtida experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, de acordo com a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.4.8 Robustez

Um método é considerado robusto, quando este é capaz de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. As variações podem ser realizadas de acordo com a característica de cada método analítico, para métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, podem ser utilizados parâmetros de variação do pH e composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel. Portanto, quantitativamente o impacto das variações propostas nos resultados obtidos devem ser avaliadas com os mesmos critérios utilizados para a exatidão e qualitativamente se ocorre alguma interferência na resposta analítica (BRASIL, 2017).

3.5 Determinação de vitaminas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Dentre as carências nutricionais mais evidenciadas epidemiologicamente, a deficiência de vitaminas é considerada a principal no contexto de saúde pública em todo o mundo, afetando principalmente os países subdesenvolvidos, colaborando de forma significativa para

o aumento da morbimortalidade. Tendo em vista esse aspecto, as análises quantitativas e qualitativas de vitaminas são de grande relevância para as ciências médicas, farmacêuticas, alimentares e para um adequado controle de qualidade de medicamentos. Contudo, tais análises necessitam métodos analíticos de alta precisão, dado que estes nutrientes possuem maior potencial de perda parcial ou total do valor vitamínico, como por exemplo em condições de variação de pH e temperatura (VASCONCELOS et al., 2018).

Atualmente, dentre os métodos analíticos para a determinação de vitaminas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) possui a maior sensibilidade e especificidade de quantificação, inclusive para as vitaminas que fazem parte do complexo B, como o ácido fólico (vitamina B9). Consiste em um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, que são: a fase móvel que é constituída por um determinado solvente líquido que transporta a amostra solubilizada e realiza a eluição sob altas pressões, tendo sua escolha baseada nas características físico-químicas, na força de interação e na solubilidade do analito. A fase estacionária é composta por pequenas partículas, compactadas e distribuídas uniformemente, contidas em uma coluna cilíndrica, sendo normalmente mais empregada a sílica (SiO_2), que apresenta precisão na distribuição de tamanho e poros. As características mencionadas ressaltam a versatilidade da CLAE e notáveis vantagens como: possibilidade de aplicação vasta em variedades de amostras, tempo ágil de análise quando comparado com outras técnicas cromatográficas, alta precisão e resolução de resultados, alta sensibilidade devido a sofisticação de detectores e boa reprodutibilidade (BRAGA, 2018; SASAKI; HATATE; TANAKA, 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Insumo Farmacêuticos Ativo (IFA)

O Ácido Fólico padronizado foi fornecido por uma Indústria Farmacêutica.

4.1.2 Solventes e reagentes

Como solventes foram empregados, metanol, grau HPLC P.A. (LiChrosolv[®], lote: SHBG7762V) e a água purificada (resistividade abaixo de 18 MΩ. cm⁻¹) obtida de um ultra purificador de água da marca Millipore[®] (Massachusetts, EUA), modelo Milli-Q A10 gradiente. Para a solução tampão foi utilizado o fosfato de potássio dibásico anidro P.A (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, lote: 35005) e o fosfato de potássio monobásico P.A (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, lote: 36439).

4.1.3 Equipamentos e materiais

Os equipamentos utilizados durante as análises foram uma Lavadora Ultrassônica (Biotron[®]), pHmetro (Hanna Instruments[®]), Balança analítica (Shimadzu[®]), Estufa (MedClave[®]), Vidrarias (provetas, béqueres, balões volumétricos, vidro de relógio, funil, bastão, vials e frascos), espátulas, seringas e filtros de seringa com 0,45 µm.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização do Ácido Fólico

4.2.1.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria derivada (DTG) e Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As curvas Termogravimétricas (TG/DTG) e de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) foram obtidas em um módulo termogravimétrico modelo SDT Q600 (TA Instruments[®], New Castle, Delaware, EUA). As amostras foram acondicionadas em cadinhos

de alumina aberto, usando razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, e faixa de temperatura de 30°C até 800°C , sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Utilizou-se o software TA Universal Analysis® para tratamento dos dados. A calibração do SDT Q600 foi realizada incluindo os parâmetros “*TGA weight*” e “*DSC baseline*” do equipamento, utilizando peso padrão e padrão de Zinco, respectivamente. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas do Certbio, Departamento de Farmácia, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

4.2.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise espectroscópica foi realizada em espectrômetro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), 400, (Perkin Elmer®) FTIR-MIR. As amostras foram caracterizadas empregando-se a técnica de reflexão total atenuada (ATR), no modo transmitância, com resolução espectral de 4 cm^{-1} e média de 64 varreduras (scans) por espectro. A região espectral avaliada foi de 4000 a 650 cm^{-1} . Os espectros obtidos foram comparados aos disponibilizados na literatura.

4.2.2 Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação do Ácido Fólico

A validação do método de quantificação foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (BRASIL, 2017).

4.2.2.1 Condições Cromatográficas

A determinação de ácido fólico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em um HPLC Flexar LC (PerkinElmer®) equipado com uma bomba quaternária, um compartimento de colunas com aquecimento, detector de arranjo de diodos (DAD), degaseificador e módulos de injeção manual e automática. O ácido fólico foi separado em uma coluna Symmetry® C18 $5\mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$. A temperatura da coluna foi mantida em 40°C . A separação do ácido fólico foi realizada utilizando como fase móvel metanol:água

(40:60), de forma isocrática por 5 min. O fluxo foi mantido em $0,50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$. O ácido fólico foi monitorado no comprimento de onda de 280 nm.

4.2.2.2 Preparo da solução tampão

Para o preparo de 100 mL de solução tampão com $\text{pH} = 8,0$. Em uma estufa, dessecou-se o Fosfato de Potássio monobásico P.A (KH_2PO_4) e o Fosfato de Potássio dibásico anidro P.A (K_2HPO_4) em uma temperatura de 110°C . Em seguida, foram pesados 2,72 g de KH_2PO_4 e 3,48 g de K_2HPO_4 e dissolvidos em 5,3 mL e 94,7 mL de água ultrapura, respectivamente, sendo misturados e observado o alcance do pH em um pHmetro. A solução tampão obtida e utilizada, proporcionou de forma considerável e satisfatória o desenvolvimento do método analítico.

4.2.2.3 Preparo da solução-estoque e soluções-trabalho

Foi preparada a solução estoque de Ácido Fólico, na concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pesaram-se 5 mg de ácido fólico padronizado em uma balança analítica, e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com a solução tampão. Em seguida, foi direcionado ao ultrassom para uma melhor homogeneização. Por fim, foi transferida para um frasco âmbar e armazenada sob refrigeração ($2-8^\circ\text{C}$).

As soluções trabalho foram preparadas a partir da solução estoque, diluídas na fase móvel metanol:água (40:60), até a obtenção de uma concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em balões volumétricos de 10 mL. Para isso, foram pipetados $100 \mu\text{L}$, $200 \mu\text{L}$, $300 \mu\text{L}$, $400 \mu\text{L}$, $500 \mu\text{L}$ e $600 \mu\text{L}$ respectivamente. Todas as amostras foram filtradas através de membrana filtrante de $0,45 \mu\text{m}$ antes da injeção no sistema cromatográfico.

4.2.2.4 Seletividade

A seletividade do método demonstra a capacidade de identificar e quantificar a possível presença de interferentes, ou seja, componentes que possam estar presentes no analito, como: impurezas, diluentes e componentes da matriz. A seletividade do método foi avaliada através da análise de pureza do pico, verificando a ocorrência de co-eluição de outros compostos e/ou produtos de degradação (BRASIL, 2017).

4.2.2.5 Linearidade

A linearidade do método analítico, demonstra a sua capacidade de obter respostas proporcionais a concentração do analito na amostra, em uma determinada faixa de concentração, realizando a construção da curva analítica. As concentrações da solução de trabalho contendo ácido fólico utilizados para a obtenção das curvas analíticas por CLAE foram: 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Avaliação da linearidade do método analítico, foi realizada de acordo com a construção de três curvas analíticas, do cálculo do coeficiente de variação (CV%) e do coeficiente de correlação linear (R^2), sendo o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação o valor de 0,99 e o coeficiente angular significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

4.2.2.6 Limite de detecção

O Limite de detecção é demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, entretanto, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação do limite de detecção deu-se com base nos parâmetros da curva de calibração, sendo a concentração mínima de ácido fólico medida e informada com 99% ou 95% de confiança (BRASIL, 2017).

4.2.2.7 Limite de quantificação

O Limite de quantificação é demonstrado pela menor quantidade do ácido fólico quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Obteve-se sua determinação com base nos parâmetros da curva de calibração dentro do intervalo de confiança (BRASIL, 2017).

4.2.2.8 Exatidão

A exatidão demonstra a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em percentual. Teve sua determinação após o estabelecimento da seletividade e da linearidade, sendo verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do método, com três

concentrações, baixa, média e alta, (10,0; 30,0; 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) tendo três réplicas cada, totalizando nove eluições (BRASIL, 2017).

4.2.2.9 Precisão

A avaliação da precisão observa-se a relação entre os níveis de repetibilidade e precisão intermediária. Para avaliação deste parâmetro foram executadas nove determinações sucessivas com concentrações baixa, média e alta, (10,0; 30,0; 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), realizadas em dias diferentes (interdia) do ácido fólico por analistas diferentes, sob as mesmas condições, no mesmo instrumento, com a obtenção dos valores médios das determinações e a estimativa dos desvios padrões reais (BRASIL, 2017).

4.2.2.10 Robustez

A robustez do método analítico, apresenta a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, podendo ser avaliadas a partir da influência dessas variáveis dos fatores selecionados nos resultados finais. Escolheu-se três parâmetros para modificação, submetidos a variações acima e abaixo do valor padrão como indicado na tabela 1. Foram realizadas as corridas cromatográficas para as concentrações baixa, média e alta, (10,0; 30,0; 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata para cada concentração (BRASIL, 2017).

Tabela 1 - Parâmetros da robustez e suas variações.

Parâmetro	Padrão	Variação
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30 $^{\circ}\text{C}$	28 $^{\circ}\text{C}$ - 32 $^{\circ}\text{C}$
Comprimento de onda (nm)	280 nm	275 nm - 285 nm
Vazão (mL.min^{-1})	0,50 mL.min^{-1}	0,45 mL.min^{-1} - 0,55 mL.min^{-1}

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

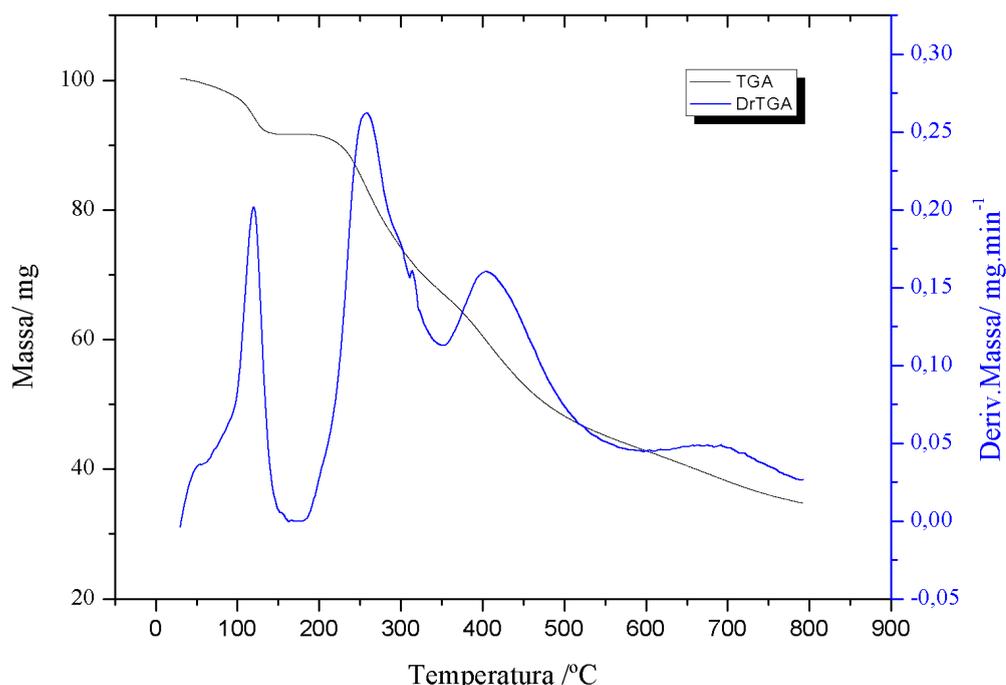
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização térmica do Ácido Fólico

5.1.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)

A análise termogravimétrica foi realizada com o intuito de verificar a ocorrência de degradação térmica do ácido fólico. A curva TG/DTG apresentou três etapas de degradação, sendo a primeira de 56 a 144°C ($\Delta_{m\%} = 8,2\%$; $DTG_{pico} = 120^\circ\text{C}$), devendo-se provavelmente a perda de água adsorvida. O segundo e o terceiro evento ocorreram de forma seguida, de 206 a 332°C ($\Delta_{m\%} = 22,7\%$; $DTG_{pico} = 256^\circ\text{C}$) e 381 a 463°C ($\Delta_{m\%} = 20,8\%$; $DTG_{pico} = 411^\circ\text{C}$), respectivamente, indicando o processo de degradação da vitamina B9, principalmente no segundo e terceiro evento, onde ocorrem as maiores perdas de massa do material, como pode ser observado na Figura 2. Ao final da análise observou-se a formação de resíduo 34,8% com massa de 1,842 mg. Portanto, o ácido fólico apresenta-se termicamente estável até a temperatura de 56°C, assemelhando-se com a literatura científica (ACEITUNO-MEDINA et al., 2015; EVANGELHO, 2018).

Figura 2 – Curva TG/DTG do Ácido Fólico.

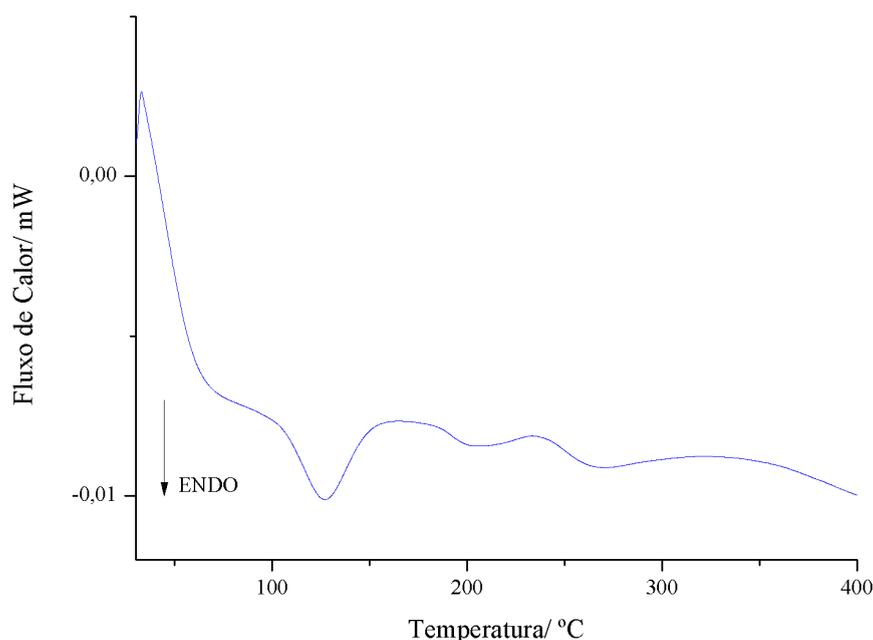


Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

De acordo com os eventos térmicos observados na curva DSC, foi possível determinar que ácido fólico não apresentou evento endotérmico referente a fusão, pois a medida que ocorre a transição de fase inicia-se o processo de decomposição, indicando uma degradação inicial da vitamina, que possui característica hidrossolúvel, contribuindo para esta condição, que apresenta-se de acordo com os dados obtidos na curva TG. Também, foram constatados a presença de três eventos térmicos, sendo o primeiro evento de característica endotérmica, ocorrendo entre 104 a 154°C ($T_{pico} = 127^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{fus} = 0,42 \text{ J.g}^{-1}$), estando associado a perda de água adsorvida do material. O segundo evento endotérmico ocorreu entre 185 a 230°C ($T_{pico} = 202^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{fus} = 0,081 \text{ J.g}^{-1}$) e o terceiro, entre 242 a 315°C ($T_{pico} = 266^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{fus} = 0,16 \text{ J.g}^{-1}$), característico do processo de degradação do ácido fólico, como pode ser observado na Figura 3. Com isso, é possível afirmar que os resultados obtidos apresentam-se semelhantes à literatura. Entretanto, é importante ressaltar que, por mais que as condições analíticas sejam semelhantes, a aplicação de diferentes metodologias, como no caso da utilização de cadinhos em um sistema aberto, podem gerar resultados aproximados (VORA et al., 2002; ARAÚJO, 2013).

Figura 3 – Curva DSC do Ácido Fólico.

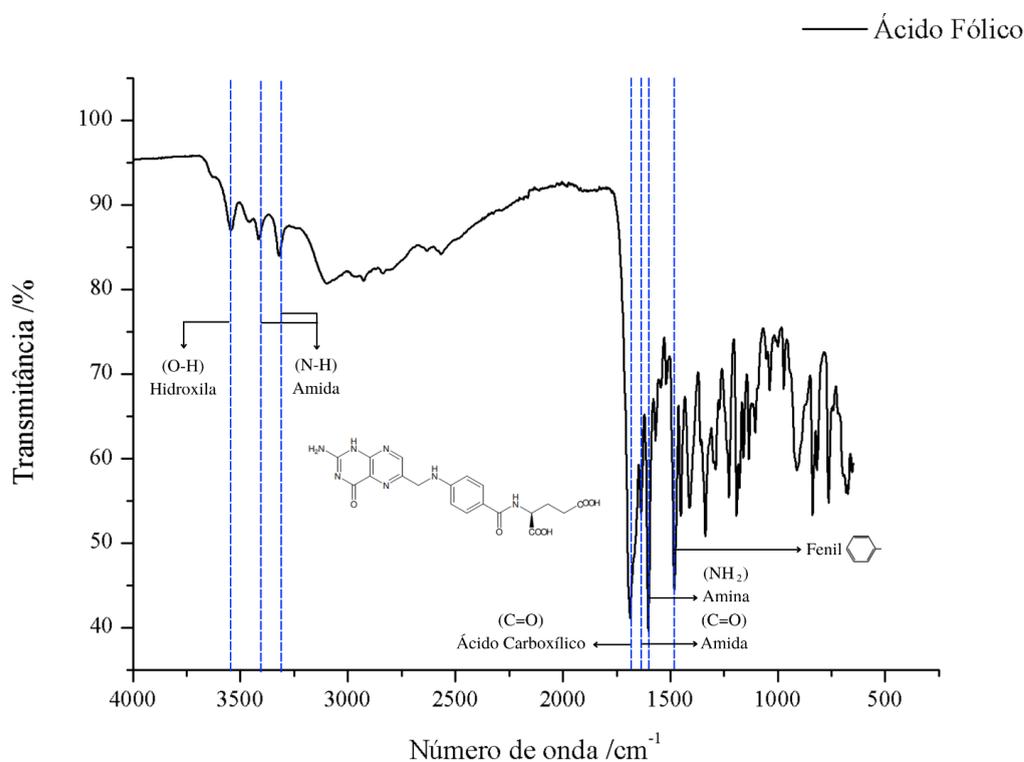


Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

5.2 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise espectroscópica no infravermelho é imprescindível para a obtenção de informações qualitativas a respeito de um determinado analito. Conforme demonstrado na Figura 4, verificou-se a presença de bandas sugestivas de estiramento axial de O-H referente a porção de ácido glutâmico e do grupo N-H do anel pteridina, respectivamente, dispostas entre as regiões entre 3300 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} , enquanto a banda em aproximadamente 1605 cm^{-1} , refere-se a vibração do dobramento -NH. As bandas observadas entre 1510 cm^{-1} e 1485 cm^{-1} são atribuídas à banda de absorção característica do anel pteridina e fenil. Outras bandas observadas são apresentadas na Tabela 2. Portanto, evidencia-se um perfil espectral concordante com a molécula do ácido fólico, corroborando com os estudos apresentados na literatura (RAOUF et al., 2014; ACEITUNO-MEDINA et al., 2015; ASSADPOUR; JAFARI; MAGHSOUDLOU, 2017; ZHANG et al., 2008).

Figura 4 – Espectro FTIR do Ácido Fólico.



Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Tabela 2 - Principais bandas observadas no espectro de FTIR do Ácido Fólico.

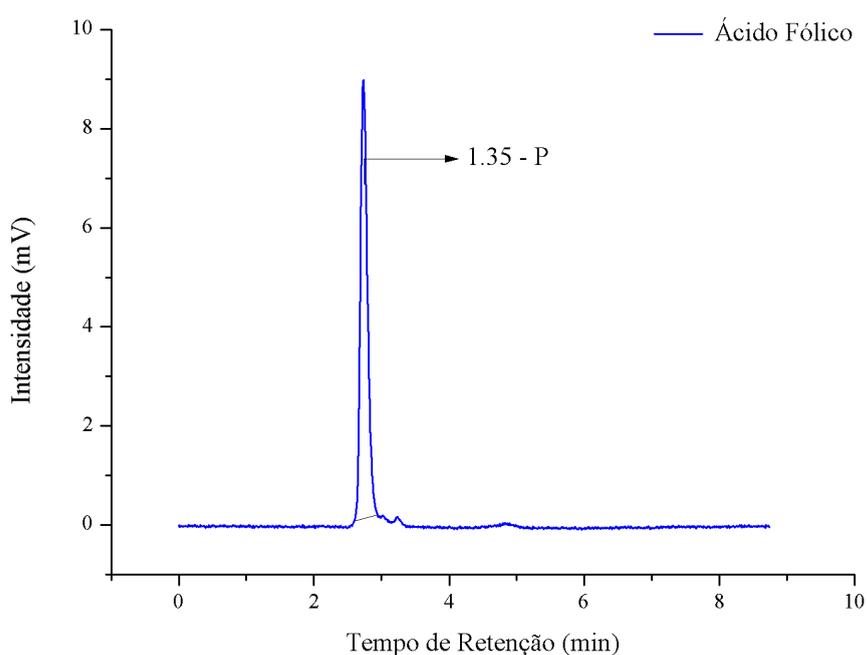
Grupos	Comprimento de onda (cm ⁻¹)								
	O-H	N-H	C-H	C-H	-CH ₂	C=O	C=O	-NH ₂	Fenil
	3543	3414	2955	2920	2840	1687	1638	1602	1481
		3320							

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

5.3 Validação do método analítico para quantificação de Ácido Fólico

5.3.1 Seletividade

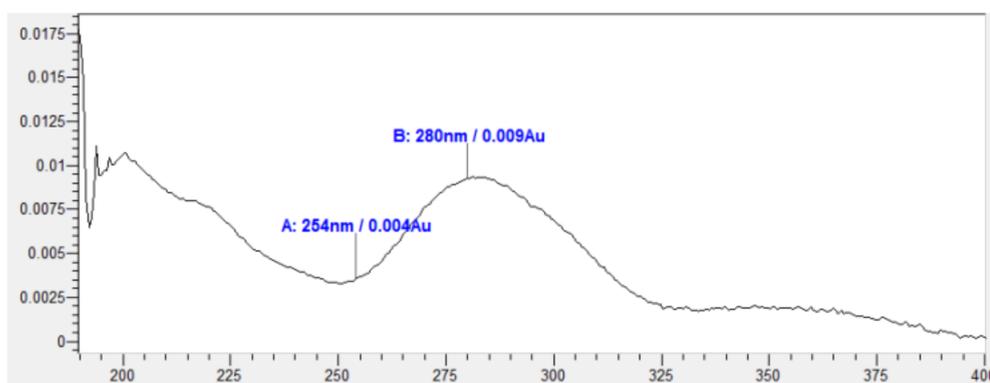
A seletividade do método foi avaliada através da análise da pureza cromatográfica do sinal analítico (pico) do padrão de ácido fólico, verificando a ocorrência de algum interferente, como impurezas, produtos de degradação que surgissem no mesmo tempo de retenção da vitamina, ou seja, que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito. Portanto, não foi verificada a coeluição de outros compostos ($PUREZA_{\text{Ácido Fólico}} = 1.35$), tendo em vista, que durante a eluição o pico apresentou um espectro puro, como visto na Figura 5 (BRASIL, 2017).

Figura 5 – Cromatograma do padrão de Ácido Fólico.

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Durante a realização da seletividade do método, o ácido fólico foi monitorado no comprimento de onda de 280 nm. Para a realização da detecção, é indicada a utilização de detector por absorvância no ultravioleta-visível (UV/Vis) com arranjo de diodos (DAD), onde, fotômetros utilizam radiações com comprimentos de onda específicos, que podem ser absorvidas por diferentes grupos funcionais. Portanto, obteve-se a varredura do espectro UV/Vis, através dos detectores presentes no CLAE, apresentando absorvância entre 254 nm e 280 nm, como pode ser observado na Figura 6. Os resultados encontrados possuem concordância com a literatura, constatando a seletividade do método (ARAÚJO, 2013; ROSA, 2020; LORENO, 2021; MEZA, 2022).

Figura 6 – Espectro UV/Vis do Ácido Fólico.



Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

5.3.2 Linearidade

Conforme a resolução nº 166/2017, a qual estabelece critérios para a validação de métodos analíticos da ANVISA, a curva de calibração deve ser elaborada com no mínimo cinco pontos, realizados em triplicata. Assim, foi elaborada a curva padrão pelo método de padronização externa com seis níveis de concentração, para o ácido fólico. Desse modo, com a curva obtida, certifica-se que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da vitamina, dentro do intervalo especificado. A análise da regressão linear demonstrou um coeficiente de determinação (R^2) muito próximo ao preconizado ($R^2_{\text{Ácido Fólico}} = 0,9996$), propondo a linearidade do método, visto que, a RDC recomenda um coeficiente de correlação acima ou igual a 0,990, conforme pode ser observado na Figura 6 e nos dados da Tabela 3 (BRASIL, 2017).

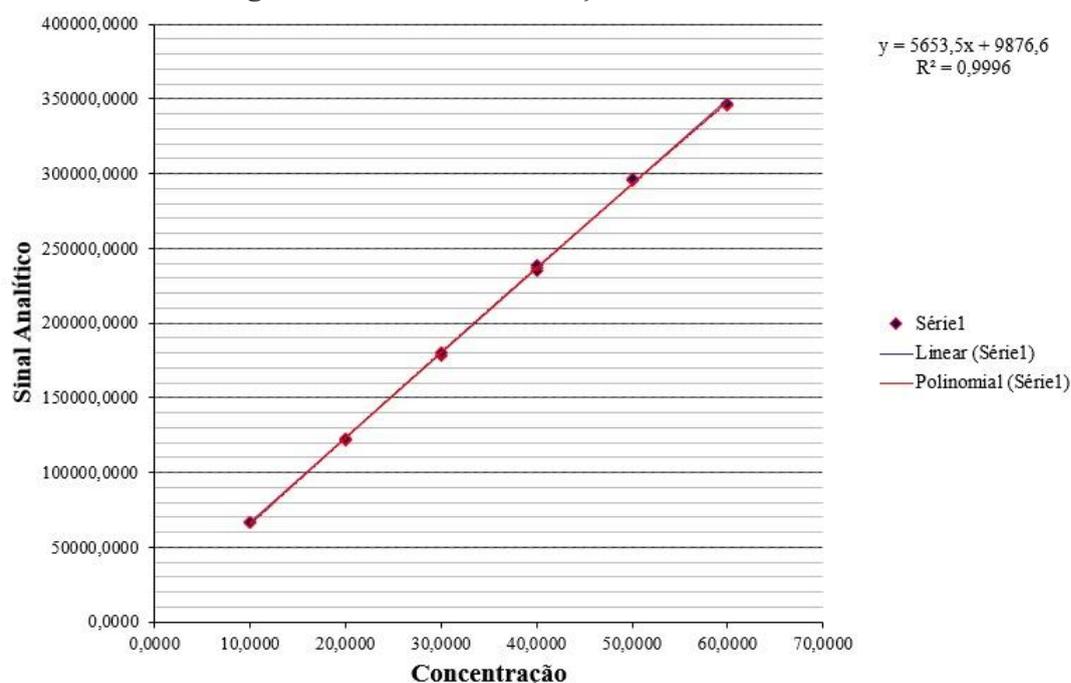
Ainda na Tabela 4, está apresentada a equação da reta, obtida pela curva analítica do ácido fólico, sendo os pontos realizados em triplicata, relacionando-se a concentração do padrão com a média das áreas dos picos. Foram, então, correlacionados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Todos os desvios-padrões relativos (DPR%) entre as áreas dos picos obtidas numa mesma concentração, apresentaram diferença menor que 5%, indicando que não ocorreu significância nas diferenças de valores entre as áreas nas triplicatas. (BRASIL, 2017).

Tabela 3 - Valores médios das áreas obtidos na construção da curva analítica.

Ácido Fólico (Vitamina B9)						
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0
	66287,0	122305,0	178671,0	236592,0	295100,0	345507,0
Área	66386,0	121615,0	180015,0	234767,0	296247,0	346809,0
	66168,0	121985,0	179932,0	238243,0	296442,0	346443,0
Média	66280,33	121968,3	179539,3	236534,0	295929,7	346253,0
DPR (%)	0,16	0,28	0,42	0,74	0,25	0,19

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Figura 7 – Curva de calibração do Ácido Fólico.



Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Tabela 4 - Características analíticas obtidas pelo método proposto.

Parâmetros Estatísticos	Ácido Fólico
Equação da reta	$y = 5653,5x + 9876,6$
Coefficiente de correlação	0,9996

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

5.3.3 Limite de detecção e quantificação

Através da curva de calibração, foram estimados os limites de detecção e quantificação do ácido fólico, observados na Tabela 5. Sendo, a menor concentração da vitamina detectada pelo método e a menor concentração que é possível ser quantificada, respectivamente. Em concordância com os resultados obtidos, pode-se constatar a sensibilidade do método, evidenciando que o mesmo é adequado para a finalidade proposta.

Tabela 5 - Limite de detecção e quantificação do Ácido Fólico.

Parâmetros Estatísticos	Ácido Fólico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Limite de detecção	1,79
Limite de quantificação	2,66

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

5.3.4 Exatidão

Ao se avaliar a exatidão de uma metodologia analítica, pode-se comprovar a proximidade dos resultados obtidos pelo método, em relação ao resultado esperado. Assim, foram determinados os resultados em três concentrações diferentes (alta, média e baixa) para o ácido fólico, a fim de realizar análise da exatidão do método. Os valores das concentrações estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores da exatidão em três níveis de concentração do Ácido Fólico.

Concentração referência ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média da concentração predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%)	DP	DPR (%)
10,0	9,8376	-1,62	0,10	1,07
30,0	30,3610	1,20	0,55	1,80

DP	0,13
DPR (%)	0,2

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Tabela 8 - Valores obtidos no ensaio de precisão interdia.

Precisão Interdia - Dia 02		
Nível	Área da Concentração Preditada	Concentração Preditada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Baixo	66541,0	10,02
Baixo	66965,0	10,10
Baixo	66602,0	10,03
Média		10,05
DP		0,04
DPR (%)		0,4
Médio	181198,0	30,30
Médio	178611,0	29,85
Médio	186242,0	31,20
Média		30,45
DP		0,687
DPR (%)		2
Alto	288796,0	49,34
Alto	290249,0	49,59
Alto	280689,0	49,18
Média		49,37
DP		0,21
DPR (%)		0,4

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Tabela 9 - Valores obtidos no ensaio de precisão interanalista.

Precisão Interanalista - Analista 1		
Nível	Área da Concentração Preditada	Concentração Preditada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Baixo	66187,0	9,96
Baixo	66386,0	10,0

Baixo	66168,0,0	9,96
Média		9,97
DP		0,023
DPR (%)		0,2
Médio	179410,0	29,99
Médio	178211,0	29,78
Médio	179199,0	29,95
Média		29,90
DP		0,111
DPR (%)		0,3
Alto	295100,0	50,45
Alto	296247,0	50,65
Alto	296442,0	50,69
Média		50,60
DP		0,128
DPR (%)		0,2

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Tabela 10 - Valores obtidos no ensaio de precisão interanalista.

Precisão Interanalista - Analista 2		
Nível	Área da Concentração Preditada	Concentração Preditada (µg.mL⁻¹)
Baixo	64940,0	9,74
Baixo	65249,0	9,79
Baixo	65464,0	9,83
Média		9,78
DP		0,12
DPR (%)		1,2
Médio	184000,0	30,80
Médio	184168,0	30,83
Médio	185235,0	31,02
Média		30,88
DP		0,12
DPR (%)		0,3
Alto	290262,0	49,60

Alto	291545,0	49,82
Alto	291059,0	49,74
Média	49,72	
DP	0,111	
DPR (%)	0,2	

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Seguindo os parâmetros da RDC 166/2017, permite-se um desvio padrão relativo inferior a 5%, por meio desse critério, o método analítico pode ser considerado preciso e não sofre influência do intervalo de tempo em que é realizado e da mudança de analista (BRASIL, 2017).

5.3.6 Robustez

A robustez possui a capacidade de analisar a resistência do método a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando confiabilidade durante a sua aplicação. A avaliação desse parâmetro foi realizada a partir da verificação nas concentrações baixa ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e alta ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), realizadas em triplicata, das variações de temperatura, comprimento de onda e vazão, como indicados nas Tabelas 11, 12 e 13 (BRASIL, 2017).

Tabela 11 - Valores do efeito da variação da temperatura no ensaio de robustez.

Temperatura	28°C		32°C	
Nível	Área da Concentração Predita	Concentração Predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área da Concentração Predita	Concentração Predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Baixo	66869	10,08	69189	10,49
Baixo	66923	10,09	67408	10,17
Baixo	66813	10,07	67294	10,15
Média		10,08		10,27
DP		0,01		0,19
DPR (%)		0,09		1,85
Médio	181900	30,43	176772	29,52
Médio	182425	30,52	177160	29,59

Médio	175436	29,28	178286	29,79
Média		30,07		29,63
DP		0,69		0,14
DPR (%)		2,3		0,47
Alto	289272	49,42	291128	49,75
Alto	289720	49,50	290768	49,68
Alto	289514	49,46	290205	49,58
Média		49,46		49,67
DP		0,04		0,085
DPR (%)		0,08		0,17

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Tabela 12 - Valores do efeito da variação do comprimento de onda no ensaio de robustez.

Detector	275 nm		285 nm	
Nível	Área da Concentração Predita	Concentração Predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área da Concentração Predita	Concentração Predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Baixo	66307	9,98	69041	10,46
Baixo	67741	10,23	69809	10,60
Baixo	66357	9,99	67155	10,13
Média		10,06		10,39
DP		0,14		0,24
DPR (%)		1,4		2,32
Médio	185480	31,06	179648	30,03
Médio	185349	31,04	180249	30,13
Médio	171559	28,60	178227	29,78
Média		30,23		29,98
DP		1,41		0,18
DPR (%)		4,6		0,6
Alto	285688	48,78	294818	50,40
Alto	284020	48,49	297421	50,86
Alto	286954	49,00	286159	48,87
Média		48,76		50,04
DP		0,25		1,04
DPR (%)		0,5		2

Fonte: Dados da pesquisa, 2022.

Tabela 13 - Valores do efeito de vazão no ensaio de robustez.

Vazão	0,45 mL/min		0,55 mL/min	
Nível	Área da Concentração Predita	Concentração Predita ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Área da Concentração Predita	Concentração Predita ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Baixo	69775	10,59	64711	9,70
Baixo	66785	10,06	66451	10,00
Baixo	69333	10,51	64052	9,58
Média		10,38		9,76
DP		0,28		0,21
DPR (%)		2,7		2,2
Médio	192922	32,37	176882	29,54
Médio	189465	31,76	176814	29,52
Médio	189876	31,83	176854	29,53
Média		31,98		29,53
DP		0,33		0,01
DPR (%)		1		0,03
Alto	299225	51,18	288710	49,32
Alto	297675	50,90	289475	49,45
Alto	298595	51,06	287350	49,08
Média		51,04		49,28
DP		0,14		0,18
DPR (%)		0,2		0,03

Fonte: Dados da pesquisa, 2022

De acordo com os dados obtidos, considera-se que o método analítico é robusto para os parâmetros propostos em análise, tendo em vista que obedece a RDC 166/2017, que permite um desvio padrão relativo inferior a 5% (BRASIL, 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante o processo de caracterização do ácido fólico por TG, DSC e FTIR, foi possível a obtenção de resultados condizentes e que corroboram com os apresentados na literatura. Com isso, possibilitou a comprovação que o insumo farmacêutico utilizado estava de acordo com as especificações esperadas, proporcionando um prosseguimento satisfatório para a validação do método analítico, utilizando a CLAE, que contribuiu de forma considerável, propiciando um procedimento analítico rápido, fácil, confiável, eficiente e de baixo custo. Seguindo os parâmetros da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, foi possível o desenvolvimento e a validação do método analítico, tendo em vista, que os resultados obtidos apresentaram-se em concordância com o que é deliberado pela resolução. Desse modo, o processo de caracterização e validação analítica contribuem de forma relevante para o controle de qualidade de suplementos alimentares, considerando que as legislações vigentes para esse âmbito ainda não possuem regularização de forma minuciosa.

Diante do exposto, na perspectiva de colaborar com a segurança e eficácia da suplementação nutricional através de um adequado controle de qualidade, levando em consideração o aumento da demanda nutritiva de ácido fólico no contexto periconcepcional e gestacional, estima-se que o método analítico desenvolvido e validado possa ser aplicado em produtos já comercializados contendo ácido fólico. Assim como, para perspectivas de pesquisas futuras, sejam realizadas técnicas complementares, como por exemplo a Espectroscopia de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Difractometria de Raios X, objetivando uma caracterização adicional e maior elucidação de parâmetros físicos e moleculares da vitamina B9.

REFERÊNCIAS

- ACEITUNO-MEDINA, Marysol *et al.* Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate – Pullulan electrospun fibers. **LWT - Food Science and Technology**, [S.L], v.62, n.2, p.970-975, nov. 2014/fev. 2015.
- ALBUQUERQUE, Hemilly Roberta de Freitas; E SILVA, Jamily Vieira; CELESTINO, Maria José dos Santos. **Excesso de ácido fólico na gestação: uma revisão integrativa**. 2020. Artigo de revisão (Graduação de Bacharelado em Nutrição) – Centro Universitário Tiradentes, Alagoas, 2020.
- AMORIM, Antônia Fádía Valentim de. **Métodos Cromatográficos**. 1. ed. Fortaleza: EdUECE, 2019. p.43-57.
- ANHÊ, Nathan Bardini; PIRES, Marina Trevizan; GUERRA, Leonardo Siqueira Aprile. O uso da suplementação materna para prevenção de defeitos congênitos e outros agravos na gestação. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.6, p.63883-63900, mai./jun. 2021.
- ARAÚJO, Eliane Gonçalves de. **Aplicabilidade da voltametria de pulso diferencial para a quantificação de ácido fólico e ácido oxálico: um método comparativo**. 2013. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.
- ASSADPOUR, Elham; JAFARI, Seid-Mahdi; MAGHSOUDLOU, Yahya. Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.L], v.95, [s.n.], p.238-247, jul./nov. 2016.
- BRAGA, Antônio *et al.* Micronutrientes e sua importância no período gestacional. **Revista saber científico**, Saber científico, v.7, n.1, p.68 - 82, jan./jun. 2018.
- BRAGA, Silmara Leoncio. **Guia para desenvolvimento e otimização de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de fármacos**. 2018. Monografia (Graduação de Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, estabelece critérios para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de jul, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 de abr. 2010.

COSTA, Bruna de Araújo *et al.* Viabilidade da administração oral em pré-formulação composta por ganciclovir com NaCl por TGA/DTGA e DSC. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n.12, p.100508-100517, nov./dez. 2020.

CUNHA, Caio Fonseca Rodrigues da; GOES, Luana Furtado Messias. **Ensaio de calorimetria e análise termogravimétrica em amostras aleatórias e desconhecidas**. 2022. Monografia (Graduação de Bacharelado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

DIAS, Francielle Regina Silva. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos**. 2019. Artigo de revisão (Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

EVANGELHO, Jarine Amaral do. **Encapsulação do ácido fólico e avaliação de sua estabilidade frente a tratamentos térmicos e irradiação UVA**. 2018. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

FARMACOPEIA. Farmacopeia brasileira, Sexta Edição. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 1, n. 6, p. 873, 2019.

FERREIRA, Caio Cavalcanti de Oliveira. **Validação de metodologia analítica: elaboração de um guia prático para os laboratórios de pesquisa acadêmicos**. 2018. Monografia (Graduação de Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.

GIERTYAS, José Cristian. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a determinação dos produtos de oxidação de álcoois**. 2020. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2020.

KHAN, Kashif M.; JIALAL, Ishwarlal. Folic Acid Deficiency. *In: Statpearls Publishing, Treasure Island, [S.L.], jan. 2020.*

LINHARES, Angélica Ozório; CESAR, Juraci Almeida. Suplementação com ácido fólico entre gestantes no extremo Sul do Brasil: prevalência e fatores associados. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v.22, n.2, p.535-542, fev. 2017.

LOPES, Mariana S. *et al.* Ketoconazole: compatibility with pharmaceutical excipients using DSC and TG techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, v.141, [s.n.], p.1371-1378, jun./nov. 2019.

LORENO, Karen Petyele. **Quantificação do ácido fólico em farinha de trigo adotando o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV: Validação do método**. 2021. Monografia (Graduação de Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2021.

MAIA, Carina Scanoni *et al.* Transtorno do espectro autista e a suplementação por ácido fólico antes e durante a gestação. **J. bras. psiquiatr.**, Rio de Janeiro, v.68, n.4, p.231-243, nov./nov. 2019.

MARQUI, Daiane Cristina. **Avaliação da influência dos parâmetros experimentais nos resultados de análises térmicas (TGA/DSC) de insumos farmacêuticos ativos hidratados**. 2019. Monografia (Especialização em Análise Instrumental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

MERRELL, Brigham J.; MCMURRY, John P. Folic Acid. *In*: Statpearls Publishing, Treasure Island, [S.L], jan. 2022.

MEZA, Eduardo Lucero. **Análisis farmacocinético de nanopartículas luminiscentes con quitosano y ácido fólico para uso en detección de cáncer de mama**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, 2022.

OLIVEIRA, Juliana Blume de. **Avaliação da degradação térmica da biomassa vegetal Pau Ferro por Análise Termogravimétrica (TGA)**. 2021. Monografia (Graduação de Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

OLIVEIRA, Letícia Sousa; GERMANO, Bianca Caroline da Cunha; KRAMER, Dani Geraldo. Importância do ácido fólico na gestação: revisão bibliográfica descritiva. **Revista interfaces**, [S.L], v.9, n.2, p.1141 - 1146, abr./jun. 2021.

OMS. Diretriz: Suplementação diária de ferro e ácido fólico em gestantes. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2013.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Recomendações da OMS sobre cuidados pré-natais para uma experiência positiva na gravidez. Genebra; 2016:10p.

PAGAN, Fausto de Souza *et al.* Validação de método analítico para quantificação do fipronil por cromatografia líquida de alta eficiência. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.16, n.29, p. 2457 - 2471, abr./jun. 2019.

PETIT, Tristan; PUSKAR, Ljiljana. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. **Diamond & Related Materials**, [S.L], v.89, [s.n.], p.58-66, jul./ago. 2018.

RAOUF, Abdul Latif Mohammed *et al.* Qualitative and Quantitative Determination of Folic acid in Tablets by FTIR Spectroscopy. **International journal of advances in pharmacy, biology and chemistry**, Bagdá, v.3, n.2, p.773-780, jul./set. 2014.

RATAJCZAK, Alicja Ewa *et al.* Does Folic Acid Protect Patients with Inflammatory Bowel Disease from Complications?. **Nutrients**, Poznan, Polônia, v.13, n.4036, p.1-13, nov./nov. 2021.

ROSA, Carine de Andrade Duarte; ABE-MATSUMOTO, Lucile Tiemi. Ácido fólico em alimentos: breve visão e revisão. **Convibra**, São Paulo, [s.v.], [s.n.], p. 1-12, nov./nov. 2020.

SANTOS, Daniel José Ferreira. **Controlo da qualidade ao nível de uma indústria farmacêutica**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química, especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2020.

SASAKI, Kaede; HATATE Hideo; TANAKA, Ryusuke. Determination of 13 Vitamin B and the Related Compounds Using HPLC with UV Detection and Application to Food Supplements. **Chromatographia**, [S.L], v.83.[s.n.], p.839-851, jan./mai. 2020.

SCALIZE, Paulo Sérgio *et al.* Aplicação de Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria Derivada (DTG) em materiais orgânicos usados como adsorventes. *In*: XIX SILUBESA – SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL 2020, 19., 2020. Recife. **Anais [...]** Recife: [s.n.], 2020. p.1-7.

SILVA, Paulo César Dantas da. **Estudo de desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata em associação dose fixa para o tratamento de filariose**. 2019. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, Paulo César Dantas da. **Estudo termoanalítico de compatibilidade fármaco-excipiente e de estabilidade entre ácido lipóico e adjuvantes tecnológicos**. 2014. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SILVA, Wallison Martins; DOS SANTOS, Flávia Regina; BATISTUTI, José Paschoal. Doseamento do ácido fólico. **Alim. Nutr., Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v.24, n.3, p. 275-282, jul./set. 2013.

SOUSA, Gabriely Almeida *et al.* Prejuízos relacionados à deficiência de ácido fólico: uma revisão de literatura. *In*: V SIMPÓSIO MULTIPROFISSIONAL EM CUIDADOS MATERNO INFANTIS 2020, 5., 2020. Teresina. **Anais [...]** Teresina: [s.n.], 2021. p. 30 - 31.

SPIEKERMANN, Fernando Ludgero. **Caracterização química e cinética da semente de abacate e dos biocarvões obtidos utilizando análise termogravimétrica**. 2021. Monografia (Graduação de Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

VASCONCELOS, Maria Thaís Bezerra; TANAKA, Yuri Mouzinho Ramos; DE ARRUDA, Zuleide Mirele Barbosa. **Análise de Vitamina A em Leite por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 2018. Artigo científico (Graduação de Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru, 2018.

VORA, A. *et al.* Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, [S.L] v.392, n.15, p. 209–220, set./set. 2002.

ZHANG, J. *et al.* On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. **Acta Biomaterialia**. [S.L], v.4, n.1, p.40-48, nov. 2016/jun. 2007.