

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM PREPARAÇÕES  
FARMACÊUTICAS POR VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA**

José L. F. C. Lima, M. B. Quinaz Garcia e A. M. S. Roque da Silva \*

*CEQUP/Dep. de Química-Física, Fac. de Farmácia, Univ. do Porto,*

*R. Añbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal*

**ABSTRACT**

Square wave adsorptive voltammetry at the hanging mercury drop electrode has been applied to the determination of folic acid in pharmaceutical preparations including complex mixtures of vitamins. Folic acid was extracted with an alkali solution in a single step process. One aliquot of this solution was analysed in a boric acid/sodium hydroxide buffer, pH 9.75, sweeping the potential from -0.50 to -0.90 V vs AgCl/Ag at pulse amplitude of 40mV and pulse frequency of 50Hz. The accumulation potential was -0,50V while the accumulation time was 10s. When other substances that might adsorb on the HMDE were present the accumulation potential was -0,75V and the time was 30s. The determination was carried out by using the standard additions method. Recoveries results between 96.0 and 99.7% were obtained.

**Key words:** Folic acid, Square wave voltammetry, Pharmaceutical analysis.

**INTRODUÇÃO**

O ácido fólico, ácido 4-(2-amino-4-hidroxipteridin-6-ilo) metilamino-benzoil L glutâmico, é uma importante vitamina do complexo B que ocorre naturalmente em muitos alimentos quer vegetais (algas, frutos e legumes) quer animais (fígado, ovos e leite) e ainda em micro-organismos (bactérias e leveduras). Nos mamíferos o ácido fólico e seus derivados actuam como factor de crescimento e como coenzima num grande número de reacções biológicas sendo indispensável na síntese das nucleoproteínas e na manutenção duma hematopoiese normal; a carência de ácido fólico origina uma anemia megaloblástica associada a leucopénia, alteração da mentalidade e psicose [1-3]. Para a

---

\* autor para quem a correspondência deve ser dirigida.

carência de ácido fólico podem contribuir diversos factores como a sua destruição nos alimentos devido à preparação culinária, uma deficiência de absorção intestinal, um aumento das necessidades orgânicas como acontece na gravidez, um aumento da sua excreção ou ainda por interferência no metabolismo do ácido fólico.

Os métodos analíticos para a determinação do ácido fólico incluem bioensaios, métodos enzimáticos, fluorimétricos, colorimétricos e cromatográficos [2, 4]. Numerosos métodos electroquímicos são, também, referidos; o ácido fólico tem sido determinado em fórmulas farmacêuticas por polarografia de impulsos diferencial [5], polarografia de corrente alterna [6], voltametria de impulsos diferencial em eléctrodo de carbono vítreo [7], voltametria adsortiva de remoção (VAR), quer com varrimento linear de potencial [11], quer com a técnica de impulsos diferencial [10], quer ainda com selecção de fase em corrente alterna [13] e, muito recentemente, por voltametria de onda quadrada [14], usando o eléctrodo de gota suspensa de mercúrio (HMDE). Em fluidos biológicos o ácido fólico foi determinado no soro humano e em urina por VAR em HMDE com selecção de fase em corrente alterna e técnica de impulsos diferencial, respectivamente [9-10]. Em alimentos vegetais a mesma determinação foi feita por polarografia de impulsos diferencial [5] e em águas marinhas por VAR com a técnica de impulsos diferencial em HMDE [12].

No presente trabalho descreve-se uma metodologia analítica por voltametria adsortiva de remoção com onda quadrada, em HMDE, para determinação de ácido fólico. A capacidade de acumulação do ácido fólico, por adsorção, no HMDE viabilizou a sua determinação em complexos vitamínicos onde a presença de diferentes compostos, em maior concentração, requer, geralmente, morosas etapas de extracção quando se usam outras metodologias analíticas. O método foi aplicado ao doseamento do ácido fólico em preparações farmacêuticas correntes no mercado português.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes

Todos os reagentes foram de qualidade p.a. ou semelhante e a água purificada por sistema Milipore Milli-Q (condutividade específica  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). Foi preparada, todas as semanas, uma solução  $500,0 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido fólico dissolvendo  $50,0 \text{ mg}$  de substância em  $10 \text{ ml}$  de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ M}$  e completando o volume de  $100,0 \text{ ml}$  com água. Esta solução era mantida a  $4^\circ \text{ C}$  e ao abrigo da luz. As soluções de menor concentração eram preparadas diariamente diluindo com água alcotas daquela solução.

### Aparelhagem e eléctrodos

As determinações voltamétricas foram realizadas num equipamento electroquímico de marca Eco Chemie Utrecht, modelo Autolab associado a um potenciostato PSTAT 10 em conjugação com um módulo Metrohm 663 VA que inclui um sistema de 3 eléctrodos: HMDE como eléctrodo de trabalho, eléctrodo saturado de AgCl/Ag como referência e uma barra de carbono vítreo como eléctrodo auxiliar.

### Preparação das amostras

As formulações farmacêuticas de ácido fólico ensaiadas foram: Folicil ( $10 \text{ mg}$ ), Folifer ( $1 \text{ mg} +$  sulfato de ferro II), Ferrum Fol Hausmann ( $0,350 \text{ mg} +$  complexo de ferro), Varimine Stress ( $4 \text{ mg} +$  vitaminas + sais) e Multidapta N ( $0,4 \text{ mg} +$  vitaminas + sais) formulações que estão comercialmente disponíveis sob a forma de comprimidos. Uma fracção do pó resultante da pulverização de 3 comprimidos de cada uma das formulações foi agitada em banho de ultra-sons com  $50 \text{ ml}$  de hidróxido de sódio  $0,1\text{M}$  durante 15 minutos a  $60^\circ \text{ C}$ . Após arrefecimento foi completado o volume de  $100,0 \text{ ml}$  com água. Nos medicamentos Folifer e Varimine Stress o pó foi, também, agitado com  $5 \text{ ml}$  de EDTA  $0,1\text{M}$  adicionados aos  $50 \text{ ml}$  de NaOH  $0,1\text{M}$ .

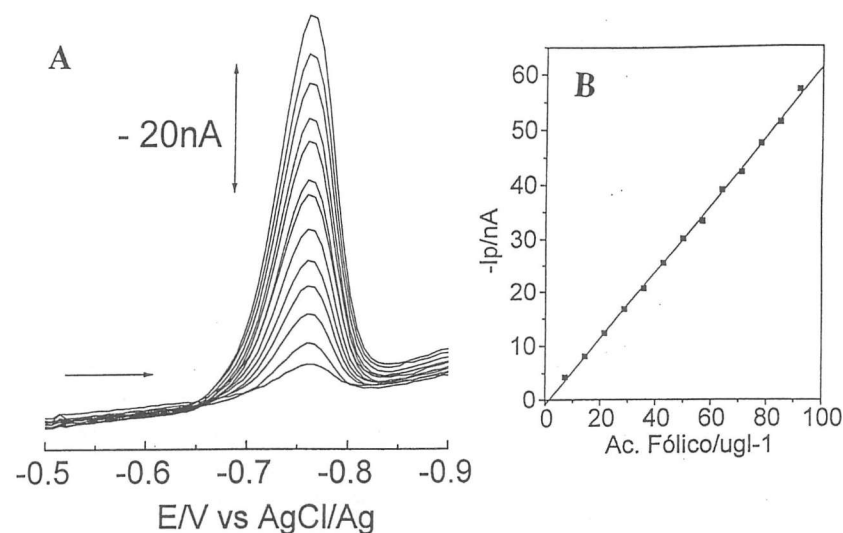
Uma toma ( $0,10 \text{ ml}$ ) da solução alcalina que constitui a amostra foi transferida para o vaso de electrólise contendo  $25,0 \text{ ml}$  de tampão de ácido bórico/ hidróxido de sódio  $0,05\text{M}$  a pH  $9,75$ , foi traçado o voltamograma e medida a intensidade da corrente de pico do ácido fólico a cerca de  $-0,76\text{V}$ . Aplicando o método de adição do padrão foi adicionada uma toma ao redor de  $0,050 \text{ ml}$ , de uma solução padrão de concentração adequada para que, em 2 ou 3 adições o pico inicial se torne aproximadamente 2,5 vezes maior.

## RESULTADOS E SUA DISCUSSÃO

Foi estudado o comportamento electroquímico do ácido fólico, em meio alcalino, por voltametria adsortiva de remoção com onda quadrada em HMDE. Após optimizados os parâmetros experimentais foi estabelecida uma metodologia analítica que foi aplicada à determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas correntes no mercado português.

### Comportamento electroquímico do ácido fólico

O ácido fólico é reduzido no eléctrodo de mercúrio, em meio alcalino, segundo um processo reversível que envolve 2 electrões e 2 prótons [6], processo que é acompanhado por fenómenos de adsorção [8]. Em tampão de ácido bórico/ hidróxido de sódio de pH  $9,75$  com varrimento de potencial desde  $-0,50$  até  $-0,90\text{V}$ , voltamogramas de onda quadrada de soluções de ácido fólico apresentam um pico simétrico, muito bem definido, a cerca de  $-0,76\text{V}$  vs. AgCl/Ag, cuja altura aumenta linearmente com o tempo de adsorção mas é independente do correspondente potencial. A melhor definição do pico ocorreu com a amplitude de impulso de  $40\text{mV}$ , a frequência de  $50\text{Hz}$  e o passo de potencial de  $7\text{mV}$ . Nestas condições e com uma acumulação de  $10\text{s}$  ao potencial inicial ( $-0,50\text{V}$ ) com agitação da solução e posterior período de  $5\text{s}$  de repouso, observou-se uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração, no intervalo de  $7,19$  a  $91,7 \mu\text{g l}^{-1}$  (Figura).



**Figura - A-** Voltamogramas de onda quadrada de soluções de ácido fólico em tampão de ácido bórico/hidróxido de sódio 0,05M a pH 9,75 no intervalo de concentrações: 7,19 a 91,7 $\mu$ g $l^{-1}$ . Potencial de deposição = potencial inicial = -0,50V; amplitude de impulso = 40mV; frequência = 50Hz; passo de potencial = 7mV e tempo de adsorção = 10 segundos. **B-** Gráfico de corrente de pico em função da concentração de ácido fólico dos voltamogramas ilustrados em A.

*Doseamento do ácido fólico em formulações farmacêuticas*

O processo de preparação da amostra e a aplicação da técnica referida conduziram a um bom resultado no ensaio do Folicil, medicamento que contém apenas ácido fólico na sua composição.

Na formulação Folifer, que contém sulfato de ferro (II) associado ao ácido fólico, a amostra apresentou um precipitado que arrastou analito e falseou o resultado. A formação desse precipitado foi impedida por adição de 5% de EDTA 0,1 M na preparação da amostra.

No Ferrum Fol o ácido fólico está associado a um complexo de ferro, complexo que não provocou qualquer precipitação quando da preparação da amostra mas que originou, no voltamograma, um novo pico, muito acentuado, a potencial mais positivo do que o pico correspondente à redução do ácido fólico e com evidentes características de adsorção competitiva. O seu efeito foi minimizado por redução do volume da alíquota da amostra a ensaiar e por deslocamento do potencial de acumulação para um valor mais negativo (-0,75V), próximo do potencial de pico do ácido fólico e aumento do tempo de acumulação para 30s.

Também na análise do medicamento Varimine Stress houve necessidade de adicionar 5% de EDTA 0,1 M no processo de preparação da amostra. A múltipla composição desta formulação

originou, no voltamograma inicial um pico, acentuado, a potencial mais negativo que o pico do ácido fólico mas revelando uma certa dependência deste último. O voltamograma final (com a amostra preparada em meio de EDTA) mostrou o pico do ácido fólico mais elevado e o outro pico menor.

A formulação Multidapta N que possui 26 constituintes entre vitaminas e oligoelementos, possibilitou a obtenção de um resultado satisfatório sem alteração na metodologia geral de preparação da amostra, apenas com acumulação durante 30s ao potencial de -0,75V e início do varrimento a -0,50V.

Na Tabela apresentam-se os resultados das determinações bem como as respectivas razões de recuperação (R.R.) que foram efectuadas em amostras preparadas com uma alíquota do pó dos comprimidos adicionada de ácido fólico em pó.

**TABELA**

Resultados obtidos na determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas

Formulação <sup>a)</sup>	V.D. <sup>b)</sup> (mg/comp.)	V.E. <sup>c)</sup> (mg/comp.)	R.R. <sup>d)</sup> (%)
Folicil	10,0	9,92 ± 0,41	99,7
Folifer	1,00	1,01 ± 0,03	99,4
Ferrum Fol	0,350	0,351 ± 0,02	98,5
Varimine Stress	4,00	4,12 ± 0,48	96,0
Multidapta N	0,400	0,366 ± 0,049	97,9

a) Designação corrente no mercado português; b) Conteúdo em ácido fólico previsto pelo laboratório farmacêutico; c) Valor médio de 5 determinações e respectivo desvio padrão; d) Razão de recuperação.

**CONCLUSÕES**

A técnica de voltametria adsortiva de remoção com onda quadrada em HMDE revela-se adequada à determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas complexas, pela sua selectividade, rapidez e simplicidade de execução. Aplicada a formulações, de diferente composição, correntes no mercado português, conduziu a resultados satisfatórios com razões de recuperação situadas entre 96,0 e 99,7%. Em todos os casos os valores obtidos estão incluídos nos limites aconselháveis pela legislação em vigor no país.

*Agradecimentos*

Os autores agradecem ao Programa Praxis XXI (2/2.1/SAU/1190/95) e Feder o apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS:

- [1] T. Brody, B. Shane e E.L.R. Stokstad, em L.J. Machlin (Ed), Handbook of Vitamins Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects, Marcel Dekker, New York, 1984, pp 459.
- [2] P.A. Mayes, em R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes e V.W. Rodwell (Eds), Harper's Biochemistry 22ª edição, Appleton and Lange, Norwalk, Cn, 1990, pp 547.
- [3] D. A. Nelson e F. R. Davey em J. B. Henry (Ed) Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17ª edição, N. B. Saunders, 1984, pp 661.
- [4] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos e E. A. G. Zagato, *Anal. Chim. Acta* (in press).
- [5] C. Grantham, *Analysis Europa* Julho/Agosto (1996) 52.
- [6] E. Jacobsen e M.W. Bjmsen, *Anal. Chim. Acta*, 96 (1978) 345.
- [7] J. Ballantine e A. D. Woolfs, *J. Pharm. Pharmacol.*, 32 (1980) 353.
- [8] J.M. Fernandez, A. Costa, A.J. Miranda e P. Tuñón, *J. Electroanal. Chem.*, 225 (1987) 241.
- [9] J.M. Fernandez, A. Costa, A. Miranda e P. Tuñón, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6 (1988) 743.
- [10] D-B. Luo, *Anal. Chim. Acta*, 189 (1986) 277.
- [11] W. Szezepaniak e M. Ren, *Electroanalysis*, 6 (1994) 505.
- [12] A.C. Le Gall e C.M.G. Van der Berg, *Anal. Chim. Acta*, 282 (1993) 459.
- [13] M.J.F. Villamil, A.J. Ordieres, A. Garcia e P. Tuñón, *Anal. Chim. Acta*, 273 (1993) 377.
- [14] S. Çakir, E. Ertürk e O. Çakir, *Portugaliae Electrochim. Acta*, 15 (1997) 139.

## POLAROGRAPHIC DETERMINATION OF $\alpha$ -KETOACIDS IN WINE, AFTER DERIVATIZATION WITH o-PHENYLENEDIAMINE

J. A. Rodrigues, P. G. Rodrigues and A. A. Barros

*Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto, Departamento de Química da Faculdade de Ciências U. P., Rua do Campo Alegre, 687, 4150 PORTO - Portugal*

### Abstract

A method for the determination of  $\alpha$ -ketoacids was developed, involving derivatization with o-phenylenediamine and the differential-pulse polarographic determination of the resulting hydroxyquinoxalines. The method has a detection limit of about  $5 \times 10^{-7}$  M, a concentration that is lower than the usual concentrations of the  $\alpha$ -ketoacids in fermented products; it is also possible to distinguish glyoxylic acid from pyruvic acid and  $\alpha$ -ketoglutaric acid, with no need for a separation procedure.

Using the method developed in the direct analysis of a white wine, practically no glyoxylic was found and a total concentration of  $3 \times 10^{-5}$  M was obtained for the whole of pyruvic acid and  $\alpha$ -ketoglutaric acid.

### Introduction

$\alpha$ -ketoacids are acids that have a carbonyl group adjacent to a carboxylic group.  $\alpha$ -ketoacids exist as intermediary compounds in many essential metabolic procedures, like glycolysis, the Krebs cycle, transaminations involved in the metabolism of all the aminoacids and several other metabolic ways<sup>1</sup>.

In clinical analysis, the determination of  $\alpha$ -ketoacids is used in the investigation and in the diagnosis of deficiencies in enzymes, specially those involved in the metabolism of aminoacids<sup>2</sup>. The number of applications in food analysis is limited; in wines, for instance, the presence of  $\alpha$ -ketoacids can interfere with the operation of adding sulphite due to their tendency to produce stable compounds with sulphite ion<sup>3</sup>, with a consequent decrease in the concentration of free sulphite.

The amount and type of  $\alpha$ -ketoacids present in wine change during the operation of fermentation, depending on some vinification conditions, as temperature, aerating and pH<sup>4</sup>. Another important aspect is the possibility of correlating the maturing of grapes at the harvest with the levels of pyruvic acid and  $\alpha$ -ketoglutaric acid found during the fermentation. In fact, rotten grapes have a lowering effect on the level of thiamine and, as this compound is a vital co-factor for the normal activity of the enzymes pyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutaric dehydrogenase, the activity of these enzymes is lowered, with the consequent accumulation of the respective  $\alpha$ -ketoacids.

Generally, the methodologies used in the determination  $\alpha$ -ketoacids are different in clinic analysis and in food analysis. In the analytical method more frequently used in clinical analysis the  $\alpha$ -ketoacids are derivatized with o-phenylenediamine (OPDA) and the hydroxyquinoxalines formed are separated and determined using HPLC with fluorimetric detection<sup>5</sup>. This procedure is quite appropriate, as the derivatization reaction is selective for  $\alpha$ -ketoacids and can be performed in aqueous solution at room temperature. In the case of food analysis, as it is generally sufficient to know the overall amount of the main  $\alpha$ -ketoacids, the use of enzymatic methods is preferably used<sup>4</sup>.

In this work, a polarographic method for the determination of  $\alpha$ -ketoacids was developed, also involving a previous derivatization with OPDA. Studies were conducted using pyruvic,  $\alpha$ -ketoglutaric and glyoxylic acid, as in the case of foods these are the more important  $\alpha$ -ketoacids<sup>3</sup>.