

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

***CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO ÁCIDO FÓLICO EM  
ALIMENTOS ENRIQUECIDOS***

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Juliana Azevedo Lima, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de março de 2001.

Campinas, 22 de março de 2001

  
Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy  
Presidente da Banca

***Juliana Azevedo Lima***  
Bacharel em Química

***Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy***  
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas –SP  
2001

i



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	L628c
V.	Ex.
TOMBO BC/	44605
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/05/01
N.º CPD	

CM00156290-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

L628c Lima, Juliana Azevedo  
 Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos / Juliana Azevedo Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 20001.

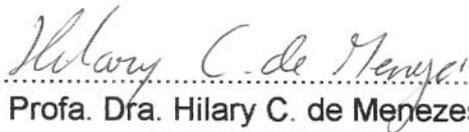
Orientador: Helena Teixeira Godoy  
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Ácido fólico. 2.Estabilidade. 3.Cromatografia líquida de alta eficiência. 4.Vitaminas – Análise. I.Godoy, Helena Teixeira. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

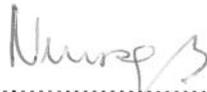
## BANCA EXAMINADORA



.....  
Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy  
FEA/UNICAMP  
Presidente



.....  
Prof. Dra. Hilary C. de Menezes  
FEA/UNICAMP  
Membro



.....  
Prof. Dra. Neura Bragagnolo  
FEA/UNICAMP  
Membro

.....  
Prof. Dra. Heloísa M. Cecchi  
FEA/UNICAMP  
Membro

Campinas, 2000.

200108204

*Dedico e agradeço especialmente*

*à meus pais Miguel e Cleusa, meu namorado Wandinho,  
Marcio, Dri, Prfa. Helena  
e a meus amigos Rodrigo, Claudinha e Marcela  
por serem tão especiais.*

*“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos”*

*Lao Tse*

*São tão simples, que cativam,  
São tão dignos, que amam, compreendem e perdoam,  
São tão irmãos, que partilham,  
São tão raros, que se consagram,  
São tão frágeis, que fortalecem,  
São tão importantes, que não se esquecem,  
São tão amigos, que se eternizam...*

*Autor desconhecido.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a *Deus*, pela vida e por ter permitido que este trabalho fosse realizado.

À minha família *Miguel, Cleusa, Marcio, Adriana* e ao meu namorado *Wandinho* por todo apoio, amor, carinho e paciência, sempre....

À Profa. *Helena*, por toda atenção, disposição, amizade e por se mostrar um exemplo a ser seguido.

Aos Professores *Paulo César Vieira* e *João Batista Fernandes*, pelas oportunidades no início da minha carreira científica.

Ao meu "amigo" *Rodrigo*, que apesar de muitas vezes ter tumultuado, esteve presente em todas as etapas da realização desse trabalho, obrigada por tudo.

Às companheiras *Claudinha* e *Marcela*, minhas grandes amigas, obrigada pela paciência, companheirismo e apoio. Ah, agradeço também à agregada *Patinha*, por ser uma praguinha que eu gosto muito.

À minha afilhada e irmã mais velha *Teca*, pela boa vontade em me auxiliar, pelos conselhos e pela grande amizade.

Ao *Jesuí* pelas idéias mirabolantes e brincadeiras e às amigas *Elenice, Gisele* e *Fabiana*, pelo bom humor, pela companhia no laboratório, além de toda ajuda.

Ao *Cadu, Marcelo, Lucilene, Luciana* e *Simara*, muito obrigada.

Aos amigos *Cris* e *Jorge*, por toda atenção.

À Profa. *Maria Regina*, obrigada por tudo.

Ao *Cosme*, por sempre estar disposto a ajudar e por toda atenção.

À *Jardete, Marquinho* e *Marcão*, pela atenção.

Aos membros da *Banca Examinadora*, pelas sugestões e contribuições apresentadas.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao ITAL, *Sebastião* e *Marcio* da TetraPak, pela oportunidade da realização do ensaio de processamento de leite.

À M. CASSAB Comércio e Indústria LTDA., pela concessão do padrão de ácido fólico.

A todos que ajudaram diretamente ou indiretamente na realização desse trabalho.

Obrigada

*Juliana*

## RESUMO

Mesmo com o grande impacto causado pelos resultados das novas pesquisas a respeito das possíveis ações benéficas do ácido fólico à saúde, ainda são muito poucos os dados a respeito dos reais teores de ácido fólico, presente nos alimentos, principalmente dados analíticos sobre alimentos brasileiros, como também dados de estabilidade. A população está, portanto, exposta ao consumo de alimentos de qualidade não controlada, podendo ingerir quantidades não adequadas, às necessidades. Na tentativa de melhorar esse quadro é que este trabalho foi conduzido. Utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de ácido fólico segundo CATHARINO e GODOY (2000). O método foi aplicado em amostras de leite esterilizado, produzido em planta piloto e também adquirido no mercado, leite em pó, bebida láctea achocolatada pronta para consumo, margarina, farinha e pão. Pequenas adaptações na metodologia foram feitas, principalmente na etapa de extração, para amostras de farinha e pão. A aplicação da metodologia para margarina, assim como as alterações no método para as amostras de farinha e pão foram validadas em relação à recuperação, repetibilidade, limites de detecção e quantificação obtendo valores em torno de 96% de recuperação, coeficientes de variação inferiores a 1,5% nos ensaios de repetibilidade e 1,3ng/mL e 2,6ng/mL os limites de detecção e quantificação determinados, respectivamente. Foram analisadas 4 amostras, em 3 diferentes lotes, de leites fluídos adquiridos no mercado, com datas bem próximas ao processamento, e o valor do ácido fólico encontrado estava abaixo do declarado no rótulo do produto, para 50% das amostras analisadas. Após 3 meses, ainda dentro do prazo de validade, a perda de ácido fólico chegou a 20%. Nos 4 ensaios de esterilização do leite, realizado em planta piloto, nos processos de adição e homogeneização a perda de ácido fólico ficou em torno de 54%, enquanto que o processo de esterilização foi responsável por uma perda de apenas 10%. Durante o período de 90 dias a taxa de ácido fólico perdida foi de 16%. Esse mesmo leite também foi submetido ao processo de fervura, em 3 testes para cada ensaio, onde a vitamina mostrou-se bastante resistente, com conservação de aproximadamente 99%. Para leites em pó e bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo,

também foram analisadas 4 amostras, em 3 diferentes lotes, para cada produto adquirido no mercado, com datas bem próximas ao processamento. Os teores de ácido fólico encontrados estavam, praticamente iguais aos valores declarados pelos fabricantes de leites em pó, no entanto, após o período de 1 ano, em média, de estocagem, ainda dentro do prazo de validade, a perda de ácido fólico chegou a 60%. Para as bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo os valores referentes à concentração de ácido fólico, estavam no limite especificado pelo fabricante, apenas em 50% das amostras. Após 4 meses de estocagem os teores de ácido fólico diminuíram em cerca de 29%. A análise de 3 lotes de margarina enriquecida mostrou, que nos primeiros 30 dias após a fabricação, os teores de ácido fólico encontrados estavam bem próximos aos valores especificados pelo produtor, porém, após o período de 4 meses de estocagem, apenas 46% da vitamina ainda foi encontrada no produto. O ácido fólico mostrou-se bastante estável após o processo de adição e homogeneização em farinhas, entretanto, observou-se uma perda de 20% no teor vitamínico após o assamento de pães fabricados com a farinha enriquecida. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a necessidade de um melhor controle nas taxas de enriquecimento, como também mais estudos de estabilidade do ácido fólico quando adicionado a diferentes matrizes.

## SUMMARY

Despite the great impact of the results of new research in to possible beneficial effects of folic acid on the health, there are still not enough data about the content of folic acid in enriched food and no studies on its stability, chiefly in Brazilian foods. Therefore people are exposed to the consumption of food of uncontrolled quality, ingesting inadequate quantities for their needs. The aim of this work was to improve this picture. High pressure liquid chromatography (HPLC) was used to determine folic acid according to CATHARINO and GODOY (2000), in samples of sterilized milk produced in a pilot plant and also in samples purchased on the market, in powdered milk, ready to use milk chocolate beverage, margarine, flour and bread. Some modifications in the methodology were made, mainly in the extraction step, for the samples of flour and bread. These alterations were validated with respect to recover, and values of from 92 to 98% were obtained, repeatability was very well. The limits of detection and quantification being respectively 1,3ng/mL and 2,6ng/mL. Four sample were analysed in 3 different lots of fluid milk purchased on the market, and the values of folic acid were found to be below the values declared on the label of the products, in 50% of the samples. After 3 months, the loss of folic acid approached 20%. In all the 4 experiments with milk sterilization made in the pilot plant, the process of addition and homogenization resulted in a loss of folic acid of 54%, while the process of sterilization was responsible for only 10%. In a 90-day period the loss of folic acid was 16%. The same milk samples were submitted to a boiling process and the vitamin was show to be resistant, with a conservation of about 99%. As for powdered milk and ready to use milk chocolate beverage, 4 samples of each were also analysed, in 3 different lots, for each product purchased on the market. The content of folic acid found was practically equal that declared by the manufacturers for the powdered milk. Nevertheless, after 1 year of storage, the loss of folic acid reached 60%. Only 50% of the milky beverages presented folic acid contents in accordance with those specified by the manufacturer. After 4 months storage the contents had decreased by about 29%. The analysis of the 3 lots of enriched

margarine showed that in the first 30 days after fabrication, the levels of folic acid fell a little bit below those specified by the producers, but after 4 months storage only 46% of the vitamin was still found. In the evaluation of the stability of folic acid during the process of baking bread manufactured with enriched flour, the loss was only 20% of the vitamin content. The results obtained in this work show the need for strict control of enrichment rates, as also more studies on the stability of folic acid when added to different matrixes.

## ÍNDICE

<b>Introdução</b> .....	1
Referências Bibliográficas.....	3
<b>CAPÍTULO 1 – ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS: IMPORTÂNCIA E ESTABILIDADE</b> .....	5
Resumo.....	6
Summary.....	7
Introdução.....	8
Metabolismo, Funções Bioquímicas e Biodisponibilidade.....	9
Fontes de Folatos.....	13
Necessidades Nutricionais.....	14
Toxidez.....	16
Enriquecimento.....	17
Estabilidade.....	18
Referências Bibliográficas.....	26
<b>CAPÍTULO 2 – ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS – ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA</b> .....	31
Resumo.....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Materiais e Método.....	36
Materiais.....	36
Reagentes.....	36
Equipamento.....	36
Método.....	37
Resultados e Discussão.....	38
Conclusões.....	46
Referências Bibliográficas.....	47
<b>CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ESTERILIZADOS ENRIQUECIDOS</b> .....	49
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e Método.....	55
Material.....	55
Reagentes.....	57
Equipamento.....	57
Método.....	58
Resultados e Discussão.....	59
Análise da estabilidade do ácido fólico durante o processo de esterilização de leites.....	60

Estudo de vida de prateleira.....	61
Estudo da estabilidade do ácido fólico após aquecimento até “fervura” do leite.....	63
Conclusões.....	64
Referências Bibliográficas.....	64

<b>CAPÍTULO 4 – VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO EM MARGARINA, FARINHA E PÃO ENRIQUECIDOS.....</b>	<b>67</b>
Resumo.....	68
Abstract.....	69
Introdução.....	70
Materiais e Método.....	73
Materiais.....	73
Margarina.....	73
Farinha e pão.....	74
Reagentes.....	74
Equipamento.....	74
Método.....	74
Margarina.....	74
Farinha e Pão.....	75
Validação da Metodologia.....	76
Recuperação de padrões.....	76
Repetibilidade.....	76
Limites de detecção e quantificação.....	77
Resultados e Discussão.....	77
Validação da Metodologia.....	77
Etapa analítica.....	79
Margarina.....	81
Farinha e Pão.....	82
Conclusões.....	84
Referências Bibliográficas.....	84
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>SUGESTÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## INTRODUÇÃO

Grande parte dos nutrientes necessários ao bom funcionamento dos organismos vivos são obtidos através dos alimentos. Desse quadro geral fazem parte, do grupo dos micronutrientes, as vitaminas, substâncias orgânicas indispensáveis à manutenção das funções metabólicas do organismo e da saúde. Sua inclusão na dieta é necessária por não serem sintetizadas pelo homem. A ausência sistemática na dieta resulta, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento deficientes e outras perturbações orgânicas, configurando-se um quadro sintomatológico característico da carência (GOODMAN e GILMAN, 1991; LEHNINGER, 1993; BRODY, 1994).

Tradicionalmente, as vitaminas são classificadas segundo a diferença de solubilidade, em lipossolúveis, quando solúveis em solventes orgânicos, e em hidrossolúveis, quando solúveis em água. Esta classificação é útil, uma vez que as identifica de acordo com algumas de suas propriedades fisiológicas e físico-químicas comuns (LEHNINGER, 1993).

A estreita relação entre dieta e saúde fez com que aumentasse a preocupação dos consumidores em ingerir alimentos nutritivos ou de alta qualidade, como, por exemplo, os enriquecidos. No entanto, a adição desses micronutrientes tem sido utilizada em estratégias de "marketing". As vitaminas do complexo B, notadamente, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, PP e biotina, têm despertado, na indústria, interesse especial, na linha de alimentos enriquecidos e, mais recentemente, a vitamina B<sub>12</sub> e principalmente o ácido fólico pelas novas descobertas sobre as ações benéficas à saúde do homem (BRODY, 1991; CZEIZE e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; ULENE e ULENE, 1995; OAKLEY et al., 1995; CRANE et al., 1995; DALY et al., 1997; DEVLIN, 1997; PARODI, 1997; RANG et al., 1997; DIERKS et al, 1998; MALINOW et al., 1998; MOSHFEGH et al., 1998).

O ácido fólico, uma vitamina quase desconhecida da população, também chamado de vitamina B<sub>9</sub>, B<sub>11</sub>, B<sub>c</sub> e M, apresenta funções pouco conhecidas. Novas descobertas sobre a ação do ácido fólico e da importância da sua presença na dieta e no organismo foram feitas nesta última década

(KATZUNG, 1994). Os folatos participam da formação de produtos intermediários do metabolismo, estão envolvidos na síntese de purinas, dTMP (timidilato), síntese de colina, serina e glicina. O ácido fólico também é necessário para a produção normal das hemácias e, juntamente com a vitamina B<sub>12</sub>, para a conversão de homocisteína a metionina (DEVLIN, 1997). Esta última reação é de extrema importância para o sistema cardiovascular, dado que a hiperhomocisteinemia causa lesões nos vasos sanguíneos, podendo, levar a arteroesclerose (PARODI, 1997; DIERKS et al, 1998).

Existem ainda pesquisas que apontam a relação entre a deficiência de congêneres do ácido fólico com câncer de cólon, leucemia, doenças mieloproliferativas, certas enfermidades crônicas da pele, além de outras doenças debilitantes crônicas. (BRODY, 1991; CZEIZE e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; ULENE, ULENE, 1995; OAKLEY et al.,1995; CRANE et al., 1995; DALY et al., 1997; DEVLIN, 1997; RANG et al., 1997; MAILNOW et al., 1998; MOSHFEGH et al., 1998).

O ácido fólico está distribuído em muitos alimentos, principalmente na forma de folatos. As verduras frescas, fígados, leveduras e algumas frutas são as principais fontes. Porém, há muitos fatores que podem levar à deficiência dessa vitamina, incluindo a absorção e metabolismo deficientes, demanda aumentada e, principalmente, a ingestão inadequada (DEVLIN, 1997).

Com a finalidade de tentar amenizar os problemas causados pela ingestão insuficiente dessa vitamina, além de outros nutrientes, e aumentar a qualidade dos alimentos, garantindo a ingestão de ácido fólico nas quantidades recomendadas (NAS-NRC, 1989) muitas indústrias estão efetuando o processo de enriquecimento de seus produtos (AUGUSTIN et al., 1982; GASSIN, 1991; RANUM, 1991; WALTER, 1994). Entre os alimentos escolhidos para o enriquecimento, de maneira geral, leites e cereais são os veículos mais comumente utilizados, além de outros produtos lácteos e farinhas. Porém, o controle desses produtos tem sido dificultado pela ausência de laboratórios preparados para a realização das análises, além da carência de metodologias.

Mesmo sendo o ácido fólico a forma, entre os folatos, que apresenta maior estabilidade às condições de processamento e estocagem (GUBLER, 1991), alguns poucos trabalhos na literatura mostram perdas significativas (HURDLE et al.,1968; DONG et al.,1975; GREGORY,1989; FRANCO, 1992; KATZUNG,1994; ANTUNES,1994;).

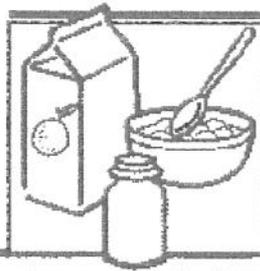
Estudos sobre o comportamento do ácido fólico frente aos diversos processos industriais e da sua estabilidade nas matrizes adicionadas durante o armazenamento são muito importantes, tanto para oferecer ao consumidor um alimento seguro e nutritivo, como para orientar o produtor na sobredosagem necessária, para a produção, além das melhores condições de embalagem, transporte e armazenamento (CARVALHO, 1994).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi a determinação de ácido fólico em alguns alimentos enriquecidos, utilizando a metodologia desenvolvida por CATHARINO e GODOY (2000), além de contribuir com dados sobre a estabilidade dessa vitamina em processamentos térmicos e na estocagem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, A. J. Perdas de Nutrientes no Processamento de Alimentos. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 8-14, 1994.
- AUGUSTIN, J., TASSINARI, P.D, FELLMAN, J.K., COLE, C. L. B vitamin content of selected cereals and baked products. **Cereal Foods World**, 27 (4): 159-161, 1982.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins**. 2ed. rev. and Expanded. New York: Marcel Decker, 1991.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. United Kingdom.Honolulu, Hawai: Academic Press Limited, 1994.
- CARVALHO, P.R.N. Enriquecimento de Alimentos. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1-7, 1994.
- CATHARINO, R.R., GODOY, H. T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos–UNICAMP, 2000.
- CRANE, N.T., WILSON, D.B., COOK, D.A., LEWIS, C.J., YETLEY, E.A., RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal of Public Health**, 85 (5): 660-666, 1995.
- CZEIZE, A.E., DUDAS, I.Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **New England Journal of Medicine**, 327 (226): 1832-1835, 1992.

- DALY S., MILLS, J.R., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J, KIRKE, P.N, WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**. **350** (9092): 1666-1669, 1997.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
- DIERKES, J., KROESEN, M., PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> Supplementatio and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International Journal of Vitamin and Nutrient Research**, **68**: 98-103, 1998.
- DONG, F.M., OACE, S.M. Folate concentration and pattern in bovine milk, **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, **23**(3): 534, 1975.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- GASSIN, A.L. Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. **Cah. Nutrition Diétics**, **26** (1): 85-88, 1991.
- GOODMAN, L. S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1991.
- GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates . **Advanced in Food and Nutritional Research**, **33**: 1-101, 1989.
- GUBLER, A.L. Thiamin. In: **Handbook of vitamins**. 2ed. Marcel Dekker, Inc, New York, 595, 199.
- HURDLE, A.D. F., BARTON, D., SEARLES, I. H. A method for measuring folate in foods and its applications to a hospital diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, **21** : 1202-1207, 1968.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- LENHINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 2ed. Worth Publishers, 1993.
- MALINOW, M. R., DUELL, P. B., HESS, D. L., ANDERSON, P. H. KRUGER, W. D., PHILLIPSON, B. E., GLUCKMAN, R.A., BLOCK, P.C., UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by Breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary disease. **New England Journal of Medicine**, **338** (15): 1009-1015, 1998.
- MOSHFEGH, A.J., COOK, A.J., HO, J.M., FRIDAY, J.E. Folate intakes. **Food surveys Research Group**. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- NAS-NCR .National Research Council, National Academy of Science **Recommended Dietary Allowances**. 10ed. National Academic Press, Washington, 283p, 1989.
- OAKLEY, G. P. Jr., ERICKSON, J. D., ADAMS, M. J. Urgent need to increase folic acid consumption. **Journal of American Medical Association**, **274** (21): 1717-1718, 1995.
- PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. **The Australian Journal of Dairy Technology**, **52**: 109-118, october, 1997.
- RANG, H.P., RITTER, J .M., DALE, M. M. **Farmacologia**. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
- RANUM, P. Cereal enrichment. In: **Handbook of Cereals Science and Technology**. Ed. Lowrenz, New York, 882, 1991.
- ULENE, A., ULENE, V. **Vitaminas**. 1ed. Blumenal:EKO, 1995.
- WALTER, P. Vitamin requeriments and enrichment of foods. **Food Chemistry**, **49**: 113-117, 1994.



# FOLIC ACID NOW

## CAPÍTULO 1

### ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS: IMPORTÂNCIA E ESTABILIDADE

Trabalho a ser submetido ao Journal Brazilian Food Science and Technology

# ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS: IMPORTÂNCIA E ESTABILIDADE

Lima, J.A. e Godoy, H.T.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
C.P. 6121 CEP 13083-970  
juliana.lima@ondefor.com

## RESUMO

Até pouco tempo atrás, os folatos, termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente mas também com atividade semelhante a do ácido fólico, tinham apenas algumas poucas funções elucidadas em relação ao organismo humano. Atualmente, sabe-se que os folatos estão envolvidos em inúmeras reações metabólicas e são extremamente importantes para a manutenção da saúde. A carência dessa vitamina, pertencente ao grupo das vitaminas hidrossolúveis, vem sendo relacionada a uma série de doenças graves como a anemia megaloblástica, o câncer, problemas cardíacos e às malformações congênitas, entre outras. Mesmo com toda preocupação que o ser humano hoje tem em procurar se alimentar de forma mais balanceada, as quantidades diárias recomendadas de folatos necessária para o bom funcionamento do organismo, muitas vezes, não são atingidas. Muitos dos hábitos alimentares foram modificados em virtude do desenvolvimento de novos produtos, aliado ao forte apelo de “marketing” da indústria de alimentos, e do ritmo de vida que, principalmente, as grandes cidades impõem às pessoas, levando os indivíduos a ingerir cada vez mais alimentos industrializados. Os processos utilizados na industrialização dos alimentos promovem sempre, em maior ou menor escala, alterações na composição dos mesmos, podendo levar à perda de nutrientes, incluindo os folatos. Fatores como luz, calor, oxigênio, determinados pHs, atividade de água, entre outros, contribuem para a perda desses compostos, levando a necessidade de adicioná-los ao final do processamento, garantindo ou melhorando a qualidade nutricional do alimento. Estudos sobre o comportamento do ácido fólico adicionado nos processos de enriquecimento, frente aos diferentes processamentos e período de estocagem,

mostram que muitos cuidados devem ser tomados na tentativa de preservação da vitamina, a fim de se obter, após o processamento e até o prazo final de validade, um produto de boa qualidade e com características desejadas.

## **SUMMARY**

Not long ago, the functions of folates, a general term used for a group of compounds with structures and activities similar to those of folic acid, were little understood with respect to the human body. Nowadays, we know that folates are involved in several metabolic reactions and are most important for health maintenance. The lack of this vitamin which belongs to the water-soluble group of vitamins, has been associated with a series of serious diseases such megaloblaster, cancer, cardiac disease and congenital malformations, amongst others. Despite all the concern human beings currently show with respect to a balanced diet, the recommended daily quantities of folate necessary for good performance of the organism, are not achieved. Many feeding habits have been modified due to the appearance of new products, the strong call of industrial marketing and the pace of life, principally in big cities which leads people to eat more and more industrialized food. The industrial processing of food always results in some alterations to their own composition to a larger or smaller extent and this can cause a lack of nutrients, including folates. Some factors like light, heat, oxygen, certain pH values, and water activity, to name a few, contribute to the loss of these compounds, and there is a need to add them back at the end of processing, to guarantee or improve the nutritional quality of the food. Studies on the behavior of folic acid, added for enrichment proposes during different types of processing and storage, have shown the need to pay attention to efforts to preserve the vitamin, so as to obtain after processing and up to the expiration date, a product of good quality and the desired characteristics.

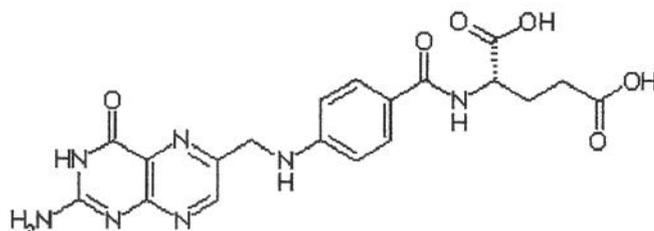
## INTRODUÇÃO

O pouco tempo disponível para o preparo doméstico dos alimentos, vem alterando o hábito alimentar da população mundial que recorre, cada vez mais, aos produtos industrializados. Para compensar as perdas no processamento ou mesmo com o intuito de reforçar o conteúdo nutritivo dos mesmos, na tentativa de solucionar o problema da ingestão insuficiente de nutrientes essenciais, vem sendo feita a adição de vitaminas, aminoácidos e minerais. O ácido fólico é uma das vitaminas que tem sido adicionadas a alguns tipos de alimentos, dentre eles leites em pó e esterilizados, bebidas lácteas achocolatadas, margarina, além de cereais e farinhas, entre outros.

A história da descoberta do ácido fólico teve início em 1935, quando começaram a ser descritos fatores responsáveis por uma série de distúrbios, decorrentes da deficiência nutricional de um composto pertencente a família do ácido pteroilglutâmico, cujo o protótipo do grupo é o ácido fólico. O fator responsável pela deficiência nutricional em macacos, foi denominado vitamina "M". Em 1939, o composto cuja carência ocasionava anemia em galinhas foi chamado de "vitamina B". Logo em seguida, em 1941, descobriu-se uma substância necessária para a nutrição da bactéria *Lactobacillus casei*, denominada como "fator L. casei" e, no mesmo ano, foi isolado um composto cristalino do espinafre, que recebeu o nome de ácido fólico (folium significa folha) (KATZUNG, 1994, LENHINGER et al., 1993). A partir daí, iniciou-se a pesquisa a respeito da importância e das reais funções do ácido fólico e dos folatos. Em 1945, SPIES empregou a folacina no tratamento de casos de anemia macrocítica em gestantes, tendo essa substância se mostrado efetiva. No mesmo ano, AUGIER sintetizou o ácido fólico pela primeira vez (GOODMAN e GILMAN, 1991).

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), (**Figura 1**) também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina B<sub>9</sub> e vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico (DEVLIN, 1997). Folatos é um termo geral que se

refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico (BRUBACKER et al., 1985; KEAGY, 1985; BÜHLER, 1988; BRODY, 1991; ZANINI, OGA, 1994; BRODY, 1994; DALY et al., 1997).



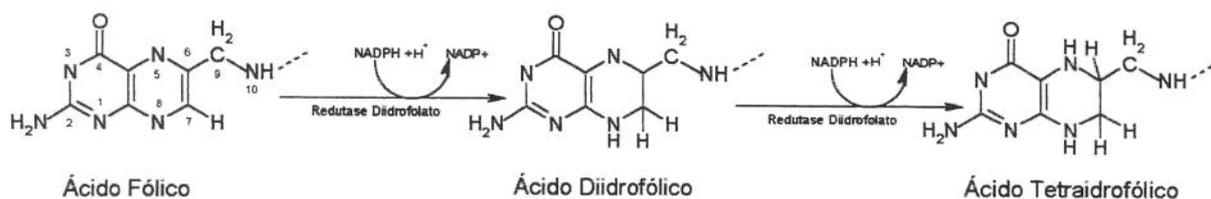
**Figura 1:** Estrutura do ácido fólico.

No que diz respeito a estabilidade dessa importante vitamina, os poucos trabalhos existentes tratam, principalmente, dos folatos naturalmente presentes em determinados alimentos. São raríssimos os estudos sobre a estabilidade do ácido fólico às diversas condições de processamento e estocagem, sendo que a maioria dos estudos de estabilidade foram realizados em sistema modelo.

## **METABOLISMO, FUNÇÕES BIOQUÍMICAS E BIODISPONIBILIDADE**

Apesar do ácido pteroilglutâmico (PteGlu 1) ser a estrutura química comum aos folatos, ele não é o principal congênere nos alimentos, nem a coenzima ativa no metabolismo intracelular. Os folatos encontrados nos alimentos estão, predominantemente, na forma de poliglutamatos, sendo o 5-metiltetraidrofolato o congênere majoritário. Os derivados de poliglutamatos são captados por células da mucosa intestinal e os resíduos extras de glutamato são removidos por conjugase, uma enzima lisossomal. Após a absorção, o PteGlu 1 é rapidamente reduzido para dar origem, primeiro ao ácido 7,8-diidrofolico ( $H_2PteGlu1$ ), reação catalisada pela enzima redutase diidrofolato, e em seguida ao

ácido tetraidrofólico ( $H_4PteGlu$  1), plenamente reduzido nas posições 5, 6, 7 e 8, que atua comoceptor de várias unidades monocarbônicas que se ligam, preferencialmente, nas posições 5 ou 10 pteridina.



**Figura 2.** Reação de redução do ácido fólico.

Durante o transporte gastro-intestinal, os poliglutamatos são hidrolisados a monoglutamatos, reduzidos e metilados a 5-metiltetraidrofolato, a forma na qual os folatos costumam ser transportados no sangue e penetram na célula após a absorção, no entanto é uma forma funcionalmente inativa do folato. Parte da vitamina é estocada no fígado na forma de poliglutamato, ligada a uma proteína. Os rins desempenham um importante papel na homeostase dos folatos. Após o processo de filtração, ocorre a reabsorção da vitamina, porém uma quantidade é excretada pela urina. Parte dos folatos também é excretada nas fezes (PARODI, 1997; DEVLIN, 1997; BRODY, 1994, GOODMAN e GILMAN, 1991). O suprimento constante de 5-metiltetraidrofolato é mantido pelos alimentos e pelo ciclo êntero-hepático da vitamina. O fígado reduz e metila ativamente o ácido fólico e tetraidrofolato e transporta o 5-metiltetraidrofolato na bile para reabsorção pelo intestino e fornecimento subsequente aos tecidos (GOODMAN e GILMAN, 1991). Um resumo do metabolismo do ácido fólico está apresentado na **Figura 3**.

Cada uma das diferentes formas de ácido fólico (**Tabela 1**), que são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano, desempenha um papel específico no metabolismo intracelular (GOODMAN e GILMAN, 1991; KATZUNG, 1994; ZANINI e OGA, 1994; ALVAREZ, 1997; DALY et al., 1997).

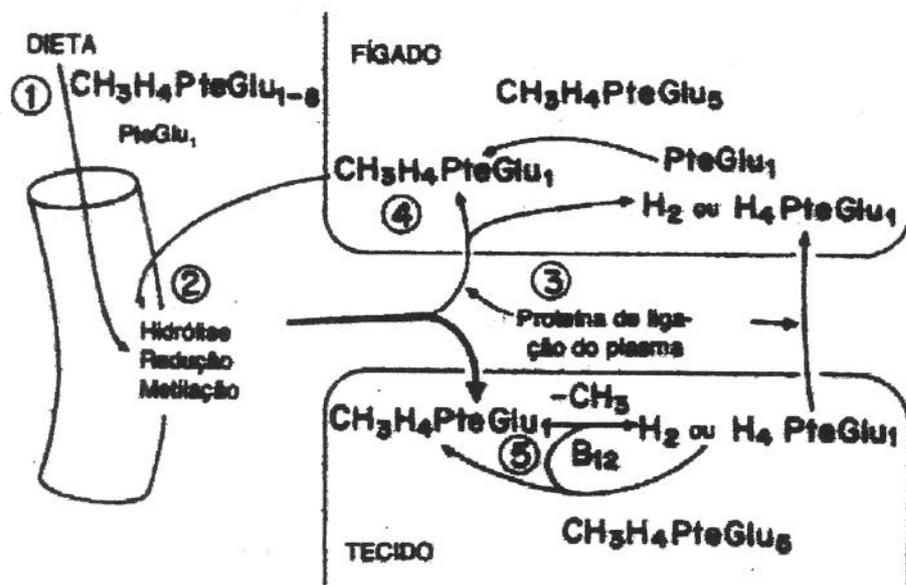


Figura 3. Metabolismo do ácido fólico.

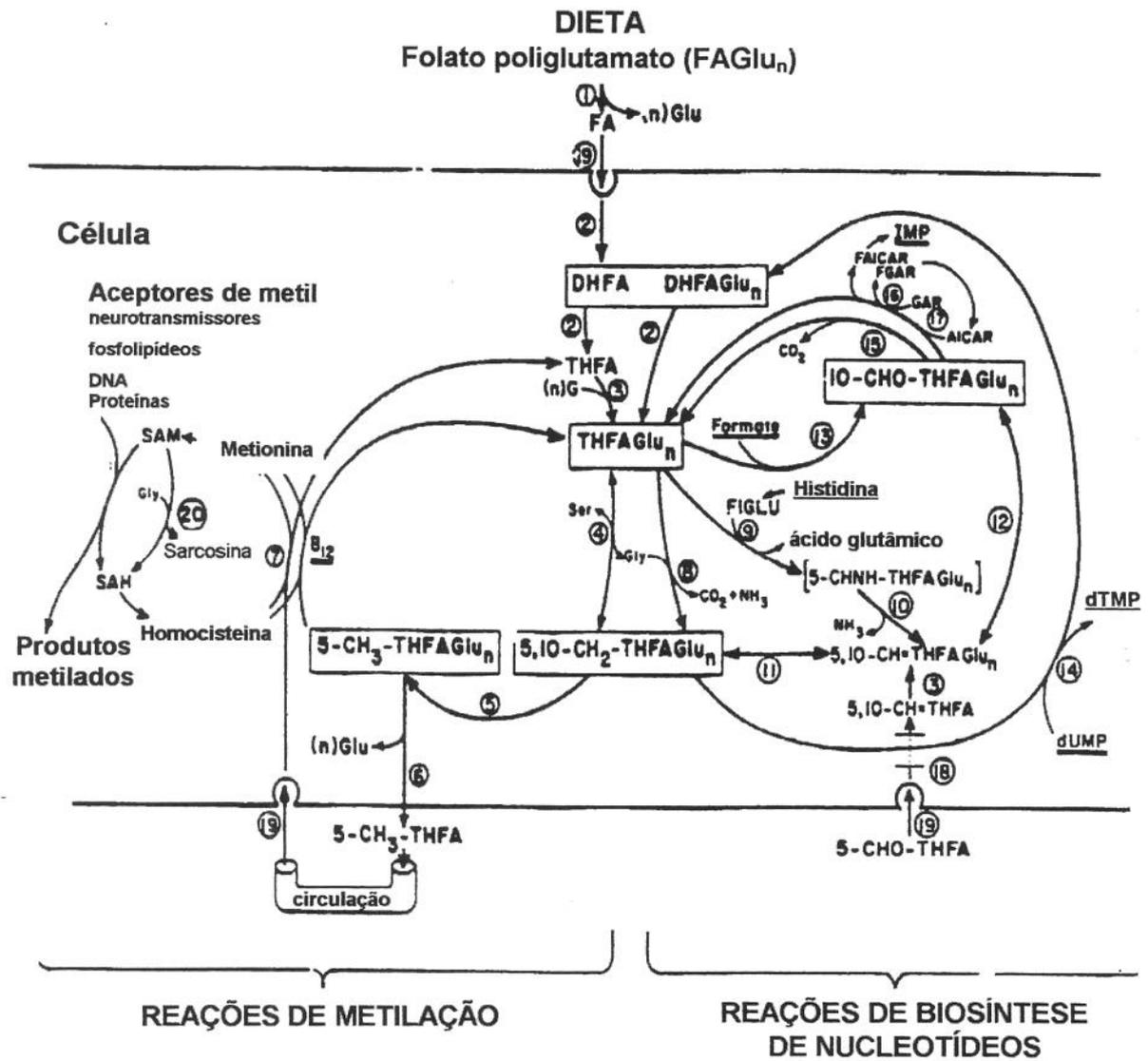
Fonte: GOODMAN e GILMAN, 1991.

Vários derivados do tetraidrofolato são usados em reações de biossíntese. São necessários na formação de produtos intermediários do metabolismo, que estão envolvidos na síntese de purinas, dTMP (timidilato), síntese de colina, serina e glicina. Como quantidades adequadas de colina e aminoácidos podem geralmente ser obtidas da dieta, a participação de folatos na síntese de purina e dTMP parece ser, dessas reações, a metabolicamente mais significativa. O ácido fólico também participa na produção normal das hemácias. Além disso, o tetraidrofolato juntamente com a vitamina  $\text{B}_{12}$  é necessário para a conversão de homocisteína a metionina (DEVLIN, 1997). Esta reação é de extrema importância para o sistema cardiovascular, dado que a hiperhomocisteinemia pode causar lesões nos vasos sanguíneos, podendo levar à arteroesclerose (PARODI, 1997; DIERKS et al, 1998). A Figura 4 apresenta um resumo das funções bioquímicas do ácido fólico.

**Tabela 1.** Nomenclatura e funções bioquímicas dos principais congêneres do ácido pteroilglutâmico.

Composto	Congênera	Radical	Posição	Função
Metiltetraidrofolato	CH <sub>3</sub> H <sub>4</sub> PteGlu	-CH <sub>3</sub>	N5	*Convesão de homocisteína a metionina. *Conversão de serina a glicina.
Ácido folínico	5-CHOH <sub>4</sub> PteGlu	-CHO	N5	Síntese de purinas.
10-Formiltetraidrofolato	10-CHOH <sub>4</sub> PteGlu	-CHO	N10	*Síntese de purina. *Utilização ou geração de formato.
5,10-Meteniltetraidrofolato	5,10-CHH <sub>4</sub> PteGlu	-CH-	N5-10	*Síntese de purina.
5,10- Metilenotetraidrofolato	5,10-CH <sub>2</sub> H <sub>4</sub> PteGlu	-CH <sub>2</sub> -	N5-10	*Síntese de timidilato
Formiminotetraidrofolato	CHNHH <sub>4</sub> PteGlu	-CHNH	N5	*Metabolismo da histidina.

Segundo RUGGERI et al. (1999) e DANG et al. (2000), os termos ácido fólico e folatos são, frequentemente, confundidos, mas o ácido fólico é aproximadamente duas vezes mais bioativo do que os folatos. Fatores que influenciam a quebra dos folatos da forma de poliglutamatos para a forma monoglutâmica e, subseqüente, absorção, transporte, estocagem, metabolismo, circulação entero-hepática e excreção, determinam a biodisponibilidade desse nutriente (PARODI, 1997). Os folatos poliglutamatos são consideravelmente mais bioativos do que os monoglutamatos. Para possuir atividade, o folato deve estar na forma tetraidro. Estudos recentes sugerem que o metiltetraidrofolato seja um cofator não muito eficaz para a formação de poliglutamatos, ao contrário do diidro, do tetraidro e do formiltetraidrofolato. Existem evidências de que o substrato preferido para a síntese de poliglutamatos seja o formiltetraidrofolato e que a conversão de tetraidrofolato, exija um doador de formatos, como a metionina (KATZUNG, 1994; ZANINI e OGA, 1994; BRODY, 1991).



**Figura 4.** Funções bioquímicas do ácido fólico.

Fonte: GREGORY, 1989.

### FONTES DE FOLATOS

As principais fontes de folatos são os vegetais folhosos, carnes, fígados, rins, frutas, cereais, leguminosas e leveduras (BRODY, 1991; FRANCO, 1992). Porém, os dados sobre os teores de folatos apresentados nas tabelas de composição de alimentos e nas publicações científicas na área, mostram grandes

diferenças para o mesmo tipo de alimento (**Tabela 2**), isto se deve, provavelmente, às diferentes técnicas analíticas empregadas na obtenção dos resultados e a fatores edafoclimáticos (CATHARINO e GODOY, 2000).

**Tabela 2.** Teores de folatos em alimentos

ALIMENTOS	FOLATOS ( $\mu\text{g/g}$ peso úmido)		
	BRODY (1991)	FRANCO (1992)	MARKS (1975)
Leite fresco de vaca	0.05 - 0.12	0.08	
Fígado cozido	10.7		
Fígado cru	1.41	1.20	0.30 – 1.50
Banana	0.28		
Ovo	1.40	0.80	0.04
Repolho cru	0.30		
Repolho cozido	0.16		
Queijo	0.20	0.16	
Vegetais verdes			0.09
Brócolos cru	1.69		
Brócolos cozido	0.65		
Brócolos	0.91	1.00	
Atum enlatado	0.15		
Batata			0 – 0.018
Tomate	0.06		
Laranja, suco	1.40	0.40	

CATHARINO E GODOY, 2000

## NECESSIDADES NUTRICIONAIS

O ácido fólico, a exemplo de todas as outras vitaminas, é necessário em pequenas quantidades. As necessidades diárias de folatos, segundo o NAS-NRC (National Research Council, National Academy of Science) (1989) estão apresentadas na **Tabela 3**. Observa-se que a necessidade aumenta durante os períodos de lactação e gestação, onde ocorre aumento da necessidade de folato

devido ao volume de sangue e ao número de células em divisão rápida. Por volta do terceiro trimestre, as necessidades de folatos quase dobram.

**Tabela 3. Necessidades diárias recomendadas de folatos**

<b>Categoria</b>	<b>Idade</b>	<b>Folato( µg)</b>
Lactentes	0.0 – 0.5	25
	0.5 – 1.0	35
Crianças	1 – 3	50
	4 – 6	75
	7 – 10	100
Homens	11 – 14	150
	15 - 18	200
	19 - 24	200
	25 - 50	200
	51+	200
Mulheres	11 – 14	150
	15 - 18	180
	19 - 24	180
	25 - 50	180
	51+	180
Gestantes		400
Lactação	Primeiro semestre	280
	Segundo semestre	260

Fonte: NAS-NCR (1989)

Há muitas causas de deficiência de folatos em seres humanos, incluindo ingestão inadequada, absorção e metabolismo deficientes e demanda aumentada. Alguns levantamentos a respeito dos hábitos alimentares demonstraram que a ingestão inadequada deve ser a causa mais comum (DEVLIN, 1997). Idosos e pessoas cujas dietas carecem de verduras, ovos e carne, frequentemente desenvolvem deficiência de ácido fólico. Deficiência de folatos também é observada no caso de complicações no intestino delgado, que interfere na absorção e circulação de folatos pelo ciclo êntero-hepático. Há evidências de que o álcool e as doenças hepáticas também interferem na absorção e metabolismo da vitamina. Pacientes com anemia hemolítica também

necessitam de maiores quantidades da vitamina. Há várias drogas que também interferem diretamente no metabolismo dos folatos. Anticonvulsivantes e contraceptivos orais podem interferir na absorção e parecem aumentar o catabolismo de folatos. Nefropatas também desenvolvem deficiência de folatos, pois a vitamina é removida do plasma cada vez que os pacientes são dializados (BRODY, 1994; KATZUNG, 1994; DEVLIN, 1997).

O efeito mais pronunciado da deficiência de folato é a inibição da síntese de DNA, devido a menor disponibilidade de purinas e dTMP. Isso leva à parada das células na fase S e uma alteração no tamanho e na forma dos núcleos de células em rápida divisão. O bloqueio na síntese de DNA retarda a maturação de glóbulos vermelhos, causando produção de glóbulos vermelhos macrocíticos, anormalmente grandes, com membranas frágeis, gerando a chamada "anemia megaloblástica" (DEVLIN, 1997). Já a hiperhomocisteinemia é bastante comum na população idosa, e parece ser devida a ingestão inadequada e/ou utilização diminuída de folatos e vitamina B<sub>12</sub>. Existem ainda pesquisas que apontam a relação entre a deficiência de congêneres do ácido fólico com câncer de cólon, leucemia, doenças mieloproliferativas, certas enfermidades crônicas da pele, além de outras doenças debilitantes crônicas (BRODY, 1991; CZEIZE e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; ULENE e ULENE, 1995; OAKLEY et al., 1995; CRANE et al., 1995; DALY et al., 1997; DEVLIN, 1997; RANG et al., 1997; DIERKS, 1998; MALINOW et al., 1998; MOSHFEGH et al., 1998). Estudos recentes demonstraram que níveis inadequados de folatos durante os primeiros estágios de gestação aumentam o risco de defeitos no tubo neural do feto, um tipo de malformação congênita (DALY et al., 1997; DEVLIN, 1997).

## **TOXIDEZ**

O ácido fólico não apresenta grau de toxicidade comprovada, provavelmente devido à sua característica hidrofílica que dificulta o acúmulo no organismo. Nenhum tipo de efeito maléfico foi detectado, mesmo com doses elevadas de 15mg/dia (ZANINI e OGA, 1994). Entretanto, o excesso de ácido fólico pode mascarar a anemia megaloblástica causada pela deficiência de

vitamina B<sub>12</sub>, mas não pode aliviar nem evitar os defeitos neurológicos decorrentes da carência da mesma, podendo causar danos irreparáveis ao sistema nervoso central. Diante disso, o FDA (Food and Drug Administration) recomenda que a concentração de folatos não ultrapassasse 1mg/dia para todos os produtos farmacêuticos e alimentícios (BRODY, 1991; ANNOTATION, 1994; KATZUNG, 1994; ZANINI e OGA, 1994; TUCKER et al., 1996; RANG et al., 1997).

## ENRIQUECIMENTO

O enriquecimento dos alimentos, com inúmeros nutrientes, tem se tornado cada vez mais importante e rotineiro, principalmente devido à mudança dos hábitos alimentares da população mundial. O ser humano, hoje em dia, tem despendido cada vez menos tempo com a sua própria alimentação, aumentando desta forma, o consumo de alimentos industrializados. Dietas calóricas e pobres em nutrientes são um dos principais responsáveis pela incidência de muitas doenças

Dentre os compostos adicionados aos alimentos, com o intuito de compensar as perdas do processamento ou mesmo reforçar o conteúdo nutritivo, encontram-se vitaminas, minerais e aminoácidos. A suplementação com vitaminas pode ser realizada pela adição de matérias naturais ricas em vitaminas, ou pela adição de vitaminas sintéticas, puras ou em misturas, denominadas "premix". (CARVALHO, 1994).

Com a finalidade de tentar solucionar os problemas relacionados à carência de ácido fólico, o FDA nos USA, desde 1996, determinou que este deveria ser adicionado (140µg/100g) em produtos como cereais, incluindo farinha, pão, cereais matinais, arroz e macarrão, normativa com efeito a partir de janeiro de 1998 (CARVALHO, 1994; MOSHFEGH et al., 1998). A partir disso, muitos produtos também estão sendo enriquecidos com ácido fólico, dentre eles, leite, derivados lácteos e margarina.

O enriquecimento de alimentos com ácido fólico, também tem sido utilizado para estudos que relacionam a ingestão da vitamina e os efeitos na

saúde. No Chile, um grande projeto está sendo desenvolvido com o objetivo de se averiguar a real influência do ácido fólico em relação ao problema das malformações congênitas. Após uma pesquisa a respeito dos hábitos alimentares da população chilena, concluiu-se que o pão é um produto bastante consumido, cerca de 250g/dia/pessoa. Portanto, a farinha de trigo, destinada principalmente a fabricação de pães, está sendo enriquecida com ácido fólico. Os efeitos serão avaliados até o final de 2002 (CASTILHA, 2000).

Considerando-se então, a grande importância dos folatos no organismo humano, o enriquecimento de alimentos com essa vitamina, juntamente com as devidas orientações nutricionais, pode vir a solucionar o problema da ingestão deficiente desse nutriente (TAMURA e MESSING, 1997). Porém, para assegurar a presença dessa vitamina nos alimentos enriquecidos, submetidos às mais diversas condições de processamento e estocagem, é fundamental o conhecimento e a pesquisa a respeito da estabilidade dos folatos.

## **ESTABILIDADE**

Alterações na composição dos alimentos podem ocorrer em etapas distintas: durante e após colheita, durante o processamento industrial, durante o armazenamento e, finalmente, durante o preparo final para consumo. Pode-se considerar que os alimentos são processados comercialmente para prolongar sua vida-de-prateleira, ter suas características modificadas a fim de satisfazer exigências dos consumidores, separar componentes não desejáveis e para, em muitos casos, melhorar suas propriedades nutricionais (LUND, 1977).

As vitaminas são compostos considerados bastante lábeis. Vários são os fatores que influenciam as perdas desses nutrientes em alimentos processados, como pH, oxigênio, luz, temperatura, concentrações de sal e açúcares, atividade de água, presença de catalisadores metálicos, agentes antioxidantes e tipo de embalagem (VARSANYI e SOMOGYI, 1983). A resistência das diferentes vitaminas a esses fatores é muito variável. O conhecimento prévio dos fatores que podem contribuir para a diminuição dos níveis vitamínicos dos

alimentos facilita o planejamento dos estudos de degradação. A adição de qualquer nutriente a um alimento deve obedecer a uma série de aspectos, entre eles, a estabilidade nas fases de produção, comercialização, e consumo desse alimento.

O ácido fólico é um composto cristalino amarelo pouco solúvel em água quando na forma ácida, porém mais solúvel na forma de sal, sensível ao oxigênio, a luz e a pH ácido e neutro, sendo estável em pH alcalino (BRUBACKER et al. 1985; BRODY, 1991; CARVALHO, 1996; RANG et al., 1997; BÜHLER, 1998). A **Tabela 4** apresenta dados a respeito da estabilidade relativa das vitaminas, com destaque para o ácido fólico. A suscetibilidade à degradação do ácido fólico foi primeiramente demonstrada por STOKSTAD (1948) e HUTCHINGS (1948), que identificaram pterinas e aminas como produtos de oxidação e redução. Muitas diferenças foram observadas entre os vários folatos no que diz respeito à resistência a degradação oxidativa. A resistência a quebra da ligação C<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>, para folatos com substituição nas posições 5 ou 10, é maior do que para folatos não substituídos (GREGORY, 1989). Estudos realizados por RITTER (1976) indicaram que a baixa ingestão de folatos através da dieta estaria associada à instabilidade dessa vitamina, que pode ser degradada após os diversos processos de cozimento caseiro ou processamentos industriais.

Os principais produtos das reações de oxidação do ácido fólico são mostrados na **Figura 5**. HAWKES e VILLOTA (1989) resumiram os resultados encontrados por diversos autores a respeito da estabilidade do ácido fólico ao calor, luz, pH ácido, oxigênio e agentes oxidantes, comprovando sua instabilidade diante desses tratamentos.

Estudos da estabilidade do ácido fólico adicionado a alguns alimentos são raros e confusos, pois os termos folato e ácido fólico são, na maioria dos casos, confundidos ou utilizados como se fossem o mesmo composto. O comportamento dessa vitamina diante do processamento já foi estudado, em pequena escala, na maioria dos casos para folatos naturalmente presentes em alimentos. Encontram-se muitas dificuldades para a avaliação das perdas de folatos em alimentos, devido às várias formas da vitamina, suscetibilidade à

degradação das diferentes formas e influência de fatores ambientais (GREGORY, 1989). Além disso, as metodologias empregadas nem sempre são confiáveis e surgem problemas para a interpretação do dados obtidos, já que durante o processamento, os alimentos podem tanto perder quanto reter água. FRANCO (1992) mostrou a ocorrência de 50% de perda de folatos durante a cocção de alimentos, enquanto KATZUNG (1994) relatou perdas de até 90%.

**Tabela 4.** Estabilidade relativa das vitaminas - destaque para o ácido fólico.

Vitamina / Condições	Calor	pH neutro	pH ácido	pH básico	Ar ou oxigênio	Luz
Ácido fólico	I	I	I	E	I	I
Carotenos (Pro-A)	I	E	I	E	I	I
Vitamina A	I	E	I	E	I	I
Vitamina D	I	E	E	I	I	I
Vitamina E	I	E	E	E	I	I
Vitamina K	E	E	I	I	E	I
Vitamina B1	I	I	E	I	I	E
Vitamina B2	I	E	E	I	E	I
Vitamina B6	I	E	E	E	E	I
Vitamina B12	E	E	E	E	I	I
Biotina	I	E	E	E	E	E
Niacina	E	E	E	E	E	E
Ácido pantotênico	I	E	I	I	E	E
Vitamina C	I	I	E	I	I	I

I – Instável E – Estável

Fonte: CARVALHO, 1996.

Estudos realizados por GREGORY (1989) mostraram que alguns fatores como oxigênio, ácido ascórbico e atividade de água parecem ter grande influência na avaliação do comportamento dos folatos. Estudos a respeito da instabilidade dos folatos expostos ao calor, na ausência e presença de oxigênio e ácido ascórbico, mostraram que em presença de vitamina C as perdas foram mais baixas. Já o contato com o oxigênio resultou em perdas mais acentuadas.

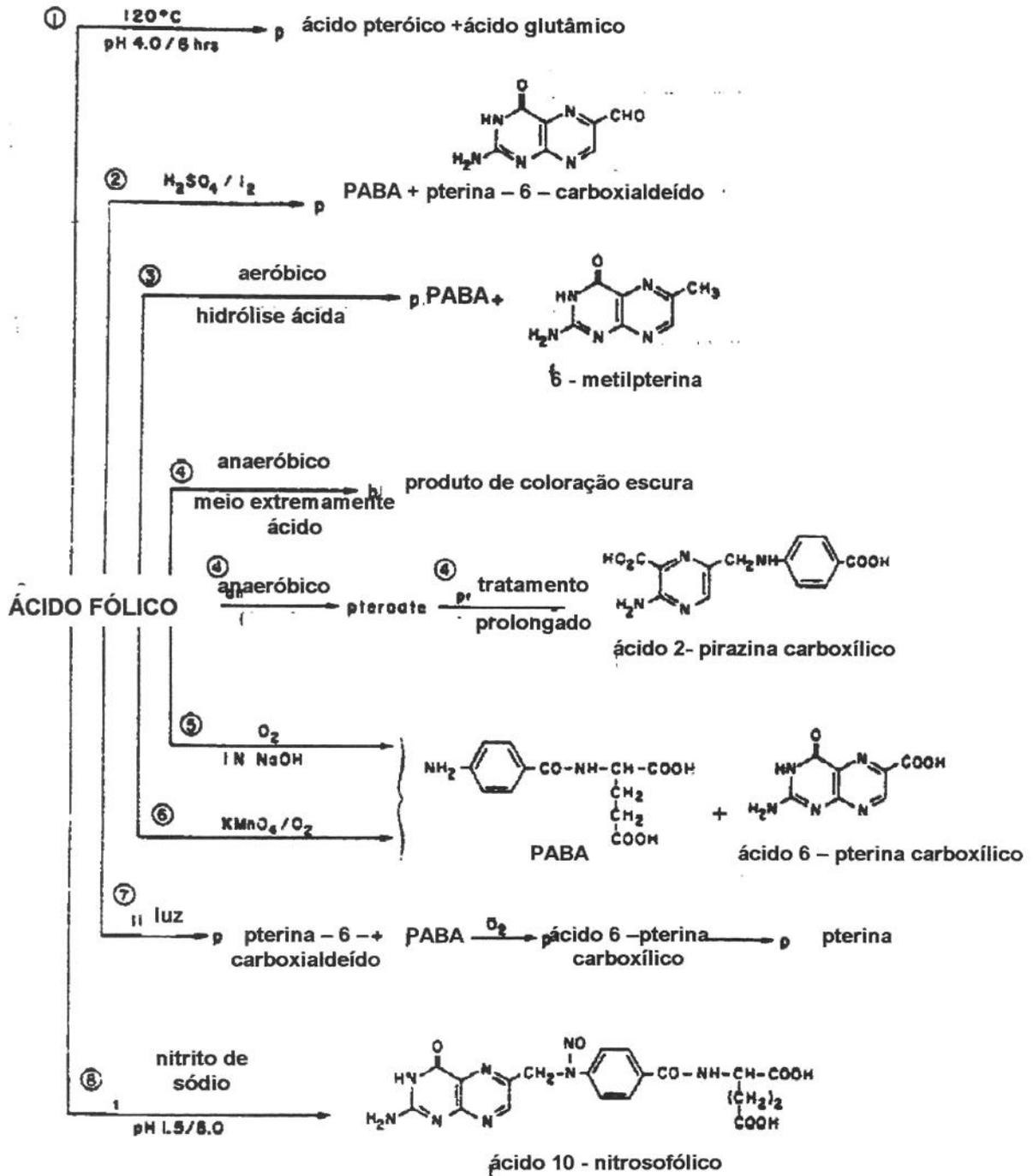


Figura 5. Produtos de oxidação de ácido fólico.

Fonte: HAWKES e VILLOTA, 1989

Folatos, por serem vitaminas hidrossolúveis, são sujeitos a lixiviação, principalmente durante os processos de cozimento, em adição às reações químicas de degradação (GREGORY, 1989). Grandes perdas de folatos foram reportadas por HURDLE et al. (1968) para alimentos cozidos em água. LEICHTER et al. (1978) citados por GREGORY (1989) observaram a lixiviação de folatos durante o cozimento de alguns vegetais, encontrando na água de cozimento, de 22 a 84% da quantidade inicial de folatos presentes nos alimentos. Esses resultados sugerem ser a extração aquosa, e não a degradação térmica, a maior responsável pelas perdas de folatos resultantes do processo de cozimento. DANG et al. (2000) pesquisaram a estabilidade de folatos presentes em legumes submetidos ao cozimento sob pressão durante 20 minutos, observando maiores índices de retenção de folatos (62,1%) para esse tipo de processamento, quando comparado ao cozimento em água por 2 horas (52,6%). A diferença foi atribuída ao menor tempo de exposição ao calor durante o cozimento, além das diferenças relacionadas a exposição ao oxigênio.

Os folatos presentes em muitos vegetais se mostraram bastante resistentes ao processo de "spray drying", com taxas de retenção acima de 90% (GREGORY, 1989). KLEIN et al. (1979) pesquisaram a retenção de folatos presentes em alguns vegetais submetidos ao processo de esterilização por microondas. Neste trabalho, os autores compararam as perdas após tratamento térmico convencional e por microondas, concluindo que a taxa de retenção foi bastante similar para os dois processos, ficando entre 78 e 100%.

Além de dados sobre comportamento da vitamina durante o cozimento de vegetais, estudos a respeito da estabilidade de folatos em leites submetidos a tratamento térmico também já foram publicados. Muitos autores apontam o 5-metiltetraidrofolato como o folato majoritário presente em leites (GREGORY, 1989; RENNER, 1989; PARODI, 1997) e, portanto, os estudos foram baseados na estabilidade desse composto.

O gado leiteiro, diferente do ser humano, não necessita ingerir vitaminas na alimentação. A vitamina C, por exemplo, é sintetizada no fígado e as vitaminas do complexo B pelos microrganismos do húmem. Entretanto, a dieta

pode alterar o comportamento dos microrganismos no processo de síntese, fazendo com que os teores das vitaminas, entre eles os folatos, variem significativamente (RENNER, 1989).

Quanto a perdas durante o processamento térmico, ANTUNES (1994) apresentou o ácido fólico como um composto relativamente estável ao processo de pasteurização do leite, confirmando os dados obtidos por SCOTT et al. (1984), que também observaram pequenas perdas ocasionadas pela pasteurização, entretanto esses autores relataram que durante o período de estocagem poderiam ocorrer perdas significativas. DONG et al. (1975) mostraram que leites submetidos a esterilização e subsequente estocagem apresentaram uma taxa de retenção de folatos muito variável, de 0 a 80%, dependendo da raça e tipo de alimentação do animal, condições do processo, presença de vitamina C e concentração de oxigênio dissolvido durante e após o processo. BURTON et al. (1970) já haviam relatado perdas diferenciais quanto ao tipo de processamento, 4% de perda de folato quando foi utilizado processo direto e 10% para processo indireto, devido principalmente aos níveis de oxigênio. De acordo com PINHEIRO e MOSQUIM (1991), no sistema indireto de aquecimento, a troca de calor entre o meio de aquecimento e o produto se faz através de tubos ou de placas, enquanto que no sistema direto de aquecimento, o meio de aquecimento (vapor) é injetado diretamente no produto (sistema de injeção) ou o produto é injetado na câmara de vapor (sistema de infusão).

KARLIN (1969) e FAVIER et al. (1987) avaliaram a resistência de folatos presentes em leites submetidos a processos de esterilização e pasteurização, concluindo que ambos eram responsáveis por perdas da vitamina inferiores a 20%. No entanto, FAVIER et al. (1987) observaram que os leites UHT mostraram uma diminuição significativa do conteúdo de folatos após 4 meses de estocagem, o que fez com que os autores sugerissem a fortificação com o ácido fólico para leites UHT. Num estudo mais recente, PARODI (1997) encontrou perdas menores que 10% para o processo de pasteurização e maiores que 20% nos processos de esterilização por UHT.

LIMA e GODOY (2001) avaliaram a estabilidade do ácido fólico adicionado a leites frente ao processo de esterilização e concluíram que a vitamina é bastante estável ao processo térmico, mostrando perdas inferiores a 10%. O estudo da estabilidade durante aquecimento doméstico, onde se realiza a fervura do leite, também apontou para a resistência da vitamina, com perdas inferiores a 1%. Resultados sobre a avaliação da estabilidade durante a estocagem, confirmaram as observações feitas por FAVIER et al. (1987). Após 3 meses houve uma perda de aproximadamente 16% da vitamina. Os mesmos autores também avaliaram a estabilidade, durante o período de estocagem, de leites em pó e bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo. Após 12 meses as perdas chegaram a aproximadamente 60% nos leites em pó, provavelmente, devido ao maior tempo de validade do produto. Já para as bebidas achocolatadas prontas para o consumo, a taxa de retenção foi superior a 70% durante o período de 120 dias.

Muitos autores relataram que a estabilidade dos folatos, durante o período de estocagem de leites processados, depende principalmente das quantidades de ácido ascórbico e oxigênio presentes, o ácido ascórbico com ação protetora e o oxigênio um agente que atuaria na degradação dos folatos. FORD et al. (1969) ressaltaram a importância da remoção de oxigênio dissolvido durante o processo de esterilização, para a estabilidade dos folatos durante o aquecimento e período de estocagem, pois a remoção do oxigênio também preservaria a vitamina C. VIBERG et al. (1997) investigaram o efeito de diferentes níveis de oxigênio na degradação térmica do 5-metiltetraidrofolato em processamento UHT (ultra-high-temperature), a diferentes temperaturas, 110, 120, 140 e 150°C. O efeito do oxigênio na degradação se mostrou mais pronunciado a altas temperaturas (140 e 150°C) e menos importante no processo UHT indireto a 140°C por 4 segundos. A conclusão do estudo indica que a degaseificação do leite ou outro alimento líquido, antes do tratamento térmico, tem um efeito positivo na retenção de folatos. Perdas de folatos durante o processo UHT são geralmente inferiores a 20%, mas perdas acima de 43% também já foram observadas (KARLIN, 1969; BURTON et al., 1967, 1970; FORD e SCOTT, 1968, FORD et al., 1969).

Além da exposição ao oxigênio, a degradação de folatos também ocorre por exposição à luz. Leites esterilizados foram deixados em atmosfera de nitrogênio e estocados no escuro e com exposição à luz. Nenhuma redução significativa de folatos ocorreu nas amostras estocadas na ausência de luz, porém nas amostras expostas à luz houve degradação de 10% (FORD, 1967; SCOTT et al., 1984).

Folatos também estão presentes em carnes, principalmente em vísceras como rins e fígado, que são fontes da vitamina. Para este tipo de alimento o cozimento a temperatura de cocção acarretou perdas de 15 a 95% em bife de fígado e lombo de porco, respectivamente (CHELDELIN et al., 1943).

Outro alimento que tem despertado interesse para pesquisa, principalmente sob o aspecto nutricional, é o pão, produto mundialmente consumido em grande quantidade. BUTTERFIELD e CALLOWAY (1972) avaliaram o conteúdo de folatos presente em vários ingredientes utilizados nas formulações de pães e concluíram que a maior parte dos folatos se encontra nas leveduras e na farinha. CORT et al. (1976) avaliaram a taxa de retenção de ácido fólico adicionado à farinha utilizada para o preparo de pães e concluíram que a taxa de retenção era entre após a fabricação dos mesmos era 80 a 100%. KEAGY (1975) determinou a estabilidade de folato adicionado e naturalmente presente, durante o processo de fabricação de pães. Durante o assamento, ocorreram perdas de 11 a 31% para os folatos adicionados e naturais, respectivamente. A incorporação de aditivos como ácido ascórbico pareceu não ter influência apreciável na retenção dos folatos. LIMA e GODOY (2001), encontraram perdas superiores, 23%, para o ácido fólico adicionado à farinha após a fabricação de pães. Estudos durante o período de estocagem de farinha, realizados por KEAGY (1975), a temperatura de 48,9°C, indicaram perdas de 40% no teor de folatos após 12 semanas, valor que permaneceu inalterado após 52 semanas. As farinhas fortificadas com ácido fólico, tiveram altas taxas de retenção da vitamina, com baixíssimas perdas, nas mesmas condições. Essas diferenças, segundo o autor, podem ser atribuídas a maior instabilidade dos folatos naturalmente presentes em alimentos, quando comparados ao ácido fólico.

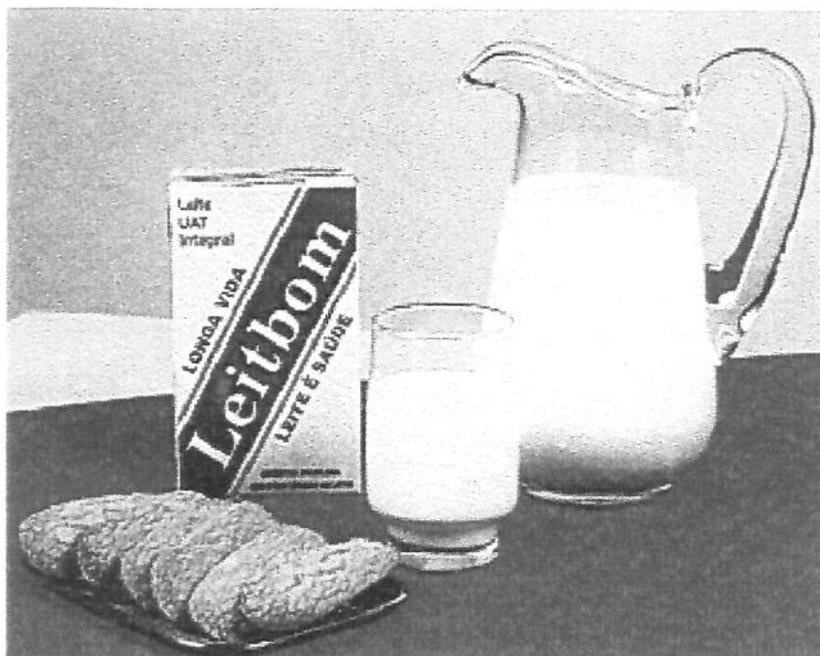
## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, M.A. **Bioquímica da nutrição vitaminas, fibras e minerais**. 1ed. Editora Plêiade, São Paulo, 1997.
- ANNOTATION, How do we get enough folic acid prevent some neural Tube Defects. **American Journal of Public Health**, **84** (3): 348- 350, 1994.
- ANTUNES, A. J. Perdas de Nutrientes no Processamento de Alimentos. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 8-14, 1994.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins**. 2ed. rev. and Expanded. New York: Marcel Decker, 1991.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. United Kingdom.Honolulu, Hawai: Academic Press Limited, 1994.
- BRUBACKER,G.,MULLER-MULLOT, W., SOUTHGATE,D. A. T. **Methods for the Determination of Vitamins in Food, Recommended by COST 91**, Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1985.
- BÜHLER, V. **Vademecum for Vitamin Formulations**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1988.
- BURTON, H., FORD, J. E, FRANKLIN, J .G., PORTER, J. W. G. Effects of repeated heat treatments on the levels of vitamins of the B-complex in milk. **Journal of Dairy Research**, **34**: 193-196, 1967.
- BURTON,H., FORD,J.E.,PERKIN,A.G.,PORTER, J. W. G., SCOTT, K.J., THOMPSON,S.Y., TOOTHILL , J., EDWARDS-WEBB, J. D. Comparison of milks processed by the direct and indirect methods of ultra-high-temperature sterilization. **Journal of Dairy Research**, **37**: 529-531, 1970.
- BUTTERFIELD,S.,CALLOWAY,D.H. Folic acid in wheat and selected foods. **Journal of American Diet. Association**, **60**: 310-321, 1972.
- CARVALHO, P.R.N. Enriquecimento de Alimentos. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos,1-7, 1994.
- CARVALHO, P.R.N. Estudos de vida-de-prateleira de Alimentos Enriquecidos. **Segundo seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 5-8, 1996.
- CASTILHA, E. Comunicação pessoal, 2000.
- CATHARINO, R.R., GODOY, H. T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para a análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 126p., 2000.
- CHELDELIN, V. H., WOODS, A. M., WILLIAMS, R. J. Losses of B vitamins due to cooking of foods, **Journal of Nutrition**, **26**: 477-482, 1943.
- CORT,W.M., BORENSTEIN,B., HARLEY, J. H., OSADCA, M., SCHEINER, J. Nutrient stability of fortified cereal products. **Food Technology**, **30**: 52-62, 1976.
- CRANE, N.T., WILSON, D.B., COOK, D.A., LEWIS, C.J., YETLEY, E.A., RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal of Public Health**, **85** (5): 660-666, 1995.

- CZEIZE, A.E., DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **New England Journal of Medicine**, **327** (226): 1832-1835, 1992.
- DALY S., MILLS, J.R., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J, KIRKE, P.N, WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**. **350** (9092): 1666-1669, 1997.
- DANG, J.,ARCOT, J. SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chemistry**, **68** (3): 295-298, 2000.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
- DIERKES, J., KROESEN, M., PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International Journal of Vitamin and Nutrient Research**, **68**: 98-103, 1998.
- DONG, F.M., OACE, S.M. Folate concentration and pattern in bovine milk, **Journal of Agriculture of Food Chemistry**, **23**(3): 534-537, 1975.
- FAVIER, J. C., CHRISTIDES, J. P., POITER de COURCY, G., LÉGER, J. J. Folic acid content of foods. III. Folic acid content of different categories of milk, **Science des Aliments**, **7**(1): 23-40, 1987.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- FORD, J. E. The influence of the dissolved oxygen in milk on the stability of some vitamins towards heating and subsequent exposure to sunlight. **Journal of Dairy Research**, **34**: 239-243, 1967.
- FORD, J.E., PORTER, J.W.G. THOMPSON, S.Y, TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J. Effects of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content in milk. **Journal of Dairy Research**, **36**: 447-449, 1969.
- FORD, J. E. SCOTT, K. J. The folic acid activity of some milk foods for babies. **Journal of Dairy Research**, **35** : 85-90, 1968.
- GOODMAN, L. S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1991.
- GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Advanced in Food and Nutritional Research**, **33**: 1-101, 1989.
- HAWKES, J.G, VILLOTA, R. Foliates in Foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. **Food Science and Nutrition**, **28** (6): 439-538, 1989.
- HURDLE, A.D. F., BARTON, D., SEARLES, I. H. A method for measuring folate in foods and its applications to a hospital diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, **21** : 1202-1207, 1968.
- HUTCHING, B.L., STOKSTAD, E.L.R., MOWAT, J.H., BOOTHE, J.H., WALLER, C.W., ANGIER, R.B., SEMB, J., SUBBARROW, Y. Degradation of the fermentation *L.casei* factor. II. **Journal of American Chemical Society**, **70**(1): 10-17, 1948.

- KARLIN, R. Sur la teneur en folates es laits de grand melange. **Journal International of Vitaminol**, **39** : 359-371, 1969.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KEAGY, P.M.; STOKSTAD, L.R.; FELLERS, D.A. Folacin stability during bread processing and family flour storage. **Cereal Chemistry**, **52**, 348-356, 1975.
- KEAGY, P.M. Folacin I In: AUGUSTIN, J., KLEIN, B.P., BECKER, D., VENUGOPAL, P.B. **Methods of vitamin assay**. 4ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- KLEIN, B.P., LEE, H. C., REYNOLDS, P. A., WANGLES, N. C. Folacin content of microwave and conventionally cooked frozen vegetables. **Journal of Food Science**, **44** (1): 286-289, 1979.
- LEICHTER, J., SWITZER, V.P., LANDYMORE, A.F. Effect of cooking on folate content of vegetables. **Nutr. Rep. Int.**, 18(4): 475-482, 1978.
- LENHINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 2ed. Worth Publishers, 1993.
- LIMA J.A., GODOY, H.T. Study of stability of folic acid in enriched miks. **TALANTA: The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry**, 2001 (submetido).
- LIMA J.A., GODOY, H.T. Method for analyse of folic acid in margarine, flour and bread enriched. **Journal of Food Science and Technology**, 2001 (enviado).
- LUND, D.B. Design of Thermal Processes for Maximizing nutrient Retention. **Food Technology**, **31**(2): 71, 1977.
- MALINOW, M. R., DUELL, P. B., HESS, D. L., ANDERSON, P. H. KRUGER, W. D., PHILLIPSON, B. E., GLUCKMAN, R.A., BLOCK, P.C., UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by Breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary disease. **New England Journal of Medicine**, **338** (15): 1009-1015, 1998.
- MARKS, J. **A guide to the vitamins their role in health and disease**. 1ed. Great Britain. St. Leonard's House Lancaster, England, 1975.
- MOSHFEGH, A.J., COOK, A.J., HO, J.M., FRIDAY, J.E. Folate intakes. **Food surveys Research Group**. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- NAS-NCR. National Research Council, National Academy of Science **Recommended Dietary Allowances**. 10ed. National Academic Press, Washington, 283p, 1989.
- OAKLEY, G. P. Jr., ERICKSON, J. D., ADAMS, M. J. Urgent need to increase folic acid consumption. **Journal of American Medical Association**, **274** (21): 1717-1718, 1995.
- PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. **The Australian Journal of Dairy Technology**, **52**: 109-118, october, 1997.
- PINHEIRO, A. J. R., MOSQUIM, M.C.A. V. **Processamento de leite de consumo**. Viçosa, 1991.
- RANG, H.P., RITTER, J. M., DALE, M. M. **Farmacologia**. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
- RENNER, E. **Micronutrients in milk and milk-based food products**. New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1989.

- RITTER, E. Stability Characteristics of Vitamins in Processed Foods. **Food Technology**, **30** (1): 48-51, 1976.
- RUGGERI, S., VATHERISTO, L.T., AGGUZZI, A., FINGLAS, P., CARNOVALE, E. Determination of folate vitamers in food and Italian reference diet by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, **855** (1): 237-245, 1999.
- SCOTT, K. J., BISHPO, D. R., ZECHALCO, A., EDWARDS-WEBB, J.D. Nutrient content of liquid milk. II. Content of vitamin C, riboflavin, Folic acid, thiamin, vitamins B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub> in pasteurized milk as delivered to the home and after storage in the domestic refrigerator. **Journal of Dairy Research**, **51**(1): 51-54, 1984.
- STOKSTAD, E.L.R., HUTCHING, B.L., MOWAT, J.H., BOOTHE, J.H., WALLER, C.W., ANGIER, R.B., SEMB, J., SUBBARROW, Y. Degradation of the fermentation *L.casei* factor. I. **Journal of American Chemical Society**, **70**(1):5-10, 1948.
- TAMURA, T., MESSING, B. Bioavailability of folic acid in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**, **66** (6): 1299-1300, 1997.
- TUCKER, K.L., MAHNKEN, B., WILSON, P.W.F., JACQUES, P., SELHUB, J. Folic acid fortification of the food supply. Potential Benefits and risks for the Elderly population. **Journal of American Medical Association**, **276** (23): 1879-1885, 1996.
- ULENE, A., ULENE, V. **Vitaminas**. 1ed. Blumenal:EKO, 1995.
- VARSANYI, I., SMOGYI, L. Determination of the Shelf Life of Food Products. **Acta Alimentaria**, **12**(2): 73-100, 1983.
- VIBERG, U., JÄGERSTAD, M., ÖSTE, R., SJÖHOLM, I. Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen. **Food Chemistry**, **59** (3): 381-386, 1997.
- ZANINI, A.C., OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5ed. São Paulo: Atheneu, 1994.



## CAPÍTULO 2

# ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS – ESTUDO DA VIDA-DE- PRATELEIRA

Trabalho a ser submetido ao Journal of Agricultural Food Chemistry

# ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ENRIQUECIDOS – ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA

Lima, J.A. e Godoy, H.T.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – DCA  
C.P. 6121 CEP 13083-970  
juliana.lima@ondefor.com.br

## RESUMO

As vitaminas são compostos que desempenham inúmeras funções no organismo humano, entre elas está o ácido fólico, uma vitamina hidrossolúvel, que atua principalmente no sistema hematopoiético, além de outras funções importantes. Porém, quantidades insuficientes desse nutriente estão sendo ingeridas, devido aos maus hábitos alimentares da população em geral. Portanto, a exemplo de outras vitaminas, o ácido fólico também tem sido utilizado nos processos de enriquecimento dos alimentos, entre eles o leite e os derivados lácteos. Entretanto, não existem dados suficientes na literatura que certifiquem a estabilidade dessa vitamina frente aos diferentes tipos de processamento e, principalmente, durante o período de estocagem desses alimentos enriquecidos. O objetivo desse trabalho foi, portanto, um estudo da estabilidade do ácido fólico durante a vida de prateleira de amostras enriquecidas de leites em pó, leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo. O método utilizado foi desenvolvido e validado por CATHARINO e GODOY (2000) e inclui a extração do ácido fólico com solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L), seguida por uma etapa de limpeza com tampão fosfato (0,1mol/L), ácido fosfórico (0,1mol/L) e ácido tricloroacético concentrado, filtração e injeção no cromatógrafo a líquido. No processo cromatográfico utilizou-se coluna C<sub>18</sub> e sistema de eluição gradiente, sendo a fase móvel composta por 90% de tampão acetato (0,166 mol/L) e 10% de acetonitrila (v/v) no início da corrida, chegando a 76:24, tampão acetato/acetonitrila (v/v) no final do processo. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por padronização externa. Dentre os produtos analisados, verificou-se que, para leites em pó os valores da concentração de ácido fólico estavam de

acordo com os declarados no rótulo, durante os primeiros meses após a fabricação. No entanto, durante o período de estocagem de 1 ano ocorreram perdas acentuadas da vitamina (60% em média). Já para leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas os teores de ácido fólico estavam abaixo do especificado para 4, dos 8 produtos analisados, desde os primeiros dias de estocagem. Durante a vida-de-prateleira as perdas de ácido fólico foram de 25 e 29% em média, para leites esterilizados e bebidas achocolatadas, respectivamente.

### ABSTRACT

Vitamins are compounds that have countless functions in the human organism. Folic acid is a water-soluble vitamin that acts mainly on the hematopoietic system, besides showing some other important functions. However, insufficient quantities of this nutrient are consumed due to the bad nutritional habits of the population in general. Therefore, like some other vitamins, folic acid has been used in enrichment processes including that of milk and milk products. However there are insufficient data in the literature to guarantee the stability of this vitamin during the different types of processing and mainly during the storage period of these enriched foods. Therefore, the objective of this work was to study the stability of folic acid during the shelf-life of enriched samples of powdered milk, sterilized milk and ready to drink milk chocolate beverages. The method used was developed and evaluated by CATHARINO and GODOY (2000), and included the extraction of the folic acid with KOH (0.1 mol/L), followed by a clean-up procedure using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 mol/L), phosphate buffer (0.1 mol/L) and trichloroacetic acid. The extract was filtered and injected into the HPLC equipment. In the chromatographic process a C<sub>18</sub> column and gradient elution was used, starting with a mobile-phase of acetate buffer (0.166 mol/L) and acetonitrile (90:10) (v/v), and changing to acetate buffer and acetonitrile (76:24) (v/v) after 8.5 minutes, holding this condition for 9 minutes. Ultraviolet detection was at 290 nm and quantification using external standards. Of the products analysed, it was shown that for powdered milk the concentrations of

folic acid were in accordance with those declared on the label of the products, during the first months after processing. Nevertheless, after one year of storage, considerable losses of vitamin were noticed (60% on average). For the sterilized milk and ready to drink milk chocolate beverage the contents of folic acid were below those specified for 4 of the 8 products analysed, as from the first storage days. During the shelf-life, the values scarcely altered, and the losses of folic acid were, on average, 25 and 29%, for sterilized milks and milk chocolate beverages, respectively.

## INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos científicos têm apresentado os problemas ocasionados pela ingestão insuficiente de vários nutrientes. A população mundial, como um todo, tem se alimentado mal, e o consumo de alimentos ricos em muitos compostos nutritivos como frutas, verduras e legumes tem sido muito baixo. Além dos maus hábitos alimentares, quando o nutriente em questão é uma vitamina, o problema torna-se ainda mais grave, pois são compostos bastante instáveis a muitas condições de processamento, tanto industrial quanto doméstico, e estocagem.

Com a finalidade de corrigir deficiências nutricionais de uma população, de obter um balanço calórico nutricional adequado, de suprir necessidades nutricionais de produtos novos lançados no mercado e de atender padrões de identidade e regulamentos nutricionais já existentes, é que tem sido feito o enriquecimento de alimentos. Produtos lácteos, leite, farinhas, cereais, biscoitos, enfim produtos com expressivo consumo pela população em geral, têm sido os mais utilizados para esse fim.

A ingestão insuficiente do ácido fólico tem sido apontada como possível causa de doenças graves que atingem o homem, como as doenças cardíacas, o câncer e as malformações congênitas (KATZUNG, 1994; DEVLIN, 1997; DIERKS, 1998). Programas de enriquecimento de alimentos e políticas elucidativas sobre a importância dessa vitamina têm sido implantadas por alguns

governos. O FDA (Food Drug Administration) nos Estados Unidos determinou que o ácido fólico deveria ser adicionado (140µg/100g) em produtos como cereais, incluindo a farinha, pão, cereais de refeição, arroz e macarrão, normativa com efeito a partir de janeiro de 1998 (CARVALHO, 1996; MOSHFEGH et al., 1998).

O ácido fólico é a forma mais estável dentre os folatos, sendo a escolhida para o enriquecimento de alimentos (DANG et al., 2000), entretanto, durante os processos de fabricação e estocagem podem ocorrer perdas, até mesmo da vitamina adicionada.

Muito pouco se conhece a respeito da resistência do ácido fólico frente às condições de processamento e estocagem. Fatores como temperatura, luz, pH, presença de catalizadores e agentes oxidantes são responsáveis pela degradação do ácido fólico (BRUBACKER et al., 1985; BÜHLER, 1988; BRODY, 1991; CARVALHO, 1996; RANG et al., 1997). GREGORY (1989) mostrou que os fatores que parecem ter alguma importância na avaliação do comportamento de folatos são a presença de oxigênio e ácido ascórbico, além do conteúdo de água presente. DONG et al. (1975) mostraram que leites submetidos a esterilização e subsequente estocagem apresentaram variada taxa de retenção de folatos (0 – 80%), dependendo da raça e tipo de alimentação do animal, condições do processo, presença de vitamina C e concentração de oxigênio durante e após o processo. FORD et al. (1969), FAVIER et al. (1987) e RENNER et al. (1989) relataram que a estabilidade de folatos, durante o período de estocagem de leites processados, depende principalmente das quantidades de ácido ascórbico e oxigênio presentes, sendo o ácido ascórbico protetor e o oxigênio um agente que atua na degradação dos folatos.

Dessa forma, estudos sobre a estabilidade do ácido fólico em alimentos enriquecidos torna-se bastante útil, no sentido de garantir a qualidade dos produtos, assegurando até o final do prazo de validade dos mesmos o valor nutricional, e orientar o produtor na sobredosagem necessária, a nível de produção, além das melhores condições de embalagem, transporte e armazenamento.

## MATERIAIS E MÉTODO

### MATERIAIS

Foram analisadas 4 tipos de leite esterilizado, leite em pó e bebida láctea achocolatada pronta para o consumo, todas enriquecidas com ácido fólico e destinadas, principalmente, ao público infantil. As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas/SP. As determinações foram feitas em três diferentes lotes, em duplicata, para cada amostra, diferenciados pelas datas de fabricação, recolhidos nos estabelecimentos comerciais, com a preocupação de estarem com o menor tempo de fabricação possível. Todos os produtos analisados estavam sem danos aparentes. O estudo de vida de prateleira foi efetuado com a análise mensal de cada amostra, até o final do prazo de validade, com exceção das amostras de leite em pó que, por apresentarem maior prazo de validade, foram analisadas em intervalos de tempo maiores.

### REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi doado pela M.Cassab do Brasil S.A. (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, o ácido acético, o ácido fosfórico e o hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico, foi adquirido da Synth, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros fluoropore (FHLP 04700 MILLIPORE), com poros de 0,45 $\mu$ m de diâmetro.

### EQUIPAMENTO

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HEWLETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 $\mu$ L. Para a separação do ácido fólico foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb-MV, ODS-2, 5 $\mu$ m, 150 X 4,6mm d.i. (Rainin Instrument Company), protegida por uma coluna de guarda Bondesil, C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m, 10 X 4,6mm d.i. (VARIAN) Para a detecção utilizou-se um detector de arranjo de

diodos (DAD) da marca HP, série 1100. Acoplado ao sistema o software HP-Chemstation que, além de monitorar todos os componentes, permitiu o melhor tratamento dos dados.

## MÉTODO

A metodologia utilizada neste trabalho foi desenvolvida e validada para leites por CATHARINO e GODOY (2000). Para a análise, foram tomados 1mL das amostras líquidas e 1,0g das amostras de leites em pó, previamente homogeneizados. O ácido fólico foi extraído das matrizes alimentícias utilizando-se, aproximadamente, 3,0mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L), colocado em banho ultra-sônico por dez (10) minutos. Para a limpeza do extrato transferiu-se quantitativamente a solução para balão volumétrico de 10mL, adicionou-se 3,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 2,0mL de tampão fosfato, composto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,25mol/L)/  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,37mol/L) e 350 $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético, completando-se o volume do balão com tampão fosfato. Após a homogeneização seguiram-se duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45 $\mu\text{m}$ . Seguiu-se, então, a injeção de 100 $\mu\text{L}$  do extrato no cromatógrafo.

Utilizou-se sistema de eluição por gradiente para a separação do ácido fólico a vazão de 0,5mL/min, com 90% de tampão acetato (TPAC), contendo 0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L de hidróxido de potássio, a pH 2,8, e 10% de acetonitrila (ACN) (v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de TPAC e 24% de ACN (v/v), mantendo-se essa proporção até 9,0 minutos. Para as bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo, o gradiente chegou em 10,5 minutos a 76% de TPAC e 24% de ACN (v/v), mantendo-se a proporção até 11,0 minutos. Para ambos os casos, as condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 7 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando-se o comprimento de onda de leitura a 290nm. A identificação da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-

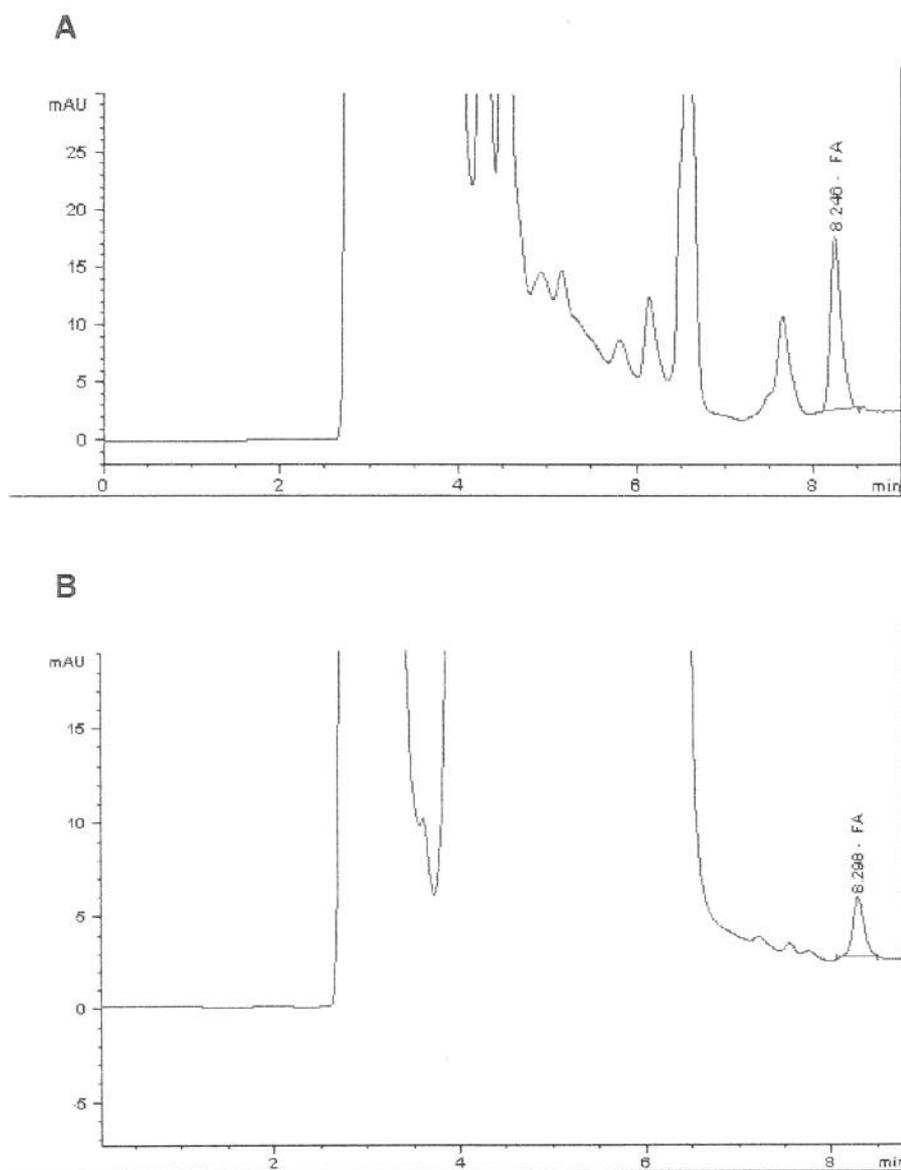
cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos no DAD. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, sendo a curva analítica construída com 7 níveis de concentração (0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,50; 1µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

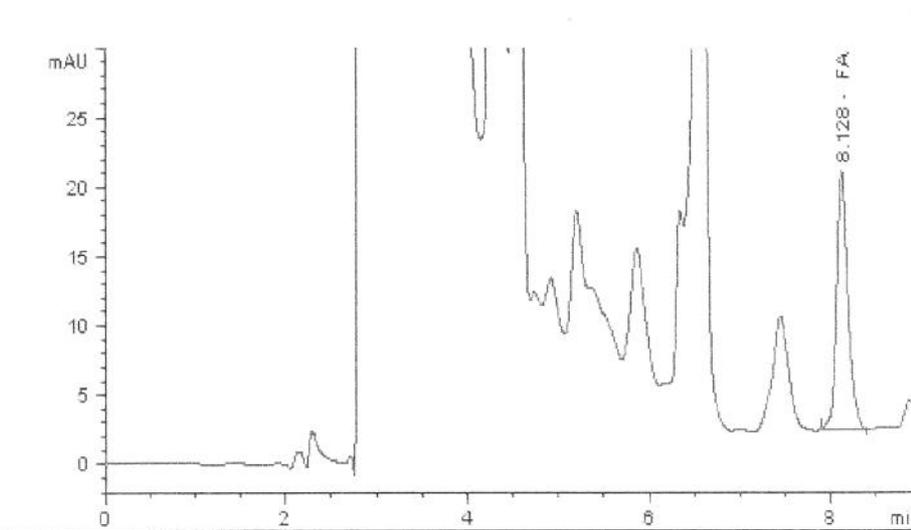
Nas **Figuras 1 e 2** podem ser visualizados os perfis cromatográficos dos produtos enriquecidos analisados. O pico do ácido fólico (FA) aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 8,0 minutos.

Para a determinação da concentração de ácido fólico e avaliação da sua estabilidade durante o período de estocagem, buscou-se amostras com tempo de fabricação de no máximo um mês.

Os teores de ácido fólico encontrados nas amostras são apresentados na **Tabela 1**. Todas as amostras de leite em pó, mesmo nos diferentes lotes, continham ácido fólico de acordo com o apresentado na embalagem do produto, com pequenas variações em relação a esses valores. Nos leites esterilizados, os da marca LLA apresentaram apenas 40% da quantidade especificada no produto, em todos os lotes. A situação mais preocupante foi com os leites LLB que apresentaram somente 7,6% do teor da vitamina. As outras duas marcas tinham concentrações próximas às declaradas. Nas amostras de bebidas lácteas a situação foi a mesma dos leites esterilizados, em duas das quatro marcas os teores não chegaram a representar 20% da quantidade mostrada no produto.



**Figura 1.** Perfis cromatográfico dos extratos de leite em pó (A) e leite esterilizado (B) enriquecidos com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 $\mu$ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0,166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de tampão acetato (0,166mol/L), mantendo-se as condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico do extrato de bebida láctea achocolatada enriquecida com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 $\mu$ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0,166mol/L) no início da corrida, chegando em 10,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de tampão acetato (0,166mol/L), mantendo-se as condições até 11,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.

Os resultados aqui obtidos confirmaram as observações feitas por GREGORY (1989) em relação à influência da atividade de água nos processos de degradação dos folatos, o que justificaria as diferenças obtidas entre as amostras fluidas e em pó. Considerando que os produtores tenham realmente adicionado ácido fólico numa quantidade de pelo menos 100% a mais, o que é recomendado pelos fabricantes de “premix”, as variações das diferenças entre os valores encontrados e dos apresentados nos rótulos, podem ser explicadas pelas condições de processamento, concentração de oxigênio dissolvido durante e após o processo, além de outros. Fatores como esses já foram relatados por BURTON et al. (1970) e DONG et al. (1975).

**Tabela 1.** Teores de ácido fólico em leite em pó, leite esterelizado e bebida láctea enriquecida.

Amostras	Tipos/ Lotes	Data de fabricação	PV (meses)	*Rótulo ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) ou ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )	Data da Análise	Ácido fólico ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) ou ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )	
						M $\pm$ DP	CV(%)
Leite em pó	LPA1	11/10/99	12	140	24/01/00	142,3 $\pm$ 0,5	0,3
	LPA2	17/10/99			24/01/00	143,7 $\pm$ 0,5	0,3
	LPA3	29/10/99			24/01/00	145,4 $\pm$ 0,4	0,3
	Média entre lotes					144 $\pm$ 1	0,7
	LPB1	07/12/99	12	46	25/03/00	51,7 $\pm$ 0,6	1,2
	LPB2	03/12/99			25/03/00	53,4 $\pm$ 0,5	0,9
	LPB3	02/12/99			25/03/00	54,1 $\pm$ 0,6	1,1
	Média entre lotes					53 $\pm$ 1	1,9
	LPC1	22/12/99	12	140	25/03/00	132,4 $\pm$ 0,7	0,5
	LPC2	03/12/99			25/03/00	133,4 $\pm$ 0,9	0,7
	LPC3	05/11/99			25/03/00	146,0 $\pm$ 1,0	0,7
	Média entre lotes					137 $\pm$ 6	4,4
LPD1	17/11/99	24	78	24/02/00	75,3 $\pm$ 0,8	1,0	
LPD2	18/11/99			24/02/00	75,8 $\pm$ 0,5	0,7	
LPD3	16/11/99			24/02/00	77,6 $\pm$ 0,7	0,7	
Média entre lotes					76,2 $\pm$ 0,9	1,2	
Leite Esterelizado	LLA1	20/07/00	3	20	19/08/00	7,7 $\pm$ 0,6	7,8
	LLA2	11/08/00			29/08/00	7,7 $\pm$ 0,6	7,8
	LLA3	05/09/00			07/10/00	7,9 $\pm$ 0,8	9,0
	Média entre lotes					7,8 $\pm$ 0,1	1,3
	LLB1	23/06/00	4	300	27/07/00	22,9 $\pm$ 0,6	2,6
	LLB2	17/07/00			18/08/00	22,5 $\pm$ 0,9	4,0
	LLB3	13/07/00			12/08/00	24,4 $\pm$ 0,7	2,9
	Média entre lotes					23 $\pm$ 1	4,3
	LLC1	20/07/00	3	5,625	07/08/00	5,9 $\pm$ 0,2	3,4
	LLC2	27/07/00			28/08/00	5,8 $\pm$ 0,5	8,6
	LLC3	11/08/00			18/08/00	5,2 $\pm$ 0,6	11,5
	Média entre lotes					5,6 $\pm$ 0,4	7,1
LLD1	27/06/00	5	32,5	25/07/00	35,8 $\pm$ 0,5	1,4	
LLD2	07/07/00			14/08/00	30,5 $\pm$ 0,5	1,6	
LLD3	04/08/00			24/08/00	26,4 $\pm$ 0,4	1,5	
Média entre lotes					31 $\pm$ 5	15,2	
Bebida Láctea Achocolatada	BAA1	13/09/00	6	300	18/10/00	45,6 $\pm$ 0,9	2,0
	BAA2	12/07/00			20/08/00	45,6 $\pm$ 0,2	0,4
	BAA3	13/07/00			20/08/00	56,6 $\pm$ 0,8	1,4
	Média entre lotes					49 $\pm$ 6	12,8
	BAB1	13/09/00	6	300	18/10/00	48,5 $\pm$ 0,6	1,2
	BAB2	12/07/00			20/08/00	52,3 $\pm$ 0,6	1,1
	BAB3	13/07/00			20/08/00	44,9 $\pm$ 0,5	1,1
	Média entre lotes					49 $\pm$ 4	7,6
	BAC1	29/07/00	6	30	12/08/00	44,0 $\pm$ 0,8	1,8
	BAC2	15/07/00			12/08/00	48,6 $\pm$ 0,2	0,4
	BAC3	19/08/00			16/10/00	38,1 $\pm$ 0,7	1,8
	Média entre lotes					44 $\pm$ 5	12,2
BAD1	09/08/00	6	30	19/09/00	36,2 $\pm$ 0,6	1,7	
BAD2	06/08/00			19/09/00	40,3 $\pm$ 0,2	0,5	
BAD3	07/08/00			19/09/00	37,8 $\pm$ 0,6	1,6	
Média entre lotes					38 $\pm$ 2	5,5	

PV- Prazo de validade, tempo em meses em que o produto pode ser consumido

\*Concentração de ácido fólico descrita na embalagem do produto

M  $\pm$  DP média e estimativa do desvio padrão da determinações em duplicata

CV- Coeficiente de variação

As Tabelas 2, 3 e 4 mostram os valores referentes à concentração de ácido fólico obtidos durante a estocagem de leite em pó, leite esterilizado e bebida láctea achocolatada, respectivamente, para cada lote de cada produto.

A Figura 3 ilustra o comportamento da vitamina nas amostras analisadas neste trabalho, durante o referido período de estocagem. Os pontos representam a média dos lotes.

**Tabela 2.** Concentrações de ácido fólico em leite em pó enriquecido, durante o período de estocagem.

Amostra / Lote	Ácido fólico( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )				
	M $\pm$ DP CV(%)				
	Período de estocagem				
	3 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
LPA1	142,3 $\pm$ 0,5 0,3	94,3 $\pm$ 0,2 0,2	87,3 $\pm$ 0,3 0,3	84,3 $\pm$ 0,5 0,6	79,9 $\pm$ 0,5 0,6
LPA2	143,7 $\pm$ 0,5 0,3	95,2 $\pm$ 0,7 0,7	86,8 $\pm$ 0,4 0,5	81,8 $\pm$ 0,3 0,4	71,4 $\pm$ 0,3 0,4
LPA3	145,4 $\pm$ 0,4 0,3	94,3 $\pm$ 0,3 0,3	87,9 $\pm$ 0,5 0,6	84,1 $\pm$ 0,5 0,6	70,9 $\pm$ 0,4 0,6
Média entre lotes	144 $\pm$ 1,0 0,7	94,6 $\pm$ 0,5 0,5	87,3 $\pm$ 0,7 0,8	83,4 $\pm$ 1,4 1,7	74,1 $\pm$ 5,0 6,7
LPB1	51,7 $\pm$ 0,6 1,2	23,7 $\pm$ 0,3 1,3	19,1 $\pm$ 0,4 2,1	18,5 $\pm$ 0,9 4,9	16,6 $\pm$ 0,3 1,8
LPB2	53,4 $\pm$ 0,5 0,9	20,9 $\pm$ 0,6 2,9	20,7 $\pm$ 0,6 2,9	19,0 $\pm$ 0,9 4,7	15,2 $\pm$ 0,2 1,3
LPB3	54,1 $\pm$ 0,6 1,1	19,7 $\pm$ 0,6 3,0	17,2 $\pm$ 0,6 3,5	15,6 $\pm$ 0,7 4,5	14,4 $\pm$ 0,4 2,8
Média entre lotes	53 $\pm$ 1,0 1,9	21,4 $\pm$ 2,0 9,3	19,0 $\pm$ 1,7 8,9	17,7 $\pm$ 1,8 10,2	15,5 $\pm$ 1,5 13,2
LPC1	132,4 $\pm$ 0,7 0,5	66,1 $\pm$ 0,5 0,8	59,5 $\pm$ 0,2 0,3	59,1 $\pm$ 0,5 0,8	54,2 $\pm$ 0,2 0,4
LPC2	133,4 $\pm$ 0,9 0,7	62,9 $\pm$ 0,3 0,5	59,7 $\pm$ 0,3 0,5	58,3 $\pm$ 0,9 1,5	57,3 $\pm$ 0,6 1,0
LPC3	146,0 $\pm$ 1,0 0,7	64,4 $\pm$ 0,9 1,4	59,0 $\pm$ 0,4 0,7	58,2 $\pm$ 0,3 0,5	—
Média entre lotes	137 $\pm$ 6,0 4,4	64,5 $\pm$ 1,6 2,5	59,4 $\pm$ 0,4 0,7	58,5 $\pm$ 0,5 0,8	55,7 $\pm$ 2,2 3,9
LPD1	75,3 $\pm$ 0,8 1,0	53,1 $\pm$ 0,7 1,3	35,4 $\pm$ 0,2 0,6	35,4 $\pm$ 0,2 0,6	31,7 $\pm$ 0,4 1,3
LPD2	75,8 $\pm$ 0,5 0,7	50,7 $\pm$ 0,4 0,8	37,8 $\pm$ 0,2 0,5	34,9 $\pm$ 0,2 0,6	31,3 $\pm$ 0,9 2,9
LPD3	77,6 $\pm$ 0,7 0,9	55,5 $\pm$ 0,4 0,7	40,7 $\pm$ 0,3 0,7	36,5 $\pm$ 0,5 1,4	33,0 $\pm$ 0,8 2,4
Média entre lotes	76,2 $\pm$ 0,9 1,2	53,1 $\pm$ 2,4 4,5	38,0 $\pm$ 2,7 7,1	35,6 $\pm$ 0,8 2,2	32,0 $\pm$ 0,9 2,8

M  $\pm$  DP- média e estimativa do desvio padrão da determinações em duplicata

CV- coeficiente de variação

**Tabela 3.** Concentrações de ácido fólico em leite esterilizado, durante o período de estocagem.

Amostra / Lote	Ácido fólico ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )									
	M $\pm$ DP CV (%)									
	Período de estocagem									
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias			
LLA1	7,7 $\pm$ 0,6	7,8	7,4 $\pm$ 0,3	4,0	—					
LLA2	7,7 $\pm$ 0,6	7,8	7,3 $\pm$ 0,9	12,3	6,9 $\pm$ 0,1	1,4	—			
LLA3	7,9 $\pm$ 0,8	9,0	7,2 $\pm$ 0,5	6,9	6,1 $\pm$ 0,2	3,3				
Média entre lotes	7,8 $\pm$ 0,1	1,3	7,3 $\pm$ 0,1	1,4	6,5 $\pm$ 0,6	9,2				
LLB1	22,9 $\pm$ 0,6	2,6	22,2 $\pm$ 0,1	0,4	—					
LLB2	22,5 $\pm$ 0,9	4,0	22,4 $\pm$ 0,5	2,2	22,1 $\pm$ 0,9	4,1	—			
LLB3	24,4 $\pm$ 0,7	2,9	23,7 $\pm$ 0,5	2,1	18,9 $\pm$ 0,9	4,8				
Média entre lotes	23,3 $\pm$ 1,0	4,3	22,8 $\pm$ 0,8	3,5	20,5 $\pm$ 2,3	11,2				
LLC1	5,9 $\pm$ 0,2	3,4	5,8 $\pm$ 0,2	3,4	5,4 $\pm$ 0,3	5,6				
LLC2	5,8 $\pm$ 0,5	8,6	5,5 $\pm$ 0,7	12,7	4,9 $\pm$ 0,3	6,1	—			
LLC3	5,2 $\pm$ 0,6	11,5	4,8 $\pm$ 0,9	18,7	4,2 $\pm$ 0,5	11,9				
Média entre lotes	5,6 $\pm$ 0,4	7,1	5,4 $\pm$ 0,5	9,3	4,8 $\pm$ 0,6	12,5				
LLD1	3,8 $\pm$ 0,5	1,4	33,4 $\pm$ 0,8	2,4	29,8 $\pm$ 0,7	2,3	—			
LLD2	30,5 $\pm$ 0,5	1,6	28,6 $\pm$ 0,2	0,7	23,1 $\pm$ 0,6	2,6	20,3 $\pm$ 0,9	4,4		
LLD3	26,4 $\pm$ 0,4	1,5	24,7 $\pm$ 0,6	2,4	20,0 $\pm$ 0,4	2,0	16,8 $\pm$ 0,4	2,4		
Média entre lotes	30,9 $\pm$ 4,7	15,2	28,9 $\pm$ 4,4	15,2	24,3 $\pm$ 5,0	20,6	18,5 $\pm$ 2,5	3,5		

M  $\pm$  DP- média e estimativa do desvio padrão da determinações em duplicata

CV- coeficiente de variação

Para os lotes de leite em pó analisou-se os produtos durante 12 meses, correspondente ao prazo de validade dos mesmos, exceto para a amostra LPB que apresentava prazo de validade de 2 anos. Para todas as amostras verificou-se uma diminuição do teor de ácido fólico, mais acentuada nos primeiros 6 meses. A porcentagem de perda média, após 12 meses, variou de 58 a 70,7% entre os leites em pó (**Tabela 5**). A **Figura 3**, sugere que, provavelmente, a partir do quarto mês de estocagem, nenhum dos leites em pó continham a vitamina na concentração determinada na embalagem.

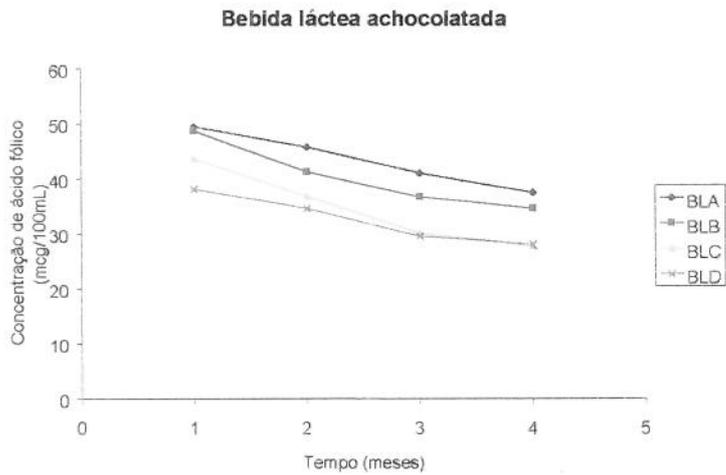
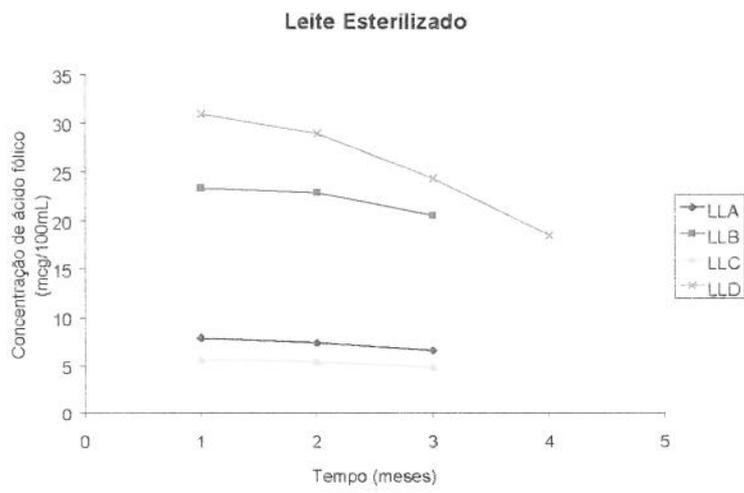
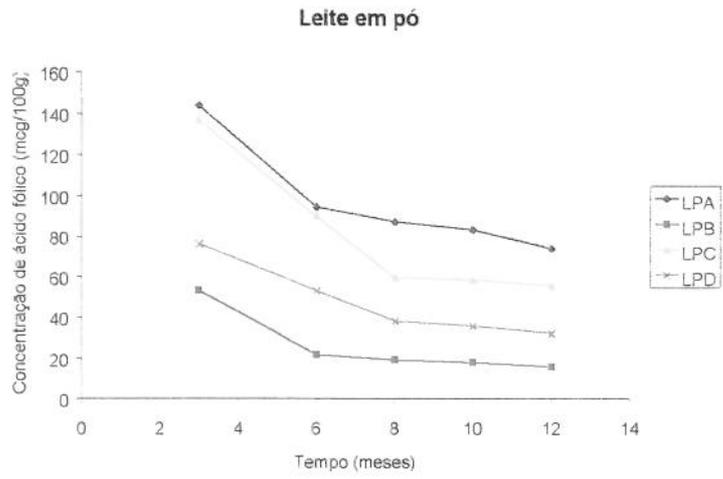
**Tabela 4.** Concentrações de ácido fólico em bebida láctea achocolatada pronta para o consumo, durante o período de estocagem.

Amostra / Lote	Ácido fólico( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )							
	M $\pm$ DP CV(%)							
	Período de estocagem							
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias	
BAA1	45,6 $\pm$ 0,9	2,0	41,1 $\pm$ 0,5	1,2	39,5 $\pm$ 0,9	2,3		
BAA2	45,6 $\pm$ 0,2	0,4	44,9 $\pm$ 0,9	2,0	39,4 $\pm$ 0,8	2,0	32,8 $\pm$ 0,5	1,5
BAA3	56,6 $\pm$ 0,8	1,4	51,2 $\pm$ 0,9	1,8	44,2 $\pm$ 0,5	1,1	42,3 $\pm$ 0,5	1,2
Média entre lotes	49,3 $\pm$ 6,3	12,8	45,7 $\pm$ 5,1	11,2	41,0 $\pm$ 2,7	6,6	37,5 $\pm$ 6,7	17,9
BAB1	48,5 $\pm$ 0,6	1,2	43,8 $\pm$ 0,7	1,6	40,1 $\pm$ 0,9	2,2		
BAB2	52,3 $\pm$ 0,6	1,1	44,6 $\pm$ 0,7	1,6	40,0 $\pm$ 0,9	2,2	39,5 $\pm$ 0,9	2,3
BAB3	44,9 $\pm$ 0,5	1,1	35,2 $\pm$ 0,5	1,4	30,1 $\pm$ 0,6	2,0	29,7 $\pm$ 0,5	1,7
Média entre lotes	48,6 $\pm$ 3,7	7,6	41,2 $\pm$ 5,2	12,6	36,7 $\pm$ 5,7	15,5	34,6 $\pm$ 6,9	19,9
BAC1	44,0 $\pm$ 0,8	1,8	40,8 $\pm$ 0,7	1,7	30,2 $\pm$ 0,6	2,0	27,6 $\pm$ 0,8	2,9
BAC2	48,6 $\pm$ 0,2	0,4	40,2 $\pm$ 0,9	2,2	29,8 $\pm$ 0,4	1,3	27,8 $\pm$ 0,6	2,2
BAC3	38,1 $\pm$ 0,7	1,8	29,4 $\pm$ 0,5	1,7				
Média entre lotes	43,6 $\pm$ 5,3	12,2	36,8 $\pm$ 6,4	17,4	30,0 $\pm$ 0,3	1,0	27,7 $\pm$ 0,1	0,4
BAD1	36,2 $\pm$ 0,6	1,7	29,8 $\pm$ 0,8	2,7	28,8 $\pm$ 0,4	1,4		
BAD2	40,3 $\pm$ 0,2	0,5	36,8 $\pm$ 0,8	2,2	29,6 $\pm$ 0,6	2,0	27,3 $\pm$ 0,6	2,2
BAD3	37,8 $\pm$ 0,6	1,6	37,3 $\pm$ 0,8	2,1	30,0 $\pm$ 0,7	2,3	28,6 $\pm$ 0,8	2,8
Média entre lotes	38,1 $\pm$ 2,1	5,5	34,6 $\pm$ 4,2	12,1	29,5 $\pm$ 0,6	2,0	27,9 $\pm$ 0,9	3,2

M  $\pm$  DP- média e estimativa do desvio padrão da determinações em duplicata

CV- coeficiente de variação

O comportamento do ácido fólico nos leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas, devido a similaridade das características da matriz, foi o mesmo. As taxas de perda média entre os produtos foi de 20 a 29% para os leite e as bebidas achocolatadas, respectivamente (**Tabela 5**). No entanto, após 60 dias de estocagem, o teor de ácido fólico não correspondia com o teor declarado na embalagem em nenhum desses produtos. Os leites esterilizados foram analisados por um período de 90 dias, porém para LLD o prazo de validade era de 5 meses e, portanto, verificou-se os teores de ácido fólico nesse produto por 120 dias, chegando a um valor de porcentagem de perda de 40%.



**Figura 3.** Comportamento de ácido fólico durante a estocagem.

Quando se fala em degradação de qualquer substância, sabe-se que esse fenômeno ocorre em fases. No início do processo a taxa de degradação é pequena, porém em uma determinada etapa do processo verifica-se aceleração, chegando quase que a estabilidade no final. Como para os leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas o prazo de validade é pequeno, talvez não tenha dado tempo de chegar à fase crítica da degradação do ácido fólico, ou seja, a fase de aceleração que pode ser observada nos leites em pó.

**Tabela 5:** Porcentagem de perda de ácido fólico durante o período de estocagem, dos produtos analisados.

<b>Amostra/ Lote</b>	<b>Perda média (%)</b>
LPA	58,0
LPB	70,7
LPC	59,3
LPD	58,0
<b>Média entre os produtos</b>	<b>61,5 ± 6,2</b>
LLA	16,7
LLB	22,5
LLC	19,2
LLD	21,4
<b>Média entre os produtos</b>	<b>20,0 ± 2,6</b>
BLA	23,9
BLB	28,8
BLC	36,5
BLD	26,8
<b>Média entre os produtos</b>	<b>29,0 ± 5,4</b>

## CONCLUSÕES

Observa-se pelos resultados obtidos que o enriquecimento está sendo realizado, entretanto, em alguns produtos, mesmo pouco tempo depois da fabricação as concentrações de ácido fólico foram muito inferiores em relação às declaradas nos rótulos.

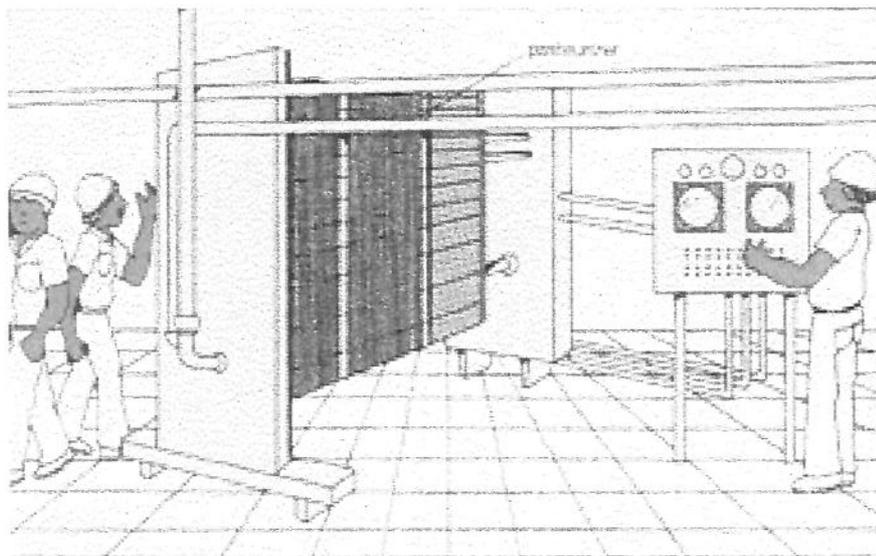
Durante o período de estocagem, verificou-se uma perda acentuada nos níveis de ácido fólico, nos leites em pó. Para os demais produtos, a perda da

vitamina ocorreu, porém de forma menos drástica, talvez em consequência do menor prazo de validade desses produtos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2ed. rev. and Expanded. New York: Marcel Decker, **1991**.
- BRUBACKER, G., MULLER-MULLOT, W., SOUTHGATE, D. A. T. Methods for the Determination of Vitamins in Food, Recommended by COST 91, Elsevier Applied Science Publishers, New York, **1985**.
- BÜHLER, V. Vademecum for Vitamin Formulations, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1988**.
- BURTON, H., FORD, J.E., PERKIN, A.G., PORTER, J. W. G., SCOTT, K.J., THOMPSON, S.Y., TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J. D. Comparison of milks processed by the direct and indirect methods of ultra-high-temperature sterilization. *Journal of Dairy Research*. **1970**, 37: 529-532.
- CARVALHO, P.R.N. Estudos de vida-de-prateleira de Alimentos Enriquecidos. Segundo seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, **1996**, 5-18.
- CATHARINO, R.R., GODOY, H. T. Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para a análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, **2000**; 126 p.
- DANG, J., ARCOT, J. SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. *Food Chemistry*. **2000**, 68 (3): 295-298.
- DEVLIN, T.M. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. 1ed. Ed. Edgard Blücher, **1997**.
- DIERKES, J., KROESEN, M., PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *International Journal of Vitamin and Nutrient Research*. **1998**, 68: 98-103.
- DONG, F.M., OACE, S.M. Folate concentration and pattern in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1975**, 23(3): 534-542.
- FAVIER, J. C., CHRISTIDES, J. P., POITER de COURCY, G., LÉGER, J. J. Folic acid content of foods. III. Folic acid content of different categories of milk. *Science des Aliments*. **1987**, 7(1): 23-40.
- FORD, J.E., PORTER, J.W.G. THOMPSON, S.Y., TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J. Effects of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content in milk. *Journal of Dairy Research*. **1969**, 36: 447-452.
- GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Advanced in Food and Nutritional Research*, **1989**, 33: 1-101.

- KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, **1994**.
- MOSHFEGH, A.J., COOK, A.J., HO, J.M., FRIDAY, J.E. Folate intakes. Food surveys Research Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, **1998**.
- RANG, H.P., RITTER, J .M., DALE, M. M. Farmacologia. 3ed. Guanabara Koogan Rio de Janeiro, **1997**.
- RENNER, E. Micronutrients in milk and milk-based food products. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York ,**1989**.



### **CAPÍTULO 3**

## **AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ESTERILIZADOS ENRIQUECIDOS**

Trabalho a ser submetido a TALANTA

The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry

# AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ÁCIDO FÓLICO EM LEITES ESTERILIZADOS ENRIQUECIDOS

Lima, J.A. e Godoy, H.T.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
C.P. 6121 CEP 13083-970  
juliana.lima@ondefor.com.br

## RESUMO

Novos estudos mostram que o ser humano tem despendido cada vez menos tempo com a sua alimentação, chegando a mudar até hábitos alimentares, consumindo cada vez mais alimentos industrializados, levando a uma ingestão insuficiente de muitos nutrientes, dentre eles, os folatos. Estes, recentemente, ganharam a atenção dos pesquisadores, devido a muitos estudos que apontam a deficiência dessa vitamina como possível causa de doenças graves que acometem a humanidade. A importância dessa vitamina tem levado alguns governos a implantar programas de enriquecimento e campanhas elucidativas sobre os folatos. No entanto, essa adição deve obedecer a uma série de aspectos, entre eles, a estabilidade do nutriente adicionado às condições de processamento e estocagem. Muitos produtos estão sendo enriquecidos com ácido fólico, destacando-se o leite, um excelente veículo para o enriquecimento. Visando garantir a qualidade dos leites enriquecidos, o objetivo desse trabalho foi a determinação da estabilidade do ácido fólico a tratamentos térmicos que ocorrem durante os processos de esterilização e fervura, além da avaliação do comportamento dessa vitamina durante o período de estocagem. A metodologia empregada utilizou como solução extratora KOH (0,1mol/L) através de vibração ultra-sônica e a limpeza do extrato foi feita com tampão fosfato (0,1mol/L), ácido fosfórico (0,1mol/L) e ácido tricloroacético. A separação cromatográfica ocorreu em coluna C<sub>18</sub>, protegida por coluna de guarda, com eluição por gradiente, utilizando tampão acetato e acetonitrila 90:10 (v/v) no início da corrida, chegando à proporção de 76:24 (v/v) em 8,5 minutos, mantendo-se até o final da corrida em 9 minutos. O tempo para o re-equilíbrio, da coluna, antes de uma nova injeção, foi

de 7 minutos. A detecção foi feita na região do ultra-violeta (290nm) e a quantificação por padronização externa. Nos quatro ensaios realizados, em escala semi-industrial, o ácido fólico mostrou-se bastante resistente ao processo de esterilização, com perdas inferiores a 10%. As maiores perdas foram decorrentes do processo de adição e homogeneização da vitamina (50%). Após o processo de fervura, não houve diminuição significativa do valor vitamínico. Já, durante o período de estocagem, avaliado neste trabalho (90 dias), as perdas ficaram em torno de 16%.

### **ABSTRACT**

New studies have shown that the human race is spending less and less time on feeding, and even changing its eating habits by consuming more and more industrialized food, leading to an insufficient ingestion of many nutrients, including folates. These have recently caught the attention of researchers, due to many studies indicating a shortage of this vitamin as being a possible cause of some serious diseases which afflict humanity. The importance of the vitamin has inspired some governments to establish enrichment programs and elucidatory campaigns on folates. However, this addition should consider a series of aspects, and amongst them, the stability of the added nutrient under the conditions of processing and storage. Many products have been enriched with folic acid, especially milk, an excellent supplier of nutrients. Aiming at guaranteeing the quality of enriched milk, the goal of this study was to evaluate the stability of folic acid during heat processing (sterilization and boiling), besides evaluating the behavior of this vitamin during storage. The methodology employed used KOH (0.1mol/L) to extract the folic acid with ultrasonic vibration and a clean-up of the extract with phosphate buffer (0.1mol/L), phosphoric acid (0.1mol/L) and trichloroacetic acid. The analysis was by HPLC with a C<sub>18</sub> column protected by a guard-column, and gradient elution with a mobile-phase of acetate buffer (0.166mol/L)/acetonitrile (90:10) (v/v), changing to acetate buffer (0.166mol/L) and acetonitrile (76:24) (v/v) after 8.5 minutes of run. The time for column re-equilibration was 7 minutes. Detection was effected using a diode array detector

(290nm) and quantification by external standards. In all four assays carried out on a semi-industrial scale, the folic acid was shown to be resistant to the process of sterilization, with losses inferior to 10%. The highest losses occurred during the processes of vitamin addition and homogenization (50%). There was also no important decrease of vitamin value on boiling, but in the storage period evaluated (90 days), the losses were about 16%.

## INTRODUÇÃO

Procurando compensar as perdas no processamento de alimentos ou mesmo com o intuito de reforçar o conteúdo nutritivo dos mesmos é que vem sendo feita a adição de ácido fólico, uma vitamina que tem despertado bastante interesse devido aos seus efeitos em relação à prevenção de doenças como problemas cardíacos, malformações congênitas, câncer, mal de Alzheimer's e anemia megalobástica, entre outras (BRODY, 1991; CZEIZE e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; ULENE e ULENE, 1995; OAKLEY et al., 1995; CRANE et al., 1995; GIOVANNUCCI et al., 1995; GLYNN et al., 1996; DALY et al., 1997; DEVLIN, 1997; NIGARD et al., 1997; RANG et al., 1997; CLARKE et al., 1998; MALINOW et al., 1998; MOSHFEGH et al., 1998; TSAI et al., 1999) aos alimentos. Esta adição deve obedecer a uma série de aspectos, entre eles, a estabilidade do nutriente adicionado às condições de processamento e estocagem.

Alimentos como cereais, farinhas, leites, biscoitos, achocolatados, entre outros, estão sendo enriquecidos com o ácido fólico, a forma mais estável e mais bioativa entre os folatos. A labilidade característica dos folatos a fatores como temperatura, luz, pH, atividade de água e exposição a agentes oxidantes, entre outros, indicam a necessidade de se estudar o comportamento desse nutriente durante as fases de produção, comercialização e consumo dos alimentos, visando assegurar a qualidade dos mesmos. Porém, estudos sobre a estabilidade dessa vitamina após processamento e estocagem são, praticamente, inexistentes. Atualmente, as pesquisas sobre ácido fólico estão direcionadas, em

maior parte, aos aspectos químicos e nutricionais do que a perdas ocorridas durante o processamento dos alimentos.

O leite é um dos alimentos que contém a maior variedade de vitaminas. As vitaminas A, D e E (lipossolúveis) estão presentes em maiores quantidades na nata e as hidrossolúveis encontram-se na porção desnatada (VEISSEYRE, 1972). Em se tratando de ácido fólico, o leite não pode ser considerado uma boa fonte, entretanto, é um bom veículo nos processos de enriquecimento, em virtude de sua aceitação e consumo pela população.

Nos processos industriais, o leite fluido é submetido a tratamentos térmicos a diversas condições de temperatura/tempo, visando, principalmente, preservar suas propriedades físico-químicas, sensoriais e nutritivas. Tratamentos a temperaturas inferiores a 100°C, de modo geral, não são suficientes para a destruição de todos os microrganismos e enzimas prejudiciais, são, entretanto, capazes de manter as características do leite por poucos dias. Os tratamentos a temperaturas mais elevadas podem ser suficientes para a destruição completa dos microrganismos e enzimas indesejadas, permitindo preservar o produto quase que indefinidamente. No sistema UHT (Ultra-High-Temperature) o leite é aquecido a 135-150°C por 2 a 6 segundos, antes de ser embalado assepticamente (PINHEIRO e MOSQUIM, 1991).

Em relação aos folatos, as informações são bastante limitadas. Os pouquíssimos trabalhos que trazem algo a respeito tratam sobre alguns folatos naturalmente presentes em leites e são relativamente antigos, visto que os processos de esterilização e pasteurização e as técnicas de análise mencionadas nas publicações, estão em sua maioria, já ultrapassados (FORD, 1969; BURTON, 1970; FAVIER, 1987; BAILEY, 1988; GREGORY, 1989; HAWKES e VILLOTA, 1989; VIBERG et al, 1997). Muitos autores apontam o 5-metiltetraidrofolato como o folato majoritário presente em leites (GREGORY, 1989; RENNER et al., 1989; PARODI, 1997) e, portanto, os estudos foram baseados na estabilidade desse composto.

Quanto a perdas durante o processamento térmico, DONG et al. (1975) mostraram que leites submetidos a esterilização e subsequente estocagem

apresentaram uma taxa de retenção de folatos muito variável, de 0 a 80%, dependendo da raça e tipo de alimentação do animal, condições do processo, presença de vitamina C e concentração de oxigênio dissolvido durante e após o processo. BURTON et al. (1970) já haviam relatado perdas diferenciais quanto à forma do processo de esterilização, apresentou 4% de perda de folato quando foi utilizado processo direto e 10% para processo indireto, devido principalmente, segundo os autores, aos níveis de oxigênio. ANTUNES (1994) apresentou o ácido fólico como um composto relativamente estável ao processo de pasteurização do leite, confirmando os dados obtidos por SCOTT et al. (1984) que também observaram pequenas perdas ocasionadas pela pasteurização, entretanto esses autores relataram que durante o período de estocagem poderiam ocorrer perdas significativas.

Perdas de folatos durante o processo UHT são geralmente inferiores a 20%, mas perdas acima de 43% também já foram observadas (KARLIN, 1969; BURTON et al., 1967, 1970; FORD and SCOTT, 1968, FORD et al., 1969). KARLIN (1969) e FAVIER et al. (1987) avaliaram a resistência de folatos presentes em leites submetidos a processos de esterilização e pasteurização, concluindo que ambos eram responsáveis por perdas da vitamina inferiores a 20%. No entanto, FAVIER et al. (1987) observaram que os leites UHT mostraram uma diminuição significativa do conteúdo de folatos após 4 meses de estocagem, o que fez com que os autores sugerissem a fortificação com o ácido fólico, para leites UHT. Num estudo mais recente, PARODI (1997) encontrou perdas menores que 10% para o processo de pasteurização e maiores que 20% nos processos de esterilização por UHT.

Muitos autores relataram que a estabilidade dos folatos dependia principalmente das quantidades de ácido ascórbico e oxigênio presentes, o ácido ascórbico com ação protetora e o oxigênio um agente que atuaria na degradação dos folatos. FORD et al. (1969) ressaltaram a importância da remoção de oxigênio dissolvido durante o processo de esterilização, para a estabilidade dos folatos durante o aquecimento e período de estocagem, pois a remoção do oxigênio também preservaria a vitamina C. VIBERG et al. (1997) investigaram o efeito de

diferentes níveis de oxigênio na degradação térmica do 5-metiltetraidrofolato, em processamento UHT a diferentes temperaturas, 110, 120, 140 e 150°C. O efeito do oxigênio na degradação se mostrou mais pronunciado a altas temperaturas (140 e 150°C) e menos importante no processo UHT indireto a 140°C por 4 segundos. A conclusão do estudo indica que a degaseificação do leite ou outro alimento líquido, antes do tratamento térmico, tem um efeito positivo na retenção de folatos.

## MATERIAL E MÉTODO

### MATERIAL

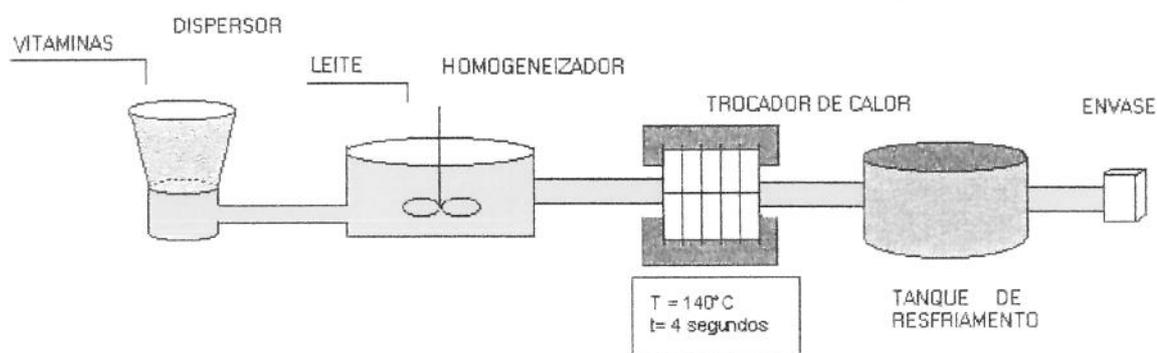
As amostras analisadas foram obtidas de quatro (4) ensaios diferentes para leites esterilizados, enriquecidos com ácido fólico e outras vitaminas hidrossolúveis. O leite cru foi obtido diretamente do produtor (Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas - CLC) e o processamento térmico foi executado na planta de esterilização localizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, de propriedade da TetraPak Ltda. Nos produtos enriquecidos, o ácido fólico não é adicionado isoladamente, portanto, para aproximar ao máximo das condições utilizadas nas indústrias, adicionou-se outras vitaminas em conjunto. Como alguns autores relatam, principalmente a proteção da vitamina C sobre o ácido fólico (BURTON, 1970; FORD, 1969), realizou-se um ensaio (teste 2) sem a presença desta e das outras vitaminas, no sentido de se observar qualquer efeito na manutenção do ácido fólico, ou não. A **Tabela 1** mostra as vitaminas e os teores adicionados em cada processamento. Para cada teste foram utilizados 100L de leite.

As concentrações de ácido fólico e demais vitaminas adicionadas aos leites, foram estimadas após pesquisa junto às empresas que comercializam os padrões. A sugestão foi para que se adicionasse 100% a mais do que deveria ser obtido ao final do processo. Verificou-se que a maioria dos fabricantes que adicionam ácido fólico a leites esterilizados declaram no rótulo do produto a quantidade de 250µg/100mL.

**Tabela1.** Quantidades de vitaminas hidrossolúveis adicionadas ao leite antes do processamento térmico.

VITAMINAS	TESTE1 (mg/100L)	TESTE 2 (mg/100L)	TESTE 3 (mg/100L)	TESTE 4 (mg/100L)
Ácido fólico	705,2	488,9	518,7	506,9
Tiamina (B1)	711,4	-	703,5	718,9
Riboflavina (B2)	906,2	-	407,3	905,3
Piridoxina (B6)	1202,8	-	1215,5	1208,5
Ácido nicotínico (PP)	8006,7	-	8124,0	8005,3
Ácido ascórbico (C)	42027,1	-	21000,0	21007,6

Após as etapas de adição das vitaminas e homogeneização, ocorreu, então, o processamento térmico. As condições de temperatura foram ligeiramente diferentes para os diferentes testes (141.0, 140.5, 140.0, e 140.3) e tiveram como tempo de esterilização quatro (4) segundos. Após o resfriamento, o produto foi então colocado em embalagens de 200mL tipo “tetrapak”. O fluxograma apresentado na **Figura 1** sintetiza as principais etapas do processamento realizado.



**Figura 1.** Fluxograma do processamento de leite com adição de vitaminas.

Para cada amostra, referente a cada teste, realizou-se duas análises, em duplicatas, do leite cru, do leite logo após os processos de adição e homogeneização, após a esterilização e envase, e durante os meses de

estocagem (3 meses), incluindo também, um estudo de resistência da vitamina à fervura do leite.

## **REAGENTES**

O ácido fólico foi doado pela M. Cassab do Brasil S.A. (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, o ácido acético, o ácido fosfórico e o hidróxido de potássio, grau analítico foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico, foi adquirido da Synth, Brasil. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas em filtros fluoropore (HAWP e HVLP 04700 MILLIPORE), com poros de 0,45 $\mu$ m de diâmetro. As demais vitaminas foram obtidas da SIGMA CHEMICAL CO., Alemanha.

## **EQUIPAMENTO**

Para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HEWLETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com 100 $\mu$ L de capacidade. Para a separação do ácido fólico foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb-MV ODS-2, 5 $\mu$ m, 150 X 4,6mm d.i. (Rainin Instrument Company), protegida por uma coluna de guarda Bondesil, C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m, 10 X 4,6mm d.i. (VARIAN). Para a detecção utilizou-se um detector de arranjo de diodos (DAD) da marca HP, série 1100. Acoplado ao sistema o software HP-Chemstation, que além de monitorar todos os componentes, permitiu o melhor tratamento dos dados analíticos.

## MÉTODO

Para a análise dos leites, utilizou-se a metodologia desenvolvida e validada para leite por CATHARINO e GODOY (2000). O conteúdo de duas embalagens foram homogeneizados previamente e tomada uma alíquota de 1,0mL, para cada determinação. O ácido fólico foi extraído com 3,0mL de solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) em banho ultra-sônico por 10 minutos. O extrato foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 10mL, ao qual foram adicionados 3,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 2,0mL de tampão fosfato composto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,25mol/L)/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,37mol/L), 350 $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético, aferindo-se o volume com tampão fosfato. Após a homogeneização por agitação, seguiram-se duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45 $\mu\text{m}$ . O filtrado foi imediatamente levado ao cromatógrafo e injetado um volume de 100 $\mu\text{L}$ .

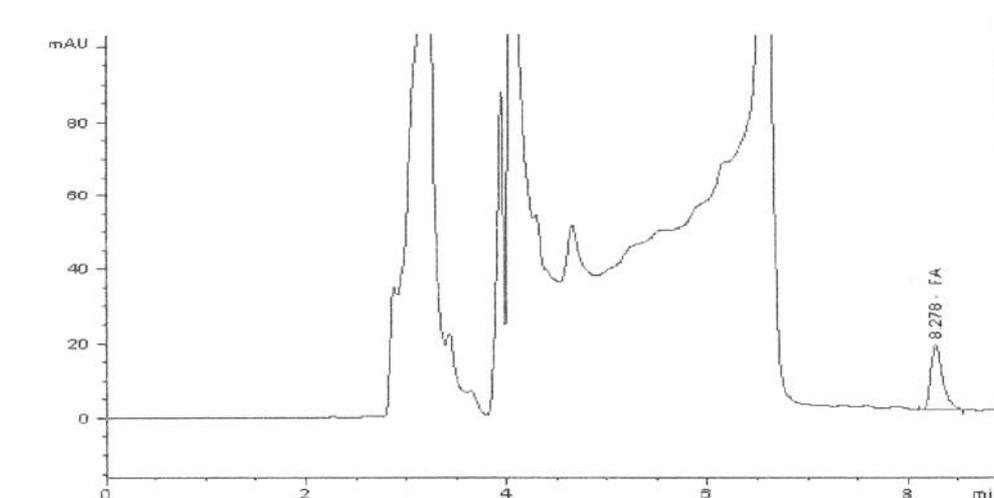
Para a separação do ácido fólico foi utilizado sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min. A fase móvel utilizada no início da corrida foi composta por 90% de tampão acetato, contendo 0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L de hidróxido de potássio (pH 2,8), e 10% de acetonitrila (v/v), chegando a 76% de tampão acetato e 24% acetonitrila (v/v) em 8,5 minutos, mantendo-se a mesma proporção até 9,0 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 7,0 minutos, antes da próxima injeção. Utilizou-se o comprimento de onda de 290nm para a detecção da vitamina. A identificação do pico do ácido fólico foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com o padrão nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos para o padrão e a amostra, com a utilização do detector de arranjo de diodos (DAD). A pureza do pico foi determinada utilizando-se o software HP-Chemstation equipado com sistema ploter. A quantificação foi feita por padronização externa, construída a curva analítica com 7 níveis de concentração (0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,50; 1,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 2** apresenta o cromatograma obtido para o leite enriquecido esterilizado. Nas condições cromatográficas utilizadas a eluição do ácido fólico (FA) ocorreu em, aproximadamente, 8,3 minutos.

No **Anexo 1** estão os perfis dos espectros de absorção do ácido fólico presente em solução padrão e nos leites analisados, obtidos no DAD. A pureza do pico correspondente ao ácido fólico foi avaliada através dos parâmetros de pureza fornecidos pelo software HP-Chemstation (**Anexo 2**), mostrando a ausência de co-eluentes.

A curva analítica traçada por padronização externa, apresentou boa linearidade na faixa de concentração de 0,01 a 1,00 $\mu$ g/mL, com coeficiente de correlação de 0,99997 (**Anexo 3**).



**Figura 2.** Perfil cromatográfico do extrato de leite esterilizado enriquecido com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 $\mu$ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0,166mol/L)(v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de tampão acetato (0,166mol/L) (v/v), mantendo-se as condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.

## Análise de estabilidade de ácido fólico durante o processo de esterilização de leites

Através dos experimentos realizados, seguidos das etapas de análise, foi possível avaliar as perdas da vitamina ocorridas após o processo de esterilização do leite. Foram observadas as perdas durante as etapas de adição e homogeneização e do tratamento térmico.

A **Tabela 2** apresenta os teores de ácido fólico adicionados e as concentrações obtidas após processo de adição e homogeneização, assim como as porcentagens de perdas. Observa-se uma grande diminuição no teor da vitamina, 54% de perda média. Esses dados mostram a importância de estudos referentes a melhor forma de adição dessa vitamina aos leites, com a utilização de equipamentos melhores projetados, que permitam a obtenção de maior eficiência nesse processo. Além disso, o processo de homogeneização ocorreu em sistema aberto, permitindo a oxidação da vitamina pelo oxigênio do ar, que em muitos estudos mostrou ser o principal promotor da degradação do ácido fólico (FORD et al, 1969; BURTON et al, 1970; DON G et al, 1975; GREGORY, 1989).

**Tabela 2.** Concentrações de ácido fólico adicionado aos leites e perdas após processo de homogeneização.

Ensaio	Concentração de ácido fólico ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )			Perda (%)
	Adicionada	Após homogeneização		
		M $\pm$ DP	CV(%)	
1	705,2	294,7 $\pm$ 0,8	0,3	58,2
2	488,9	219,2 $\pm$ 0,5	0,2	55,2
3	518,7	232,2 $\pm$ 0,3	0,1	55,2
4	506,9	259,4 $\pm$ 0,4	0,1	48,8
Média dos ensaios				54 $\pm$ 4

M  $\pm$  DP -média e estimativa de desvio padrão de determinações em duplicata  
CV- coeficiente de variação

Os dados referentes a estabilidade do ácido fólico após o tratamento térmico, estão expressos na **Tabela 3**. Nota-se pelos valores obtidos que a perda durante o processo térmico é muito menor, quando comparada aos simples

processos de adição e homogeneização, a média dos valores não ultrapassa 10% de perdas.

**Tabela 3.** Perdas de ácido fólico no processo de esterilização\*.

Ensaio	Concentração de ácido fólico ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )				Perda (%)
	Antes do UHT		Depois do UHT		
	M $\pm$ DP	CV(%)	M $\pm$ DP	CV(%)	
1	294,7 $\pm$ 0,8	0,3	274,9 $\pm$ 0,4	0,1	6,7
2	219,2 $\pm$ 0,5	0,2	197,9 $\pm$ 0,8	0,4	9,7
3	232,2 $\pm$ 0,3	0,1	207,3 $\pm$ 0,2	0,1	10,7
4	239,4 $\pm$ 0,4	0,1	211,6 $\pm$ 0,9	0,4	11,6
Média dos valores					10 $\pm$ 2

\* Condições: 140°C por 4 segundos.

M  $\pm$  DP- média e estimativa de desvio padrão de determinações em duplicata

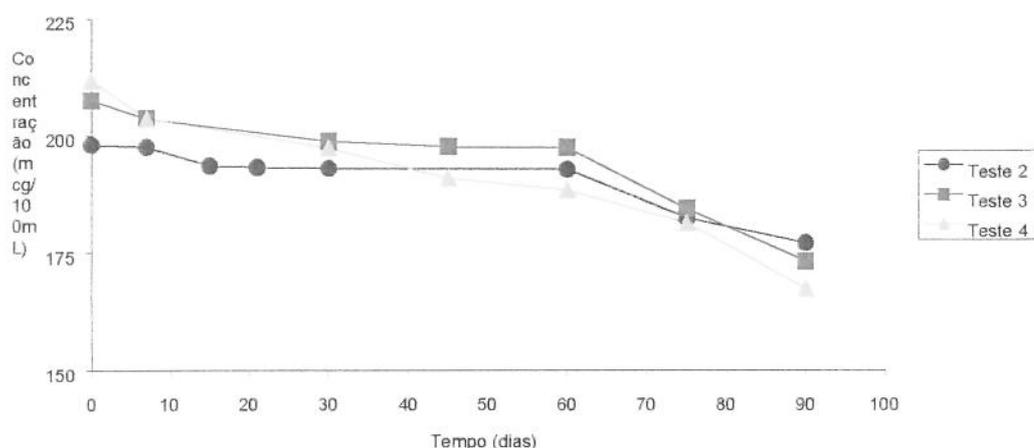
CV- coeficiente de variação

Pela análise dos resultados apresentados nas **Tabelas 2 e 3** observa-se que, aparentemente, não houve nenhuma influência da vitamina C, ausente no ensaio 2, na preservação do ácido fólico, como também qualquer tipo de influência das outras vitaminas adicionadas.

### Estudo de vida de prateleira

A **Figura 3** apresenta o comportamento, em termos de estabilidade, do ácido fólico adicionado a leites que passaram pelo processo de esterilização, desde o tempo zero, imediatamente após o tratamento térmico, até três (3) meses de estocagem, normalmente o tempo de validade desse tipo de produto. As curvas indicam que o ácido fólico se mostrou relativamente estável durante os primeiros 60 dias do período de vida de prateleira, com uma perda média da vitamina em torno de 16%, ao final de 90 dias (**Tabela 4**).

Para o teste 1 não foi possível a realização do estudo de vida de prateleira, devido a problemas relacionados ao lacre da embalagem, durante o processo envase. Cinco (5) dias após a realização do ensaio ocorreu estufamento e rompimento das embalagens e perda do produto.



**Figura 3.** Comportamento do ácido fólico durante o período de estocagem de leite esterilizado enriquecido.

**Tabela 4.** Porcentagem de perda de ácido fólico durante o período de estocagem.

Ensaio/ Data de Fabricação	Concentração de ácido fólico (µg/100mL)				Perdas (%)	
	Após fabricação		Data de análise	Após 90 dias		
	M±DP	CV(%)		M±DP	CV(%)	
2 09/09/00	197,9±0,8	0,4	09/09/00	177,1±0,7	0,4	09/12/00
3 27/09/00	207,3±0,2	0,1	27/09/00	173,2±0,8	0,5	28/12/00
4 27/09/00	211,6±0,9	0,4	27/09/00	167,5±0,9	0,5	28/12/00
Média dos valores						16 ± 5

M ± DP- média e estimativa de desvio padrão de determinações em duplicata;  
CV- coeficiente de variação

Curiosamente, observa-se que a menor porcentagem de perda do ácido fólico, durante o período de estocagem, foi exatamente obtida no ensaio 2, onde somente o ácido fólico foi adicionado, contradizendo o que diversos autores afirmam do poder de proteção do ácido ascórbico sobre o ácido fólico (FORD et al., 1969; DONG et al., 1975; KARLIN, 1969). Outra observação interessante, que vem confirmar as feitas por FINLEY e SHIPE (1968), citados por RENNER (1989), é a possível ação negativa da riboflavina sobre algumas vitaminas, de forma indireta sobre os folatos. Comparando-se os ensaios 3 e 4 obteve-se maiores perdas no ensaio 4, onde a concentração de riboflavina adicionada foi

de 905,3mg/100L, em comparação à concentração no ensaio 3, que foi de 407,3mg/100mL.

### Estudo da estabilidade do ácido fólico após aquecimento até “fervura” do leite

O hábito de ferver o leite antes de consumir é antigo, e muitas pessoas o mantêm até os dias de hoje. Para esclarecer melhor se esse tratamento térmico acarreta em perda de ácido fólico e consequente diminuição do valor nutricional, efetuou-se a análise do teor da vitamina antes e depois de efetuar a fervura. Os leites chamados nesse trabalho de testes 2, 3 e 4 foram submetidos a fervura em três diferentes ensaios e analisados em duplicatas. Aproximadamente, 400mL de leite foram colocados em uma leiteira (13cm de diâmetro X 13cm de altura) e deixados no fogo direto até levantar fervura. Antes do processo de extração, o leite foi deixado esfriar até a temperatura ambiente, aproximadamente por 1 hora. Os dados obtidos encontram-se na **Tabela 5**. O simples aquecimento do leite até a fervura, praticamente, não promoveu a perda da vitamina, que em média foi inferior a 1%. As diferenças observadas na concentração de ácido fólico, dentro do mesmo ensaio, se justificam pela tomada de amostra em diferentes tempos, dentro do período de estocagem.

**Tabela 5.** Porcentagem de perda de ácido fólico após a fervura do leite.

Ensaio	Concentração de ácido fólico ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )				Perda (%)
	Antes da fervura		Após fervura		
	M $\pm$ DP	CV(%)	M $\pm$ DP	CV(%)	
2	193,2 $\pm$ 0,4	0,2	192,8 $\pm$ 0,7	0,4	0,3
	182,5 $\pm$ 0,5	0,3	181,1 $\pm$ 0,6	0,3	0,8
	177,1 $\pm$ 0,7	0,4	175,6 $\pm$ 0,9	0,5	0,8
3	207,3 $\pm$ 0,2	0,1	206,9 $\pm$ 0,9	0,4	0,2
	197,6 $\pm$ 0,6	0,3	197,0 $\pm$ 0,1	0,1	0,3
	184,5 $\pm$ 0,1	0,1	183,6 $\pm$ 0,7	0,4	0,5
4	211,6 $\pm$ 0,9	0,4	210,3 $\pm$ 0,6	0,3	0,6
	188,3 $\pm$ 0,5	0,3	187,8 $\pm$ 0,6	0,3	0,3
	181,4 $\pm$ 0,1	0,1	180,1 $\pm$ 0,3	0,2	0,7

M  $\pm$  DP média e estimativa de desvio padrão de determinações em duplicata;  
CV coeficiente de variação

## CONCLUSÕES

Para a matriz leite, o ácido fólico mostrou-se relativamente resistente aos tratamentos térmicos a que foi submetido. Resistiu às altas temperaturas a que foi exposto durante o processo de esterilização (140°C por 4 segundos) e ao processo de fervura. Durante o período de estocagem, (90 dias) praticamente, não houve perdas significativas da vitamina. O processo de adição e homogeneização da vitamina no leite mostrou-se como sendo o grande problema do processamento, levando a perdas superiores a 50%. Concluiu-se, então, que os leites esterilizados são bons veículos para o enriquecimento com ácido fólico.

Porém, devem ser elaborados estudos para o melhor planejamento de adição e homogeneização da vitamina a esse tipo de produto, visando melhorar a eficiência do processo, a fim de se minimizar as perdas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, A. J. Perdas de Nutrientes no Processamento de Alimentos. Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos. (1994).
- BAILEY, L.B. Factors affecting folate bioavailability. *Food Technology*. **42** (1988), p.206.
- BRANFMAN, A.R., McCOMISER, M. Rapid separation of folic acid derivatives by paired-ion high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **151** (1978), p.87.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2ed. Marcel Decker, New York: (1991).
- BURTON, H., FORD, J. E, FRANKLIN, J .G., PORTER, J. W. G. Effects of repeated heat treatments on the levels of vitamins of the B-complex in milk. *Journal of Dairy Research*. **34** (1967), p.193.
- BURTON,H., FORD,J.E.,PERKIN,A.G.,PORTER, J. W. G., SCOTT, K.J., THOMPSON,S.Y., TOOTHILL , J., EDWARDS-WEBB, J. D. Comparison of milks processed by the direct and indirect methods of ultra-high-temperature sterilization. *Journal of Dairy Research*. **37**(1970), p.529.
- CATHARINO, R. R., GODOY, H. T. Method validation for folic acid determination in enriched milk by high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (enviado).

- CLARKE, R., SMITH, A. D., JOBST, K.A., REFSUM, H., SUTTON, L., UELAND, P.M. Folate, vitamin B<sub>12</sub> and serum homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Archives of Neurology*. **11** (1998), p. 1449.
- CRANE, N.T., WILSON, D.B., COOK, D.A., LEWIS, C.J., YETLEY, E.A., RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. *American Journal of Public Health*. **85** (5) (1995), p. 660.
- CZEIZE, A.E., DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New England Journal of Medicine*. **327** (226) (1992), p. 1832.
- DALY S., MILLS, J.R., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J, KIRKE, P.N, WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet*. **350** (9092) (1997). p. 1666.
- DEVLIN, T.M. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas*. 1ed. Ed. Edgard Blücher. (1997).
- DONG, F.M., OACE, S.M. Folate concentration and pattern in bovine milk. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*. **23**(3) (1975), p.534.
- FAVIER, J. C., CHRISTIDES, J. P., POITER de COURCY, G., LÉGER, J. J. Folic acid content of foods. III. Folic acid content of different categories of milk. *Science des Aliments*. **7**(1) (1987), p. 23.
- FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 9ed. São Paulo: Atheneu, (1992).
- FORD, J.E., PORTER, J.W.G. THOMPSON, S.Y, TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J. Effects of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content in milk. *Journal of Dairy Research*. **36** (1969), p. 447.
- FORD, J. E. e SCOTT, K. J. The folic acid activity of some milk foods for babies. *Journal of Dairy Research*. **35** (1968), p. 85.
- GIOVANNUCCI, E., STAMPFER, M.J., COLDITZ, G.A., HUNTER, D.J., FUCHS, C., ROSNER, B.A. Multivitamin use, folate and colon cancer in women in the nurses healthstudy. *Ann International Medicin*. **129** (1995), p. 517.
- GLYNN, S.A., ALBANES, D., PIETINEM, P., BROWN, C.C., RAUTALAHTI, M., TANGREA, J.A. Colorectal cancer and folate status: a nested case-control study among male smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers*. **5** (1996), p. 487.
- GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Advanced in Food and Nutritional Research*. **33** (1989), p. 1.
- HAWKES, J.G, VILLOTA, R. Foliates in Foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. *Food Science and Nutrition*. **28** (6) (1989), p. 439.
- KARLIN, R. Sur la teneur en folates es laits de grand melange. *Journal International of Vitaminol*. **39** (1969), p. 359.
- KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans. (1994).
- MALINOW, M. R., DUELL, P. B., HESS, D. L., ANDERSON, P. H. KRUGER, W. D., PHILLIPSON, B. E., GLUCKMAN, R.A., BLOCK, P.C.,

- UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by Breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary disease. *New England Journal of Medicine*. **338** (15) (1998), p. 1009.
- MOSHFEH, A.J., COOK, A.J., HO, J.M., FRIDAY, J.E. Folate intakes. Food surveys Research Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, (1998).
- NIGARD, O., NORDREHAUG, J.E., REFSUM, H., UELAND, P.M., FARSTAD, M., VOLLSET, S.E. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*. **337** (1997), p. 230.
- OAKLEY, G. P. Jr., ERICKSON, J. D., ADAMS, M. J. Urgent need to increase folic acid consumption. *Journal of American Medical Association*. **274** (21) (1995), p. 1717.
- PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. *The Australian Journal of Dairy Technology*. **52** (1997), p. 109.
- PINHEIRO, A. J. R., MOSQUIM, M.C.A. V. Processamento de leite de consumo. Viçosa. (1991).
- RANG, H.P., RITTER, J. M., DALE, M. M. *Farmacologia*. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. (1997).
- RENNER, E. *Micronutrients in milk and milk-based food products*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York (1989).
- SCOTT, K. J., BISHPO, D. R., ZECHALCO, A., EDWARDS-WEBB, J.D. Nutrient content of liquid milk. II. Content of vitamin C, riboflavin, Folic acid, thiamin, vitamins B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub> in pasteurized milk as delivered to the home and after storage in the domestic refrigerator. *Journal of Dairy Research*. **51**(1) (1984), p. 51.
- TSAI, M.Y., WELGE, B.G., HANSON, N.Q., BIGNELL, M.K., VESSEY, J., SHWICHTENBERG, K., YANG, F., BULLEMER, F.E., RASMUSSEN, R., GRAHAM, K.J., Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **143** (1999),p. 163.
- ULENE, A., ULENE, V. *Vitaminas*. 1ed. Blumenal:EKO. (1995).
- VEISSEYRE, R. *Lactologia Técnica*. 2ed.Zaragoza: Editorial Acribia.(1972).
- VIBERG,U., JÄGERSTAD, M., ÖSTE, R.,SJÖHOLM, I.Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen. *Food Chemistry*. **59** (3) (1997), p. 381.



## **CAPÍTULO 4**

### **VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO EM MARGARINA, FARINHA E PÃO ENRIQUECIDOS**

Trabalho a ser submetido ao Journal of Food Science and Technology

# VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO EM MARGARINA, FARINHA E PÃO ENRIQUECIDOS

Lima, J.A. e Godoy, H.T.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
C.P. 6121 CEP 13083-970  
juliana.lima@ondefor.com.br

## RESUMO

Com a finalidade de amenizar os problemas relacionados à carência de ácido fólico, muitos produtos alimentícios estão sendo submetidos ao processo de enriquecimento. Atualmente, além de produtos lácteos e cereais, o ácido fólico também está sendo adicionado a margarina, produto bastante consumido pela população brasileira além, da possibilidade de ser adicionado à farinha de trigo utilizada principalmente para a confecção de pães, prática já implantada em outros países. Portanto, tornam-se necessárias metodologias analíticas, capazes de avaliar o comportamento dessa vitamina, quando adicionada a esses produtos. Para esse estudo, a metodologia desenvolvida e validada por CATHARINO e GODOY (2000) para a análise de ácido fólico em leites, iogurte, cereais, farinhas lácteas e bebidas achocolatadas prontas para o consumo, foi validada para a margarina, farinha e pães. Para a análise do ácido fólico utilizou-se a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Para margarina o ácido fólico foi extraído com 3,0mL de solução de hidróxido de potássio 0,1mol/L em banho ultrassônico por 10 minutos, seguida por etapa de limpeza com 3,0mL de ácido fosfórico 0,1mol/L, 2,0mL de tampão fosfato 0,1mol/L e 350 $\mu$ L de ácido tricloroacético concentrado. Para a farinha e o pão utilizou-se para a extração 2,0mL de solução de hidróxido de potássio 0,1mol/L e 2,0mL de acetonitrila, sendo reduzido o volume de tampão fosfato adicionado na etapa de limpeza, para 1,0mL. No processo cromatográfico utilizou-se coluna C<sub>18</sub> e tampão acetato (0,166mol/L)/acetonitrila (90:10) (v/v) como fase móvel no início do processo, chegando a razão 76:24 em 8,5 minutos de corrida. O tempo de recondicionamento da coluna foi de 20 minutos para margarina e 10 minutos para os

outros produtos. A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos a 290nm e a quantificação, por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente com taxas de recuperação entre 92 e 98%, boa repetibilidade e 1,3ng/mL e 2,6ng/mL foram os valores determinados para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Para a avaliação da estabilidade do ácido fólico adicionado à farinha destinada a confecção de pães, analisou-se inicialmente essa farinha e posteriormente o pão. A vitamina mostrou-se razoavelmente resistente a alta temperatura utilizada no processo de assamento (160°C por 1 hora), com perdas em torno de 20%. Já para margarina, o estudo de vida-de-prateleira durante 4 meses de estocagem, resultou em perda de grande parte da vitamina (aproximadamente 55%).

### **ABSTRACT**

Aimed at reducing problems related to the loss of folic acid, many food products have been submitted to enrichment. Nowadays, besides milk products and cereals, folic acid has also been added to margarine, which is a product widely consumed by the Brazilian population, which it is possible to add folic acid to. Folic acid has been added to flour too and it is chiefly used for baking bread, a practice already established in some other countries. Therefore, there is a need for the analytical HPLC methodology developed and adapted by CATHARINO and GODOY (2000) for the analysis of folic acid in milks, yogurts, cereals, milky flour and ready to drink milk chocolate beverage to be validated for use in margarine, flour and bread. For margarine the folic acid was extracted using 3.0mL potassium hydroxide (0.1mol/L) with ultrasonic vibration, followed by a clean-up step with 3.0mL of phosphoric acid (0.1mol/L), 2.0mL of phosphate buffer (0.1mol/L) and 350µL of trichloroacetic acid. For flour and bread 2.0mL potassium hydroxide (0.1mol/L) and 2.0mL of acetonitrile was used for extraction, reducing the quantity of phosphate buffer added in the clean-up step to 1.0mL. In the chromatographic step a C<sub>18</sub> column was used with a mobile-phase of acetate buffer (0.166 mol/L)/

acetonitrile (90:10) (v/v), changing to acetate buffer and acetonitrile (76:24) (v/v) after 8.5 minutes of run. The time for column re-equilibration was 20 minutes for margarine and 10 minutes for the other products. Detection was obtained using a diode array detector (290nm) and quantified using external standards. The method was efficient with recuperation rate between 92 and 98% and nice repeatability. The limits of detection and quantification being respectively 1,3ng/mL and 2,6ng/mL. Folic acid was show to be resistant to the high temperatures used in baking of bread (loss of about 20%), but during storage of the margarine, the greates part of the activity ,nearly 55%, was lost.

## INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos brasileira vem promovendo um grande aumento do emprego de vitaminas para o enriquecimento de vários produtos (AGOSTINI, 1996; CARVALHO, 1996), entre elas o ácido fólico, uma vitamina do complexo B, que atua bioquimicamente em importantes reações de transporte de carbono (DEVLIN, 1997) essenciais para o bom funcionamento do organismo. Os cientistas e pesquisadores, hoje, estão convencidos que o ácido fólico é indispensável à dieta humana e animal, sendo considerado como a “vitamina do futuro”. O ácido fólico está amplamente distribuído nos alimentos, principalmente em verduras frescas, fígado, leveduras e algumas frutas, no entanto, nos dias atuais, a ingestão de uma dieta insuficiente em folatos tem levado à deficiência dessa vitamina, em decorrência, principalmente das alterações nos hábitos alimentares.

Acredita-se que um dos possíveis efeitos diretamente ligados a dietas carentes de ácido fólico, e que tem surtido repercussão mundial, são as malformações congênitas, os defeitos no tubo neural de fetos e a espinha bífida, por exemplo (DEVLIN, 1997; DALY et al., 1997). Além disso, muitos estudos levam a crer que o ácido fólico previne o câncer, a anemia e doenças cardíacas

(BRODY, 1991; KATZUNG, 1994; CRANE, 1995; DALY, 1997; MALINOW et al., 1998; TSAI et al., 1999).

A preocupação com a carência de ácido fólico na alimentação de gestantes é tão grande nos EUA, que em 1998 foi criada uma campanha nacional de incentivo à ingestão de ácido fólico, cujo principal objetivo é a redução das malformações congênitas (MOSFHFEH et al., 1998) Com esse mesmo propósito, um grande estudo está sendo realizado no Chile, onde a vitamina está sendo adicionada à farinha destinada à fabricação de pães (CASTILHA, 2000).

Sem dúvida, o processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções empregadas para resolver o problema da ingestão insuficiente de ácido fólico (AUGUSTIN et al., 1982; MAXWELL, 1990; GASSIN, 1991; RANUM, 1991; WALTER, 1994). No Brasil, produtos lácteos, o próprio leite, cereais, biscoitos, farinhas, entre outros são os alimentos, preferencialmente, escolhidos para o enriquecimento com ácido fólico. Muitos desses alimentos são destinados ao público infantil, além de gestantes que têm suas necessidades de ingestão da vitamina aumentadas. Outro produto, que está sendo enriquecido com ácido fólico, e que vem ganhando o interesse da indústria, é a margarina, um produto bastante consumido pela população em geral, entretanto, com características muito diferentes dos alimentos até então enriquecidos com essa vitamina.

Embora cada vez mais aumente o número de alimentos que estão sendo enriquecidos com ácido fólico, o controle desses produtos é bastante dificultado pela ausência de boas metodologias destinadas a esse fim. A metodologia desenvolvida e validada por CATHARINO e GODOY (2000) parece ser bastante promissora, no sentido de tentar solucionar esse problema.

A avaliação da qualidade dos produtos enriquecidos com ácido fólico inclui também a averiguação da estabilidade dessa vitamina durante o processamento e estocagem dos alimentos. Essa pesquisa é de grande importância, também para a indústria, pois pode proporcionar o conhecimento da viabilidade da adição das vitaminas a determinados produtos. Uma fonte alimentar a ser enriquecida, deve apresentar consumo significativo e homogêneo pelas

diversas camadas da população e os nutrientes adicionados devem ser estáveis e biodisponíveis após o processamento e durante o período de estocagem (CARVALHO, 1994).

Entretanto, pouquíssimos são os trabalhos publicados, que avaliam a estabilidade do ácido fólico adicionado a alimentos, em geral. As poucas pesquisas mostram, em sua maioria, dados sobre a resistência de folatos, naturalmente presentes em determinados alimentos, submetidos a alguns tipos de processamentos. No que diz respeito a pães, KEAGY, et al. (1975) determinaram a estabilidade de folatos, adicionados e naturais, durante o processo de fabricação desse produto e verificaram que durante o assamento ocorreram perdas de 11 e 31% para os folatos adicionados e naturalmente presentes, respectivamente. A incorporação de aditivos como ácido ascórbico pareceu não ter influência apreciável na retenção dos folatos. Estudos durante o período de estocagem da farinha, a temperatura de 48,9°C, indicaram perdas de 40% no teor de folatos após 12 semanas, valor que permaneceu inalterado após 52 semanas. Farinhas fortificadas com ácido fólico tiveram altas taxas de retenção da vitamina, com baixíssimas perdas, nas mesmas condições. Essas diferenças podem ser atribuídas a maior instabilidade de folatos naturalmente presentes em alimentos, quando comparados ao ácido fólico adicionado. CORT et al. (1976), utilizando método microbiológico, também avaliaram a taxa de retenção do ácido fólico adicionado à farinha, utilizada para o preparo de pães, e concluíram que essa taxa ficou entre 80 e 100%.

Portanto, os objetivos desse trabalho foram principalmente a validação da metodologia para produtos como farinha, pão e margarina, com a intenção de determinar, também, o efeito do processo de assamento dos pães sobre a vitamina, assim como sua estabilidade em margarinas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAIS

#### \* Margarina

No Brasil, apenas uma empresa fabrica margarina enriquecida com ácido fólico. Três diferentes lotes foram adquiridos em supermercados da cidade de Campinas-SP, com a preocupação de se obter lotes com data de fabricação o mais recente possível, para um posterior estudo de vida de prateleira. Cada lote foi composto por duas embalagens de 250g, que tiveram o seu conteúdo homogeneizado antes da retirada de amostra para análise. As determinações foram realizadas em duplicatas.

#### \* Farinha e pão

A farinha de trigo foi adquirida em estabelecimentos comerciais de Campinas. Para o enriquecimento foi escolhida uma marca apenas. As farinhas foram analisadas para comprovar a ausência de ácido fólico e interferentes. Foram realizados quatro ensaios de fortificação, cada um utilizando 1 Kg de farinha. Após adição do ácido fólico o material foi colocado em recipientes fechados e levado a um homogeneizador por, aproximadamente, 8 horas. Após esse período, foram tomadas 2 amostras de 1,0g e realizada a análise para se determinar, não só o conteúdo de ácido fólico mas, a homogeneidade do produto.

Os pães foram fabricados de forma caseira, tendo como ingredientes a farinha enriquecida, fermento biológico, ovos, óleo, leite, água, sal e açúcar, e assados em forno convencional a temperatura de 180°C, por aproximadamente 1 hora. O rendimento do processo foi a confecção de 4 pães para cada quilo de farinha. Os pães eram deixados esfriar até a temperatura ambiente (30°C) e pelo menos 2 eram esmigalhados e homogeneizados antes da tomada da amostra. As determinações foram realizadas em duplicatas.

## REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi gentilmente cedido pela M.Cassab Comércio e Indústria LTDA, localizada na cidade de Santo Amaro-SP (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico foi obtido da Synth. A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis, antes de serem utilizadas, foram filtradas em filtros MILLIPORE (HAWP e HVLP 04700), com poros de 0,45 $\mu$ m de diâmetro.

## EQUIPAMENTO

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático com de 1 a 100 $\mu$ L de capacidade, degaseificador, bomba quaternária equipado com detector de arranjo de diodos. O sistema é controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu análise da pureza do pico de interesse e o melhor tratamento dos dados. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 $\mu$ m, 150X4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) foi utilizada para o processo cromatográfico, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m, 10X4,6mm d.i (Varian).

## MÉTODO

### \* Margarina

Para a análise do ácido fólico em margarina enriquecida, seguida do estudo de vida-de-prateleira, utilizou-se a metodologia desenvolvida por CATHARINO e GODOY (2000), validada para produtos lácteos e cereais.

Desta forma, para a extração, o conteúdo de duas embalagens (250g) foi fundido em forno de microondas convencional, por aproximadamente 15 segundos e tomado 1,0mL de margarina, após homogeneização total da amostra.

O ácido fólico foi extraído com 3,0mL de solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) em banho ultra-sônico por 10 minutos. O extrato foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10mL, adicionando-se 3,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 2,0mL de tampão fosfato, composto por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,25mol/L)/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,37mol/L), 350μL de ácido tricloroacético (TCA), aferindo-se o volume final com tampão fosfato. Seguiram-se então as etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a outra em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45μm. O filtrado foi injetado, imediatamente, no cromatógrafo a líquido (100μL).

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min, com 90% de tampão acetato (TPAC:0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L de hidróxido de potássio, a pH 2,8), e 10% de acetonitrila (ACN)(v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de TPAC e 24% de ACN, mantendo-se essa proporção até 9,0 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 20 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando-se o comprimento de onda de leitura a 290nm. A identificação da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos no DAD. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, através da curva analítica construída com 7 níveis de concentração (0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,50; 1μg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

#### **\* Farinha e pão**

Para a análise de ácido fólico na farinha e nos pães, a metodologia de extração teve que ser modificada. O ácido fólico foi extraído, de 1,0g de farinha e pão previamente homogeneizados, com 2,0mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e 2,0mL de acetonitrila por 10 minutos em banho de ultra-som. Seguiu-

se o método descrito para margarina, adicionando-se, agora, apenas 1,0mL de tampão fosfato.

As condições cromatográficas foram as mesmas descritas anteriormente, com exceção do tempo de re-equilíbrio da coluna, que foi de apenas 10 minutos.

## **VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA**

Testes de recuperação e repetibilidade foram realizados com as amostras aqui analisadas, já que a metodologia sofreu algumas modificações em relação ao método original. Limites de detecção e quantificação também foram determinados.

### **Recuperação de Padrões**

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se testes de recuperação de padrões adicionados aos produtos não enriquecidos, em dois níveis diferentes de concentração 1,5 e 0,8 $\mu$ g/g, 2,5 e 1,7 $\mu$ g/g, 3,0 e 2,1 $\mu$ g/g, para margarina, farinha e pão, respectivamente. Para margarina esses valores foram escolhidos de acordo com o teor de ácido fólico declarado no rótulo 1,12 $\mu$ g/g e para os outros produtos os teores foram baseados nas declarações de CASTILHA (2000) que afirma que 2,2 $\mu$ g/g de ácido fólico estão sendo adicionados à farinha destinada à fabricação de pães, no projeto que está sendo desenvolvido no Chile. Para as análises foram utilizados 1,0mL de margarina e 1,0g de farinha e pão. As determinações foram feitas em duplicata.

### **Repetibilidade**

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de cinco determinações, em duplicatas, nos dois níveis de concentração de ácido fólico

adicionado às matrizes. A repetibilidade foi calculada de acordo com CAULCUTT e BODDY (1983) através da equação:

$$r = t\sqrt{2.sr}$$

r = repetibilidade

sr = estimativa do desvio padrão

t = t de Student

### Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção foram estimados pela adição de quantidades conhecidas de padrão às amostras. Foi considerado o limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal com uma amplitude três vezes maior que a do ruído. O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (AGOSTINI, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Validação da metodologia

Em consequência da adaptação realizada na etapa de extração e a não validação da metodologia para produtos com altos teores de gordura, foram avaliadas as taxas de recuperação e repetibilidade para as amostras aqui analisadas.

As taxas de recuperação obtidas para margarina, farinha e pão estão apresentadas na **Tabela 1**. Os valores variaram entre 92 e 98% nos dois níveis de enriquecimento. As taxas de recuperação aqui obtidas são superiores às relatadas por KONINGS (1999) e OSSEYI et al. (1998) que obtiveram níveis de recuperação de ácido fólico de 90% para farinha e 93% para cereais, respectivamente. Esses valores indicam uma boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos presentes nos alimentos enriquecidos.

**Tabela 1.** Taxas de recuperação do padrão de ácido fólico adicionado em dois diferentes níveis de concentração à margarina, farinha e pão.

Produto	Nível I ( $\mu\text{g/g}$ )	Recuperação (%)	Nível II ( $\mu\text{g/g}$ )	Recuperação (%)
Margarina	0.8	95 $\pm$ 1	1.5	97 $\pm$ 2
Farinha	1.7	95 $\pm$ 1	2.5	97 $\pm$ 1
Pão	2.1	92 $\pm$ 1	3.0	98 $\pm$ 1

Os resultados são médias de 5 determinações em duplicata.

A **Tabela 2** apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre cinco determinações de ácido fólico, em dois diferentes níveis de concentração. Desta forma, espera-se que valores fornecidos por determinações em duplicata difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada.

Observa-se que a maior diferença entre os valores obtidos nas 5 determinações, nos dois níveis de enriquecimento, são menores que o valor de "r" calculado, comprovando a boa repetibilidade do método, quando aplicado às matrizes aqui estudadas.

Os limites de detecção para as amostras de margarina, farinha e pão foram praticamente iguais, correspondendo a 1,3ng/g, sendo portanto considerado o limite de quantificação de 2,6ng/mL (g). Os valores foram os mesmos obtidos por CATHARINO e GODOY (2000) e KONINGS (1999) que determinaram esses parâmetros em leites enriquecidos.

### **Etapa Analítica**

Os cromatogramas referentes às amostras de margarina, farinha e pão estão dispostos nas **Figuras 1**. Neles, o pico do ácido fólico aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 8 minutos. Os espectros obtidos no detector de arranjo de diodos encontram-se no **Anexo 1**. A pureza dos picos foi verificada através dos parâmetros de pureza, fornecidos pelo software HP-Chemstation (**Anexo 2**), o que confirmou a eficiência do sistema cromatográfico.

**Tabela 2.** Repetibilidade do ácido fólico adicionado a pão, farinha e margarina, em dois diferentes níveis de concentração.

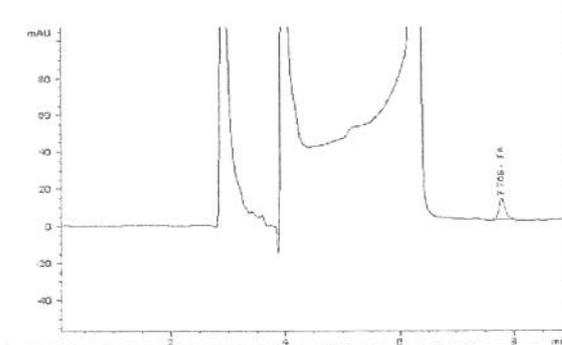
Alimento	Concentração		Repetibilidade (r)	Concentração		Repetibilidade (r)
	Nível I ( $\mu\text{g/g}$ )			Nível II ( $\mu\text{g/g}$ )		
<b>Pão</b>	1,966		0,89	2,917	0,56	
	1,943			2,834		
	1,968			2,932		
	1,964			2,872		
	1,970			2,846		
Média dos valores M $\pm$ DP CV(%)	1,96 $\pm$ 0,01	0,5		2,88 $\pm$ 0,04	1,4	
<b>Farinha</b>	2,027		0,39	1,691	0,28	
	2,046			1,691		
	2,081			1,658		
	2,049			1,672		
	2,021			1,682		
Média dos valores M $\pm$ DP CV(%)	2,05 $\pm$ 0,02	1,0		1,68 $\pm$ 0,01	0,6	
<b>Margarina</b>	1,443		0,39	0,749	0,81	
	1,433			0,759		
	1,433			0,766		
	1,472			0,761		
	1,461			0,766		
Média dos valores M $\pm$ DP CV(%)	1,45 $\pm$ 0,02	1,4		0,760 $\pm$ 0,007	0,9	

Limite de confiança de 95% (t= 2,78).

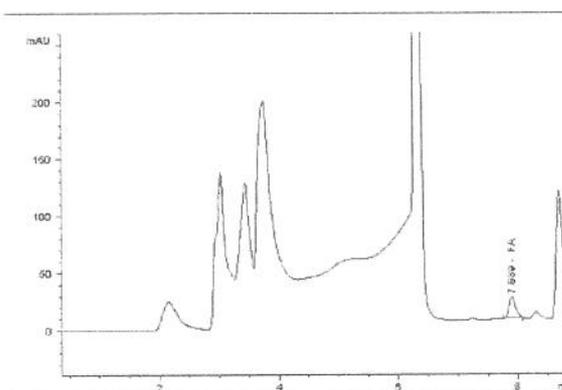
M  $\pm$  DP- média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicatas

CV- coeficiente de variação

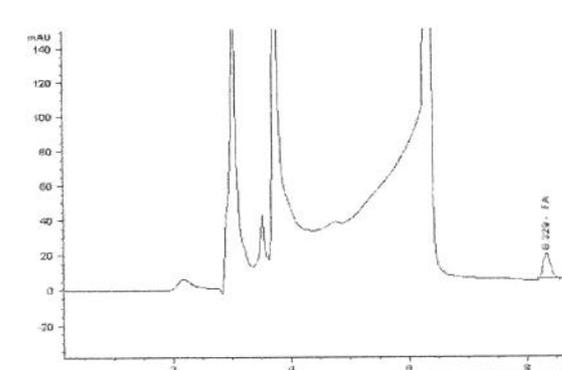
A.



B.



C.



**Figura 1:** Perfil cromatográfico do extrato de margarina (A), farinha (B) e pão (C) enriquecidos com ácido fólico (AF). Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 $\mu$ m, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0,166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de tampão acetato (0,166mol/L) (v/v), mantendo-se as condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.

Os teores de ácido fólico foram avaliados por padronização externa, tendo a curva analítica apresentado boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99997 (**Anexo 3**).

**\* Margarina**

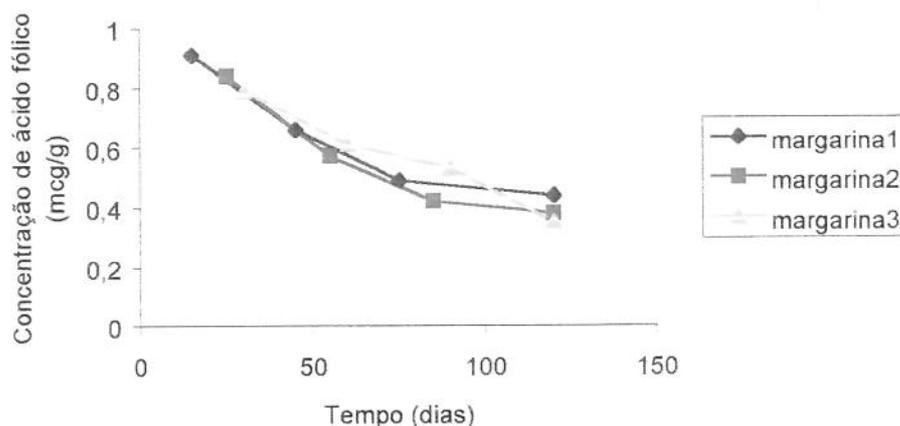
Na **Tabela 3** estão os teores encontrados nas amostras de margarina recém fabricadas e após 4 meses de estocagem, com as porcentagens de retenção. Os valores iniciais (0,85µg/g, em média) já se apresentavam abaixo do declarado no rótulo do produto (1,12µg/g). Verifica-se que a taxa de retenção média ficou em torno de 36%. A **Figura 2** ilustra o comportamento do ácido fólico na margarina durante os 4 meses de estocagem. A instabilidade observada pode ser devida aos processos oxidativos decorrentes da matriz lipídica, que segundo, GREGORY (1989) e HAWKES e VILLOTA (1989) seriam os principais responsáveis pela degradação do ácido fólico. Não foi encontrado na literatura nenhum artigo a respeito da adição de ácido fólico em qualquer produto com altos teores de gordura, para fins de comparação.

**Tabela 3.** Teores de ácido fólico em margarina enriquecida e porcentagem de retenção após estocagem.

Lotes/ Data de fabricação	Concentração de ácido fólico (µg/g)				Retenção (%)
	Após a fabricação M± DP CV(%)	Data da análise	Após estocagem M ± P CV(%)	Data da análise	
1 28/09/00	0,91 ± 0,01 1	20/10/00	0,44 ± 0,01 6	20/01/00	48,3
2 17/09/00	0,84 ± 0,02 2	20/10/00	0,38 ± 0,01 2	20/01/00	45,2
3 04/09/00	0,79 ± 0,01 1	20/10/00	0,35 ± 0,03 2	20/01/00	44,3
Média entre os lotes	0,85 ± 0,06 7		0,39 ± 0,05 13		46 ± 2

M ± DP- média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicatas

CV- coeficiente de variação



**Figura 2:** Perfil da degradação de ácido fólico em margarina enriquecida.

### \* Farinha e pão

Para a análise da estabilidade de ácido fólico frente ao processo de assamento de pães enriquecidos, analisou-se, inicialmente, os teores da vitamina adicionados à farinha, a fim de verificar a eficiência durante o processo de homogeneização, além das possíveis perdas decorrentes da presença de oxigênio (GREGORY, 1989; HAWKES e VILLOTA, 1989). Não há na literatura ainda um consenso em relação à quantidade de ácido fólico adicionado às farinhas. Portanto foram definidas neste trabalho quantidades sempre inferiores às recomendadas pelo FDA (Food and Drug Administration), levando em consideração a ingestão diária de pães. Observa-se, através dos dados apresentados na **Tabela 4**, que o processo se mostrou bastante eficiente, com taxas de retenção entre 85,0 e 96,7%.

A análise do comportamento do ácido fólico no processo de assamento de pães está apresentada na **Tabela 5**, na forma de porcentagem de retenção da vitamina, durante o processo. Os valores apontam uma pequena perda decorrente do processo de fabricação do pão, em forno doméstico. As perdas médias da vitamina de 25% mostram que o ácido fólico não parece ser tão instável ao calor, como alguns pesquisadores apontam (HAWKES e VILLOTA, 1989; CARVALHO, 1996). As taxas de perda de ácido fólico observadas neste trabalho foram superiores às relatadas por KEAGY (1975) e CORT et al. (1976),

provavelmente devido a utilização de diferentes metodologias de análise, dado que para este trabalho foi utilizado método cromatográfico e para os outros método microbiológico, além das diferentes condições de tempo e temperatura utilizadas.

**Tabela 4.** Teores de ácido fólico determinados em farinha enriquecida.

Ensaio	Concentração de ácido fólico ( $\mu\text{g/g}$ )			Retenção (%)
	Adicionada à farinha	após o processo de homogeneização*		
		M $\pm$ DP	CV(%)	
1	6,0	5,8 $\pm$ 0,1	1,7	96,7
2	2,6	2,3 $\pm$ 0,1	4,3	88,5
3	2,0	1,7 $\pm$ 0,1	5,9	85,0
4	3,4	3,1 $\pm$ 0,1	3,2	91,2
<b>Média entre os ensaios</b>				<b>90,3 <math>\pm</math> 4,9</b>

\*agitação por 8 horas

M  $\pm$  DP- média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicatas

CV- coeficiente de variação

**Tabela 5.** Taxa de retenção de ácido fólico em pães enriquecidos

Ensaio	Concentração de ácido fólico ( $\mu\text{g/g}$ )				Retenção (%)
	Após o processo de homogeneização		em pães*		
	M $\pm$ DP	CV(%)	M $\pm$ DP	CV(%)	
1	5,8 $\pm$ 0,1	1,7	4,3 $\pm$ 0,2	4,7	74,1
2	2,3 $\pm$ 0,1	4,3	1,7 $\pm$ 0,1	5,9	73,9
3	3,1 $\pm$ 0,1	5,9	2,4 $\pm$ 0,1	4,2	77,4
4	3,2 $\pm$ 0,1	3,2	2,4 $\pm$ 0,2	8,3	75,0
<b>Média dos valores</b>					<b>75,1 <math>\pm</math> 1,6</b>

\*assados por 1 hora a 180°C em forno doméstico

M  $\pm$  DP- média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicatas

CV- coeficiente de variação

## CONCLUSÕES

Quanto a validação do método, pode-se concluir que tanto para margarina, como para farinha e pão, a metodologia aqui aplicada, se mostrou bastante satisfatória.

Os resultados obtidos indicam a instabilidade do ácido fólico adicionado a margarina. No momento, entende-se que esta não se mostrou um bom veículo para o enriquecimento com ácido fólico.

Já no processamento de pães, verifica-se que a vitamina permaneceu, razoavelmente, resistente. Porém, sugere-se que novos estudos sejam feitos, em outros tipos de pães, assados em fornos industriais, a fim de que também seja possível avaliar o comportamento do ácido fólico nesses processos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, T.S. Desenvolvimento de metodologia para a determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, B6, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de alimentos – UNICAMP, Campinas, 1996.
- AUGUSTIN, J., TASSINARI, P.D, FELLMAN, J.K., COLE, C. L. B vitamin content of selected cereals and baked products. **Cereal Foods World**, **27** (4): 159-161, 1982.
- CARVALHO, P.R.N. Enriquecimento de Alimentos. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1-7, 1994.
- CARVALHO, P.R.N. Estudos de vida-de-prateleira de Alimentos Enriquecidos. **Segundo seminário brasileiro de alimentos enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 5-8, 1996.
- CASTILHA, E. Comunicação pessoal, 2000.
- CATHARINO, R.R., GODOY, H. T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para a análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 2000.
- CALCUTT, R., BRODY, R. *Statistic for Analytical Chemists*. 1ed. Londres, 1983.
- CORT, W.M., BORENSTEIN, B., HARLEY, J. H., OSADCA, M., SCHEINER, J. Nutrient stability of fortified cereal products. **Food Technology**, **30**: 52-62, 1976.

- DALY S., MILLS, J.R., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE, Y.J, KIRKE, P.N, WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**, **350** (9092): 1666-1669, 1997.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
- GASSIN, A.L. Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. **Cahier Nutrition et Diététiques**, **26** (1): 85-88, 1991.
- GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Advanced in Food and Nutritional Research**, **33**: 1-101, 1989.
- HAWKES, J.G, VILLOTA, R. Folates in Foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. **Food Science and Nutrition**, **28** (6): 439-538, 1989.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KEAGY, P.M.; STOKSTAD, L.R.; FELLERS, D.A. Folacin stability during bread processing and family flour storage. **Cereal Chemistry**, **52**, 348-356, 1975.
- KONINGS, E.J.M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **Journal of AOAC International**, **82** (1): 119-127, 1999.
- MAXWELL, D.P.E. Cost-control implications of nutrients fortification. **Prepared Food**, 87-88, 1990.
- OSSEYI, E.S., WEHLING, R.L., ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, **826** (2): 235-240, 1998.
- RANUM, P. Cereal enrichment. In: **Handbook of Cereals Science and Technology**. Ed. Lowrenz, New York, 882, 1991.
- WALTER, P. Vitamin requirements and enrichment of foods. **Food Chemistry**, **49**: 113-117, 1994.

## CONCLUSÕES

A pesquisa sobre a estabilidade do ácido fólico adicionado a algumas matrizes alimentícias, submetidas a processos térmicos seguidos por período de estocagem, mostrou a ocorrência de perdas no teor da vitamina.

Para o processo de esterilização de leites, verificou-se que durante a etapa de adição da vitamina as perdas foram bastante elevadas. Já para o tratamento térmico em si, constatou-se boa resistência da vitamina, com pequena diminuição dos teores iniciais. Durante o processo de fervura do leite esterilizado, concluiu-se que as perdas da vitamina foram basicamente desprezíveis. O estudo do comportamento do ácido fólico durante o período de estocagem, 3 a 4 meses, mostrou que o teor da vitamina é diminuído.

O estudo de vida de prateleira de alguns produtos lácteos enriquecidos com ácido fólico, encontrados no mercado, apresentou um pequeno decréscimo nos teores da vitamina em leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo, ao final do prazo de validade. Porém, para leite em pó enriquecido, verificou-se uma grande diminuição na concentração de ácido fólico desde o período de fabricação, até praticamente o final do prazo de validade, 1 ano, para a maioria dos produtos. Essa diferença de resultados deve ser devida ao próprio mecanismo de degradação do ácido fólico, que deve ocorrer de forma mais acentuada em produtos com maior tempo de estocagem. Cabe ainda ressaltar que os teores declarados no rótulo das embalagens de muitos dos produtos analisados, diferiram dos valores encontrados após a análise, desde os primeiros dias de fabricação. Esses valores estavam bastante abaixo do esperado para muitos dos produtos.

Para a margarina enriquecida constatou-se que após 4 meses de estocagem, o teor de ácido fólico estava bastante alterado, apontando a instabilidade da vitamina no produto. Os valores declarados no rótulo estavam bastante diferentes dos teores avaliados, após o referido estudo de vida de

prateleira. Esse resultado indica que a margarina, talvez, não seja um bom veículo para o enriquecimento.

Nesse trabalho também avaliou-se a estabilidade do ácido fólico no processamento caseiro de pães, confeccionados com farinhas enriquecidas com ácido fólico, no qual se constatou a instabilidade da vitamina, com perdas em torno de 20%. Portanto, estudos que relacionem a ingestão da vitamina adicionada a essa matriz, com alterações na ocorrência de determinadas doenças, devem levar em consideração esse resultado, entre outros, para a correta avaliação dos dados.

Para todos os produtos avaliados observou-se a perda da vitamina nos processos térmicos e períodos de estocagem, em diferentes escalas, o que indica a necessidade de melhor planejamento nos processos de enriquecimento e avaliação das melhores condições e prazos para estocagem, buscando o entendimento dos mecanismos de degradação, além, dos possíveis fatores responsáveis por esse processo, a fim de se encontrar as melhores condições de adição e preservação da vitamina durante maior período de tempo.

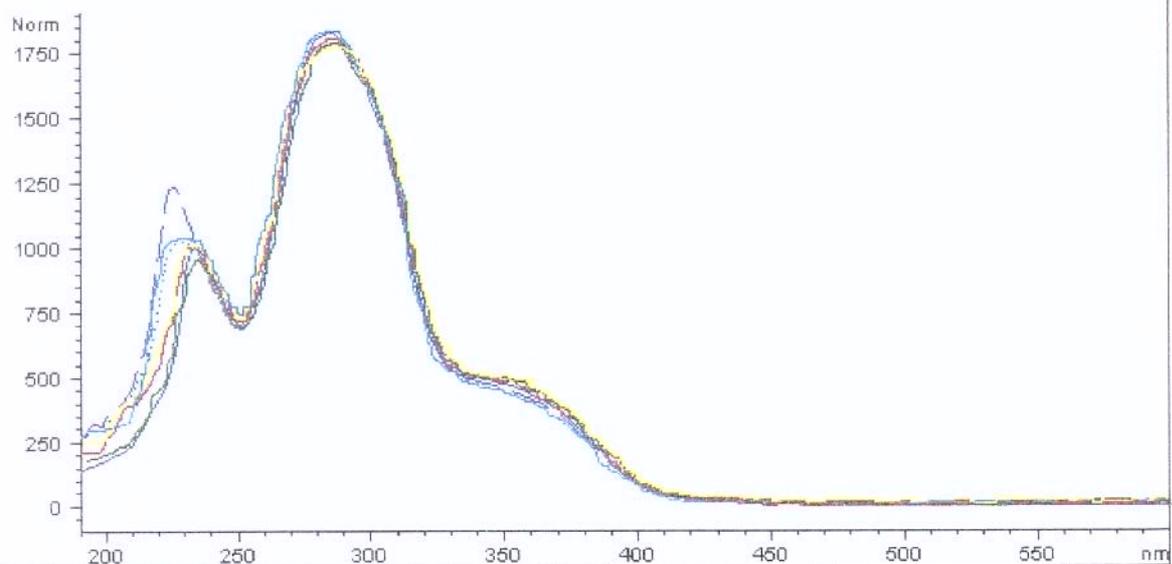
## SUGESTÕES

Sugere-se que os produtos alimentícios processados e adicionados de ácido fólico, sejam submetidos a estudos que verifiquem as melhores condições para a adição da vitamina, a fim de que as perdas sejam minimizadas, além da definição dos períodos de estocagem, que garantam a estabilidade da vitamina no produto até o final do prazo de validade.

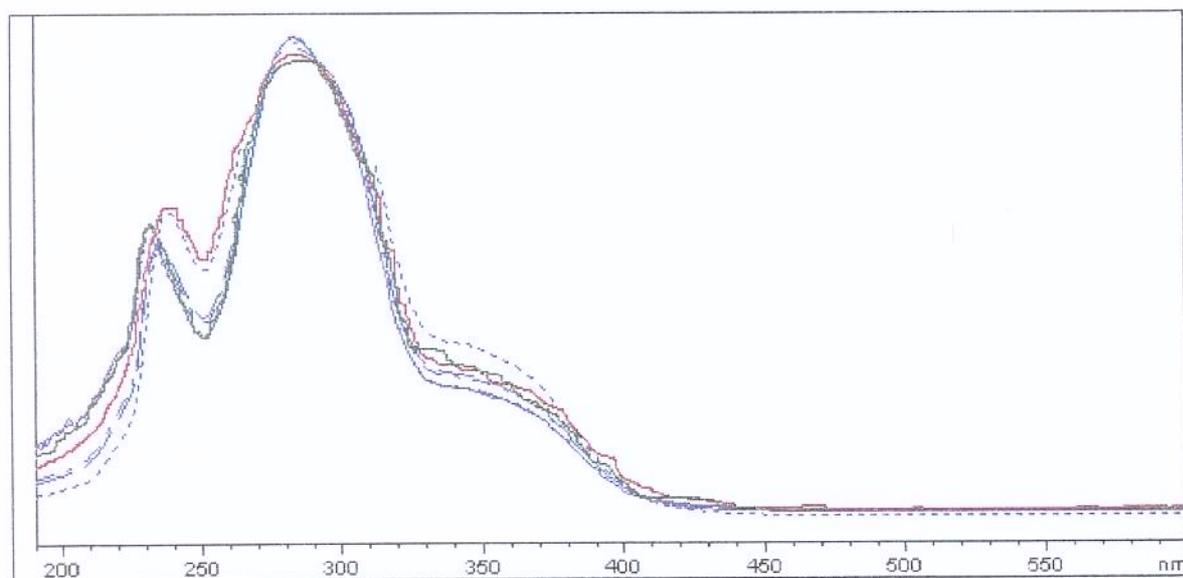
Avaliação dos mecanismos, agentes de degradação e etapas críticas dos diferentes processos, que possam vir a colaborar com planejamento das condições para preservação da vitamina, durante e após o processamento dos alimentos enriquecidos.

Estudos de estabilidade para outras matrizes enriquecidas, como por exemplo, pães processados industrialmente ou padarias, entre outros.

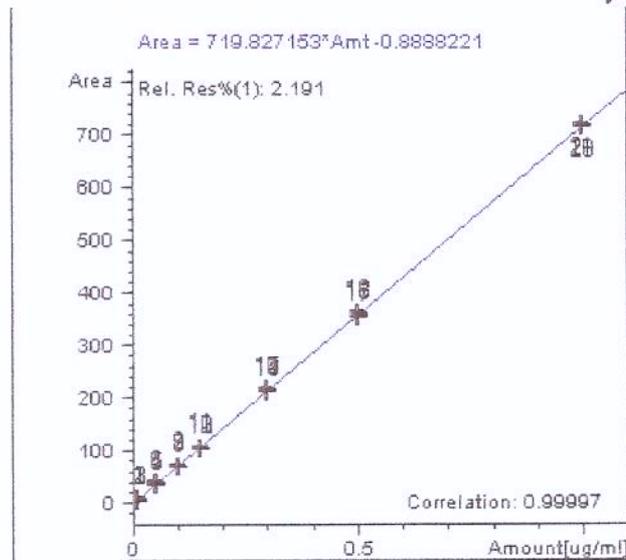
# ANEXOS



**Anexo 1:** Perfis dos espectros de absorção, obtidas através do detector de arranjo de diodos do ácido fólico em solução padrão , leite esterilizado , leite em pó , bebida láctea achocolatada , margarina , pão  e farinha .



**Anexo 2:** Espectros de absorção do ácido fólico nas matrizes analisadas, testando o grau de pureza.



Anexo 3: Curva analítica do ácido fólico obtida por padronização externa, traçada com média de triplicatas.