

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

# **ÁCIDO FÓLICO E FERRO EM ALIMENTOS**

**Elede Martins Elias**  
Farmacêutica e Bioquímica  
Mestre em Ciência de Alimentos

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

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**  
**da Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de**  
**Doutor em Ciência de Alimentos**

**Campinas-SP**  
**2010**

UNIDADE BC  
Nº CHAM EL42a  
UNICAMP  
/ 84768  
TOMBO BC/ 84768  
PROC. 16.134.10  
S D X  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 2-09-10  
CÓD. TIT. 773904

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

EL42a	Elias, Elede Martins Ácido fólico e ferro em alimentos / Elede Martins Elias. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.
	Orientador: Helena Teixeira Godoy Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
	1. Ácido fólico. 2. Ferro. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 4. Fortificação. 5. Alimentos. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Folic acid and iron in foods

Palavras-chave em inglês (Keywords): Folic acid, Iron, HPLC, Enrichment, Foods

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Juliana Azevedo Lima-Pallone

Rodrigo Scherer

Myrna Sabino

Severino Matias de Alencar

Data da defesa: 20/08/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em 20/08/2010 por Elede Martins Elias aprovada pela comissão julgadora em 20/08/2010.

Banca Examinadora

Dra. Helena Teixeira Godoy - FEA UNICAMP  
Presidente

Dra. Juliana Azevedo Lima-Pallone - FEA UNICAMP  
Membro

Dr. Rodrigo Scherer - Laboratório Tommasi Analítica  
Membro

Dra. Myrna Sabino - IAL  
Membro

Dr. Severino Matias de Alencar - USP  
Membro

Dra. Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder - LANAGRO  
Membro

Dra. Regina Prado Zanes Furlani - ITAL  
Membro

Dr. Rodrigo Ramos Catharino - FCM UNICAMP  
Membro

598720702



*"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.  
Não na vitória propriamente dita."*

*Mahatma Gandhi*



## Dedicatória

Dedico aos meus pais, Maria Thereza e Welington, que desde a minha infância prezaram pelos meus estudos. Aos meus amores, José, pelo apoio e companheirismo e meus filhos, Rodrigo e Murilo, que são a razão da minha vida.

Obrigada pelo carinho, apoio e amor.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e suas bênçãos.

A Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de alimentos e em especial ao Laboratório de Análises de alimentos pela oportunidade do desenvolvimento do meu projeto.

A CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A profa. Helena por me acolher num momento tão especial, por sua orientação, compreensão, apoio, atenção, carinho, descontração, amizade e oportunidade desta minha grande conquista. Você é especial e maravilhosa!

A banca examinadora, por terem aceitado participar da finalização deste projeto, pelas correções e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

A profa. Juliana que me ensinou, ajudou em grande parte deste trabalho e também pelo carinho e amizade.

Ao prof. Marcelo pela sua ajuda, atenção e amizade.

A todos os meus amigos do LAA, companheiros fiéis de todos os momentos, trabalho, luta e diversão, deixo aqui o meu agradecimento:

A Elizete pelos ensinamentos iniciais no HPLC e verdadeira amizade.

Ao Scherer pelos ensinamentos no HPLC e pesquisa, e aos inesquecíveis churrascos.

Ao Roger por seus ensinamentos, sua amizade, sua integridade e pelos peixinhos Beta.

A Merenice que é uma amiga guerreira e exemplo a se seguir, agradeço por grande e valiosa ajuda em todos os momentos, jamais me esquecerei.

A Romina por sua amizade e momentos divertidos nos passeios ao Shopping Dom Pedro, saudades desta minha amiga.

A Ciça por sua meiguice, pela companheira de equipe e de HPLC. Nós chegaremos lá!

A Carol, pela segurança que sempre nos transmitiu, por sua ajuda e claro pelos deliciosos pães-de-queijo.



Ao Jonas, pelos ensinamentos e a Silvia Helena pela integridade e amizade.

Ao Cosme e Marcão pelos amparos aos sistemas de ensino e pela valiosa ajuda na luta dos pós-graduandos, em especial por mim.

As minhas amigas de graduação, Paty e Érika, que são irmãs de coração. Agradeço o apoio, os almoços e a nossa eterna amizade.

As minhas amigas da minha Cidade: Gabriela, Rose, Cléo, Lucivane, Vânia e Paula pelo carinho, ajuda e amizade.

As minhas amigas, Fabiana e Rose, pela verdadeira amizade, pelo incentivo e palavras de alento e coragem.

A Ângela que é meu braço direito e que me ajuda no que de mais valioso eu tenho, meus filhos. Agradeço de coração.

As minhas irmãs, Élen e Evelin, que sempre me incentivaram. Agradeço por vocês fazerem parte da minha vida.

A toda minha família: meus tios e tias, meus primos e primas, cunhados e cunhadas e meus queridos sobrinhos e sobrinhas, agradeço pela força!

Aos meus sogros, Olga e Luquim, pela atenção, apoio, carinho e ajuda.

Aos meus pais, Maria Thereza e Welington, que me ensinaram e me deixaram o que de mais honroso eu poderia ter nesta vida, o estudo. Agradeço o total apoio, a hospedagem, o carinho e os abraços. Eu amo vocês!

Ao meu marido e companheiro, José, que fez parte deste trabalho, que me ajudou, apoiou e que por vezes teve que suportar a minha ausência. Agradeço pelo amor, pela paciência e por estar comigo em todos os momentos.

E por fim aos meus adoráveis filhos, Rodrigo e Murilo, que são o mais precioso tesouro que tenho, o meu coração e minha vida os pertencem. Beijos da Mamãe!

“Tu és responsável por aquilo que cativas”

Saint-Exupéry



**RESUMO GERAL**

Nos últimos anos, o interesse na fortificação alimentar com o ácido fólico tem crescido, em resposta principalmente aos achados de estudos epidemiológicos que relacionam a deficiência de folatos a defeitos no tubo neural, doença coronariana e anemia megaloblástica, entre outros. A deficiência de ferro é um sério problema de saúde que afeta uma grande parte da população do mundo. Muitos países, incluindo o Brasil, realizam a fortificação de alimentos, como as farinhas de trigo e milho a fim de garantir a ingestão destes nutrientes em níveis adequados ao bom funcionamento do organismo. Conseqüentemente aumentou a preocupação dos analistas em desenvolver metodologias apropriadas para a determinação do ácido fólico e ferro e o devido controle para assegurar a presença e o teor dos mesmos em alimentos enriquecidos direta ou indiretamente. No presente trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise de ácido fólico em leite e suco de soja enriquecidos, bolo de fubá e seus ingredientes (mix, farinha de trigo, fubá de milho) além da avaliação do teor de ferro por metodologia já estabelecida e validada. O ácido fólico foi extraído com tampão fosfato e hidróxido de potássio, utilizando ácido tricloroacético como agente de limpeza. No processo cromatográfico utilizou-se coluna C<sub>18</sub> e sistema de eluição por gradiente com detecção em arranjo de diodos (DAD) a 290 nm. A identificação foi feita por comparação com os tempos de retenção, co-cromatografia e espectros de absorção. A quantificação foi realizada por padronização externa. Satisfatórios resultados foram obtidos para os diferentes parâmetros analíticos tais como: linearidade com os coeficientes de correlação variando de 0,997 a 0,998; precisão

com um coeficiente de variação menor que 9,0 %; faixa de recuperação entre 92 a 106 %; e limites de detecção e quantificação, respectivamente, de 2,50 e 8,40  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  para leite e suco de soja e 2,98 e 9,00  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  para bolo de fubá e ingredientes, demonstrando portanto, ser um método eficiente, rápido e preciso para a quantificação de ácido fólico nas matrizes estudadas. Os teores de ácido fólico e ferro variaram de 41,68 a 96,96  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e 1,29 a 2,93  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  no bolo; de 130,64 a 159,66  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e 4,02 a 4,62  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  na farinha de trigo, de 174,34 a 217,32  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e 4,15 a 4,31  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  no fubá de milho e de 156,93 a 181,29  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e 4,32 a 4,44  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  no mix. Já no suco e leite de soja variaram de 17,54 a 26,27  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  e 0,88 a 1,28  $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ; 18,08 a 23,63  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  e 0,38 a 1,91  $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados indicaram, em geral, uma falta de uniformidade nos teores de ácido fólico e ferro para as farinhas, leite e suco de soja.

Palavras-chave: CLAE, ácido fólico, ferro, bolo de fubá, suco e leite de soja, fortificação alimentar.

**ABSTRACT**

In recent years, the interest in food enrichment with folic acid has grown, mainly in response to the findings related to the epidemiological studies linking folate deficiency to neural tube defects, coronary disease and megaloblastic anemia, among others. Iron deficiency is a serious health problem affecting a large proportion of the world population. Many countries, including Brazil, are realizing the fortification of foods such as wheat flour and corn to ensure the intake of these nutrients in adequate levels for the proper functioning of the body. Consequently, the concern of analysts to develop appropriate methodologies for the determination of folic acid and iron and proper control to ensure the presence and concentration in the same in enriched foods directly or indirectly is growing. In the present work a methodology was developed and validated by high performance liquid chromatography (HPLC) for analysis of folic acid in juice and soy milk, fortified cornmeal cake and its ingredients (mix, flour, corn meal) with subsequent analysis of iron using a methodology already established and validated. Folic acid was extracted with phosphate buffer and potassium hydroxide, using trichloroacetic acid as a cleaning agent. In the chromatographic process a C<sub>18</sub> column and gradient elution system with diode array detection (DAD) at 290 nm were used. The identification was made by comparison with the retention times, co-chromatography and absorption spectra. Quantification was performed by external standardization. Good results were obtained for the various analytical parameters such as linearity with correlation coefficients ranging from 0.997 to 0.998; precision with a coefficient of variation of less than 9.0 % recovery range between 92 to 106

%; and limits of detection and quantification, respectively, of 2,50 and 8,40  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  for soy milk and soy juice and 2.98 and 9.00  $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$  for cake flour and ingredients demonstrating therefore to be an efficient method for fast and accurate quantification of folic acid in the matrices studied. The levels of folic acid and iron ranged from 41,68 to 96,96  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  and 1,29 to 2,93  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in the cake, from 130,64 to 159,66  $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$  and 4,02 to 4,62  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in wheat flour, from 174,34 to 217,32  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  and 4,15 to 4,31  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in corn meal and from 156,93 to 181,29  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  and 4,32 to 4,44  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in mix. Considering juice and soy milk , it ranged from 17,54 to 26,27  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  and 0,88 to 1,28  $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ; 18,08 to 23,63  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  and 0,38 to 1,91  $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ , respectively. The results showed, in general, a lack of uniformity in the levels of folic acid and iron to flour, soy milk and juice.

Keywords: HPLC, folic acid, iron, cornmeal cake, juice and soy milk, food enrichment.

---

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO GERAL.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>ARTIGO 1 - ÁCIDO FÓLICO, FERRO E FORTIFICAÇÃO ALIMENTAR: UMA REVISÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>17</b>
2.1. ÁCIDO FÓLICO .....	14
2.2. FERRO .....	41
2.3. FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS .....	41
<b>3. Agradecimentos .....</b>	<b>45</b>
<b>4. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>46</b>
<b>ARTIGO 2 - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA A DETECÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM ALIMENTOS.....</b>	<b>59</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>61</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>63</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>65</b>
<b>2. Materiais e Método .....</b>	<b>69</b>
2.1. PRODUTOS ANALISADOS .....	69
2.2. REAGENTES.....	69
2.3. EQUIPAMENTO .....	70
2.4. METODOLOGIA.....	70
2.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	72
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>76</b>
3.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	76
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>86</b>
<b>5. Agradecimentos .....</b>	<b>86</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>87</b>

---

<b>ARTIGO 3 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO E FERRO EM BOLO DE FUBÁ, FARINHA DE TRIGO, FUBÁ DE MILHO E MIX</b> .....	91
<b>RESUMO</b> .....	93
<b>ABSTRACT</b> .....	95
<b>1. Introdução</b> .....	97
<b>2. Parte Experimental</b> .....	100
2.1. PRODUTOS ANALISADOS .....	100
2.2. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE PARA BOLO DE FUBÁ E INGREDIENTES .....	101
2.3. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO .....	101
2.4. DETERMINAÇÃO DO FERRO .....	104
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	104
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	106
<b>4. Conclusões</b> .....	115
<b>5. Agradecimentos</b> .....	116
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	117
<b>ARTIGO 4 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO E FERRO EM LEITE E SUCO DE SOJA</b> .....	119
<b>RESUMO</b> .....	121
<b>ABSTRACT</b> .....	123
<b>1. Introdução</b> .....	125
<b>2. Parte Experimental</b> .....	128
2.1. PRODUTOS ANALISADOS .....	128
2.2. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO .....	128
2.3. DETERMINAÇÃO DO FERRO .....	130
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	133
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	133
<b>4. Conclusões</b> .....	141
<b>5. Agradecimentos</b> .....	142
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	143
<b>ARTIGO 5 - EFEITO DO PROCESSO DE ASSAMENTO NO TEOR DE ÁCIDO FÓLICO E FERRO EM BOLO DE FUBÁ</b> .....	145
<b>RESUMO</b> .....	147
<b>ABSTRACT</b> .....	149
<b>1. Introdução</b> .....	151
<b>2. Parte Experimental</b> .....	154
2.1. PRODUTOS ANALISADOS .....	154

---

2.2. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE PARA BOLO DE FUBÁ E INGREDIENTES .....	154
2.3. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO .....	155
2.4. DETERMINAÇÃO DO FERRO .....	157
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	149
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>160</b>
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>167</b>
<b>5. Agradecimentos .....</b>	<b>167</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>168</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>171</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

A deficiência de vitaminas e minerais é um grave problema de nutrição e saúde pública em todo o mundo e principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, atingindo especialmente crianças em idade pré-escolar, adolescentes, gestantes e mulheres em idade fértil (UNICEF et al., 2001).

Vitaminas são compostos orgânicos biologicamente ativos, precursoras de substâncias que têm participação vital em muitas reações químicas de nossas células. São necessárias ao organismo em quantidades muito reduzidas para manutenção dos processos vitais, razão pela qual também podem ser chamadas de micronutrientes (POPPEL, 1997).

A primeira metade do século passado foi considerada a era da investigação de todas as vitaminas conhecidas, entre elas o ácido fólico. Em 1931, Lucy Wills descreveu um novo fator hematopoiético na levedura, capaz de curar a anemia macrocítica tropical na Índia (MITCHELL et al., 1941). Ao longo da década de 30 esse fator foi identificado em vários estudos experimentais isolados, mas somente em 1941, o termo ácido fólico foi utilizado para referir-se a um fator de crescimento existente no espinafre. O termo ácido fólico deriva do latim *folium*, que significa folha. Nesta mesma década (1940), foi possível isolar, cristalizar e identificar a estrutura desta vitamina, bem como elaborar formas sintéticas para o uso no tratamento de enfermidades carenciais e de anemia (LUCOCK, 2000).

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel e como tal é pouco armazenada no organismo. O ácido fólico é uma vitamina do complexo B, quimicamente denominado ácido pteroilglutâmico. Dentre as substâncias que possuem como

estrutura básica o ácido pteroilglutâmico, estão os pteroilglutamatos, os diidrofolatos, os tetraidrofolatos (THF) e os metiltetraidrofolatos, denominado folatos (LORENZI, 1991). O termo folato, encontrado na natureza, então é utilizado para designar os poliglutamatos e o termo ácido fólico é reservado para o monoglutamato sintético e/ ou ácido pteroilglutâmico (CZEIZEL 1996; DROGUETTE e PENTEADO, 2003).

O ácido fólico (AF) participa de dois processos biológicos fundamentais: atua como co-fator para as enzimas implicadas na biossíntese de RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico) e como co-fator na formação da metionina (CZEIZEL, 1996). É essencial para as reações metabólicas específicas no meio celular e vital para o funcionamento e crescimento normal do organismo (VANNUCCHI e JORDÃO, 1998).

As principais fontes de folato são os vegetais folhosos, carnes, fígados, rins, frutas, cereais, leguminosas, leveduras e cerveja (BRODY, 1991; CATHARINO, 2004). Porém, há muitos fatores que podem levar à carência dessa vitamina, incluindo a absorção e metabolismo deficientes, demanda aumentada e, principalmente, a ingestão inadequada (DEVLIN, 1997).

O ácido fólico é uma vitamina que tem despertado interesse devido aos seus efeitos em relação à prevenção de doenças como problemas cardíacos, malformações congênitas, certos tipos de câncer, mal de Alzheimer e anemia megaloblástica, entre outras (COTTER e DALLY, 2005; FOKKEMA et al., 2005; MUSKIET, 2005).

Um mineral atualmente de grande importância é o ferro, presente em todas as células do corpo, normalmente em combinação com uma proteína. Ele é um

---

componente de muitas proteínas e enzimas do corpo (MAHAN et al., 2002). O papel do ferro no organismo está intimamente associado à hemoglobina, mioglobina, outras hemoproteínas, citocromos, peroxidases e catalases, também participa na formação sanguínea e no transporte de oxigênio, sendo constituinte de várias enzimas complexas (DUTRA DE OLIVEIRA e MARCHINI, 1994; MAHAN et al., 2002). Apesar de outros nutrientes estarem envolvidos na síntese de hemoglobina, acredita-se que a maioria dos casos de anemia seja causada por deficiência de ferro, esta é, isoladamente, a mais comum das deficiências nutricionais do mundo (UNICEF et al., 2001).

Pela observação da tendência mundial em se adicionar micronutrientes nos alimentos e dos potenciais benefícios de um enriquecimento alimentar, aliada aos altos índices de anemia e ingestão deficiente de ácido fólico e ferro levaram o Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária, segundo a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornar obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, no Brasil, a partir de junho de 2004. Para cada 100 g de farinha de milho ou trigo deve conter 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro no mínimo (ANVISA, 2002).

Com o intuito de se garantir o cumprimento da legislação e de haver um melhor planejamento na fortificação em alimentos para que níveis adequados atinjam a população, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método rápido, simples e eficiente para quantificar o ácido fólico e determinar a quantidade desta vitamina e ferro em alimentos.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico**. Diário oficial da união, Brasília, 18 de dezembro de 2002. Disponível em <www.anvisa.gov.br > acesso em 09/2009.
- BRODY, T. **Folic acid In: MACHLIN, L. J. Handbook of Vitamins**. 2 ed Rev. and Expanded, New York: Marcel Decker, 1991, p. 453-490.
- CATHARINO, R.R. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Folatos em Alimentos**, 2004, 96p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2004.
- COTTER, A.M.; DALY, S.F. Neural tube defects: is a decreasing prevalence associated with a decrease in severity? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 119: 161-163, 2005.
- CZEIZEL, A.E. Ácido fólico. In: Vitaminas na gravidez e na primeira infância. **Anais Nestlé**, 53: 22-9, 1996.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1997, 1007p.
- DROGUETTI, D.C.; PENTEADO, M.V.C. Ácido fólico. In: PENTEADO, M. V. C. (Ed.) **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003, p. 487-524.
- DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. Levantamento bibliográfico de estudos bioquímicos-nutricionais sobre micronutrientes realizados no Brasil. **Cadernos de Nutrição**, 8: 31-67, 1994.
- FOKKEMA, M.R., MEIJER, W.M., DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W. Benefits and concerns regarding folic acid fortification. **Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde**, 30(3): 218-223, 2005.
- LORENZI, T.F. **Eritócitos** In: Aires, MM. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 63-74.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Molecular Genetics and Metabolism**, 71: 121-138, 2000.
- MAHAN, L. K.; ARLIN, M. T. KRAUSE **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2002, 957 p.
- MITCHELL, H. K.; SNELL, E. E.; WILLIAMS, R. J. The concentration of "folic acid". **Journal of the American Chemical Society**, 63: 2284, 1941.
- MUSKIET, F.A.J. The importance of early folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 20(3): 403-410, 2005.
- POPPEL, G. V.; VAN DEN BERG, H. Vitamins and cancer. **Cancer Letters**, 114: 15-202, 1977.
- UNICEF - UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND, UNITED NATIONS UNIVERSITY - UNU; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control**. A guide for programme managers. Geneva: WHO, 2001. 115 p. (WHO/NHD/01.3).

Disponível em: <<http://www.who.int/reproductivehealth/docs/anaemia.pdf>>.  
Acesso em: 19 Set. 2009.

VANNUCCHI H.; JORDÃO JR AA. Vitaminas hidrossolúveis. In: Dutra-de-Oliveira, JE, Marchini JS . **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998, p.191-207.



## OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

Determinar o teor de ácido fólico e ferro em bolo de fubá e produtos fortificados à base de soja.

### Objetivos específicos:

- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE para a determinação de ácido fólico.
- Aplicar a metodologia desenvolvida por CLAE e quantificar o teor de ácido fólico em alimentos.
- Quantificar o teor de ferro por absorção atômica em alimentos.
- Avaliar as perdas de ácido fólico e ferro no processo de produção de bolo de fubá.



## Artigo 1

# ÁCIDO FÓLICO, FERRO E FORTIFICAÇÃO ALIMENTAR: UMA REVISÃO

Elede Martins Elias e Helena T. Godoy \*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

\* [helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)



**RESUMO**

A deficiência de vitaminas e minerais é um grave problema de nutrição e saúde pública em todo o mundo e a fortificação alimentar é um recurso utilizado mundialmente com a finalidade de corrigir deficiências nutricionais de uma população, tendo a vantagem de alcançar uma ampla parte da população. Entre as vitaminas do complexo B destaca-se hoje, o ácido fólico, também chamado de vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>9</sub> ou M. Esta vitamina tem sido associada na prevenção de defeitos do tubo neural, doença cardiovascular, certos tipos de cânceres, mal de Alzheimer e problemas neurológicos. Dentre os micronutrientes um mineral atualmente de grande importância é o ferro, pois desempenha importantes funções no metabolismo humano, tais como transporte e armazenamento de oxigênio, reações de liberação de energia na cadeia de transporte de elétrons, conversão de ribose e desoxirribose, cofator de algumas reações enzimáticas e outras reações metabólicas essenciais. A principal consequência da deficiência de ferro a ser considerada é a anemia ferropriva. Como medida preventiva, o Brasil, segundo a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, a partir de junho de 2004. A farinha de trigo e milho são os alimentos mais utilizados para a fortificação por não apresentar mudanças organolépticas e ser de baixo custo. Entretanto, há uma grande variedade de produtos alimentícios já enriquecidos com ácido fólico e ferro, destacando-se os cereais matinais e os produtos lácteos, entre eles o leite e suco de soja. Deste modo, a fortificação de alimentos vem

ganhando cada vez mais espaço, tendo em vista uma forma de prevenir doenças e ainda agregar valor aos produtos.

Palavras-chave: ácido fólico, ferro, fortificação alimentar.

**ABSTRACT**

Vitamins and minerals deficiency is a serious problem of nutrition and public health around the world and food enrichment is a resource used worldwide for the purpose of correcting nutritional deficiencies of a population, taking the advantage of reaching a large portion of the population. Among the vitamin of B complex it is necessary to emphasize today, folic acid, also called vitamin B<sub>12</sub>, B<sub>9</sub> or M. This vitamin has been associated in the prevention of neural tube defects, cardiovascular disease, certain cancers, Alzheimer's disease and neurological problems. Among the micronutrients a mineral of great importance today is iron, thus it plays important role in human metabolism, such as transportation and storage of oxygen, reactions of energy release in the electron transportation chain, conversion of ribose and deoxyribose, a cofactor for some enzymatic reactions and other essential metabolic reactions. The main consequence of iron deficiency is considered to be iron deficiency anemia. As a precaution measure, Brazil, according to the RDC 344 of December 13, 2002 made mandatory the fortification of flour and corn grain with folic acid and iron, since June 2004. Wheat flour and maize are the foods most commonly used for fortification because they don't presenting organoleptic changes and they have low cost. However, there are a variety of food already fortified with folic acid and iron, especially the breakfast cereals and dairy products, including soy milk and soy juice. Thus, the enrichment of food is gaining more space in order to prevent disease and also to add value to products.

Keywords: folic acid, iron, food enrichment.



## 1. Introdução

As vitaminas são constituintes minoritários, porém essenciais dos alimentos (FLYNN et al., 2003). Os minerais são elementos inorgânicos amplamente distribuídos nos alimentos e que, no organismo, desempenham expressivas funções metabólicas que incluem ativação, regulação, transmissão e controle (WILLIAMS, 1997). De forma geral, os requerimentos de vitaminas e minerais podem ser adequadamente supridos por meio de uma dieta balanceada, entretanto, significativa parcela da população está exposta aos riscos associados a uma dieta contendo baixas quantidades desses micronutrientes (FLYNN et al., 2003).

A fortificação alimentar é um recurso utilizado mundialmente com a finalidade de corrigir deficiências nutricionais de uma população, tendo a vantagem de alcançar uma ampla parte da população, sem a necessidade de mudanças nos hábitos alimentares (CDC, 2000).

Na tentativa de 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 a muitos alimentos, uma vitamina que tem despertado interesse devido aos seus efeitos em relação à prevenção de doenças como problemas cardíacos, malformações congênitas, certos tipos de câncer, mal de Alzheimer e anemia megaloblástica, entre outras (KALTER, 2000; FRENCH et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2004; COTTER e DALLY, 2005; FOKKEMA, MEIJER e DE JONG-VAN DEN BERG, 2005; MUSKIET, 2005).

A labilidade característica do ácido fólico a fatores como temperatura, luz, pH, atividade de água, exposição a agentes oxidantes e lixiviação (GREGORY, 1989; ARCOT, SHRESTHA e GUSANOV, 2002; VORA et al., 2002; VORA et al., 2004), 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 do mesmo (VIBERG et al., 1997; LIMA, 2001).

Atualmente, muitos alimentos também são enriquecidos com ferro, incluindo farinhas de trigo e milho. Desde 1860, quando Boussingault admitiu o ferro como nutriente essencial, estudos sobre a anemia ferropriva e o comportamento do mineral têm sido amplamente divulgados (MAHAN e ESCOTT-STAMP, 1998).

A deficiência em ácido fólico e ferro é um problema atual e como medida preventiva, o Brasil, segundo a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, a partir de junho de 2004. Para cada 100 g de farinha de milho ou trigo deve conter 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro no mínimo (ANVISA, 2005).

A validade das estimativas usadas para determinar o potencial do impacto dos programas de fortificação é dependente da exatidão das informações a respeito da estabilidade do nutriente às condições de processamento e produção do alimento-alvo. O uso de métodos analíticos inadequados ao ácido fólico e a sobredosagem de nutrientes nos alimentos fortificados foram reconhecidas como as duas principais fontes de subestimação da estimativa de ingestão das vitaminas (FDA, 1996).

Existe um consenso geral de que os métodos tradicionais para a análise dos folatos subestimam o conteúdo do ácido fólico nos alimentos (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998; RADER, WEAVER e ANGYAL, 1998; TAMURA, 1998). Além disso, os produtores podem adicionar quantidades maiores de ácido fólico no alimento do que o valor especificado no rótulo do produto, a fim de garantir que o alimento contenha ao menos a quantidade especificada do nutriente ao final da sua vida-de-prateleira ou processamento doméstico (FDA, 1996).

## **2. Revisão Bibliográfica**

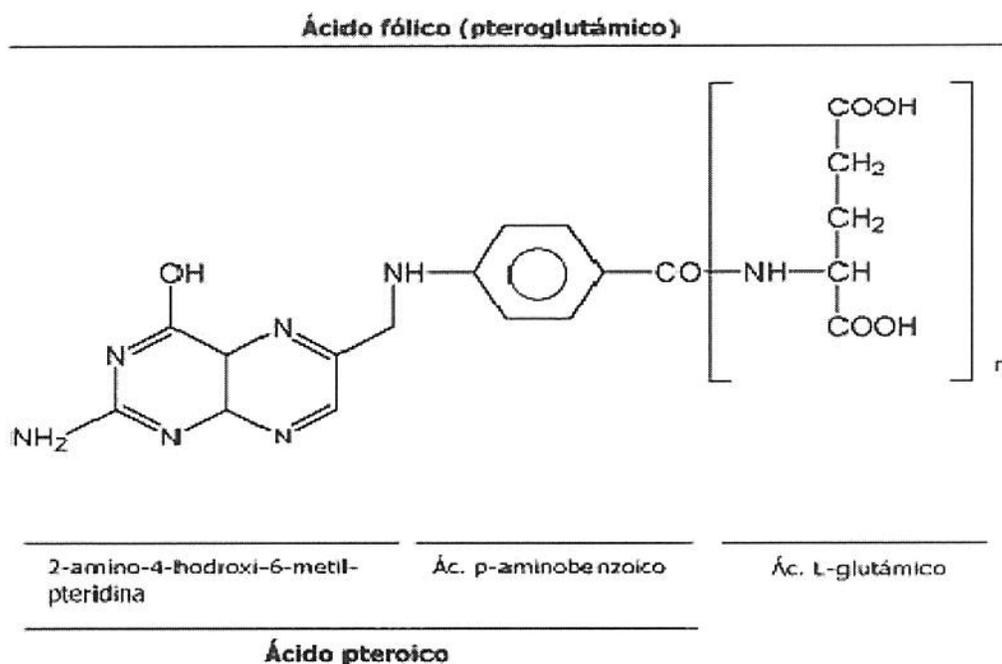
### **2.1. Ácido Fólico**

#### **2.1.1. Descrição**

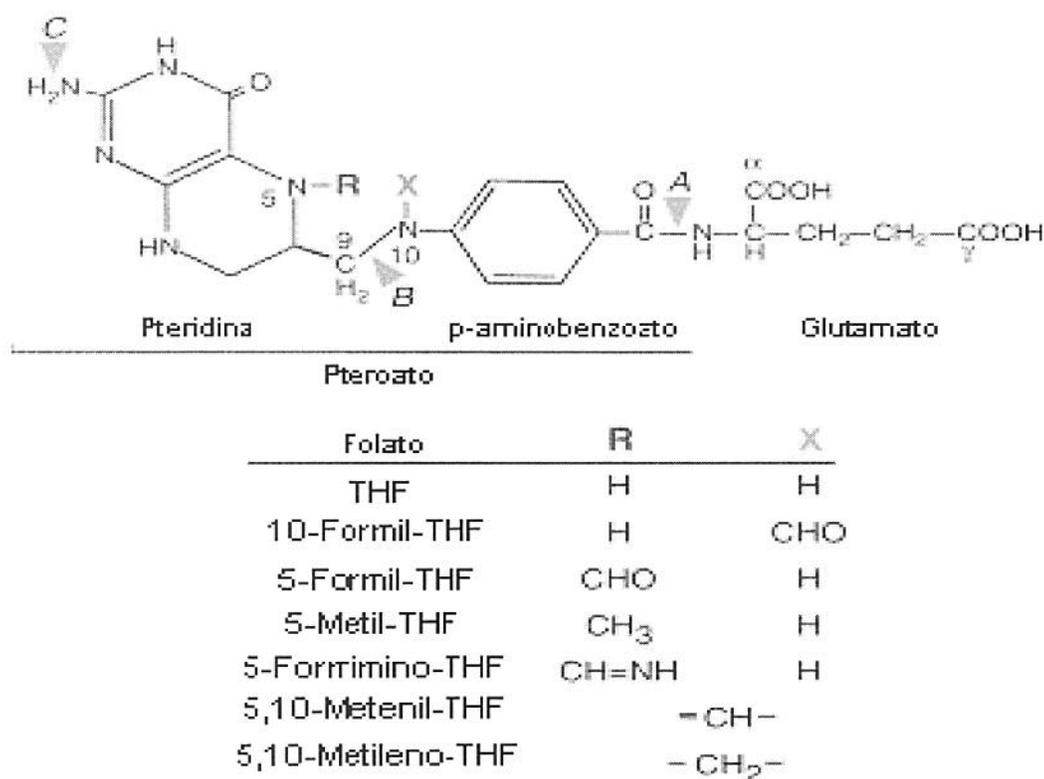
O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel que contém a estrutura do ácido pteroilmonoglutâmico, denominado de vitamina B<sub>9</sub> ou Bc. É usado para caracterizar a forma totalmente oxidada não presente naturalmente nos alimentos, enquanto que o termo folatos representa o grupo de compostos que possuem atividade vitamínica e estrutura química similar ao ácido fólico, estando naturalmente presentes nos alimentos, geralmente na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos (FRANCO, 1992; GREGORY, 1996; DE BREE et al., 1997).

### 2.1.1.1. Estrutura Química

O ácido pteroilglutâmico (PteGlu-1) (Figura 1), também conhecido como ácido fólico, possui estrutura química comum aos folatos. A maioria dos folatos naturalmente tem uma cadeia lateral de 3 a 11 resíduos de glutamato com ligação peptídica (GREGORY, 1996; SCOTT, RÉBEILLE e FLETCHER, 2000). Geralmente assume-se que aproximadamente 80% do folato alimentar existe na forma de poliglutamatos. Durante o transporte gastrointestinal, os poliglutamatos são hidrolizados a monoglutamatos, reduzidos e metilados. O ácido fólico é composto por um anel pteridina anexado a um ácido para-aminobenzoico, que por sua vez está ligado ao L-glutamato, sendo a estrutura comum dos folatos que, por sua vez, encontram-se sob diferentes formas na natureza, conforme mostra a Figura 2.



**Figura 1** – Estrutura química do ácido pteroilglutâmico - traduzida (Fonte: Gregory, 1989).



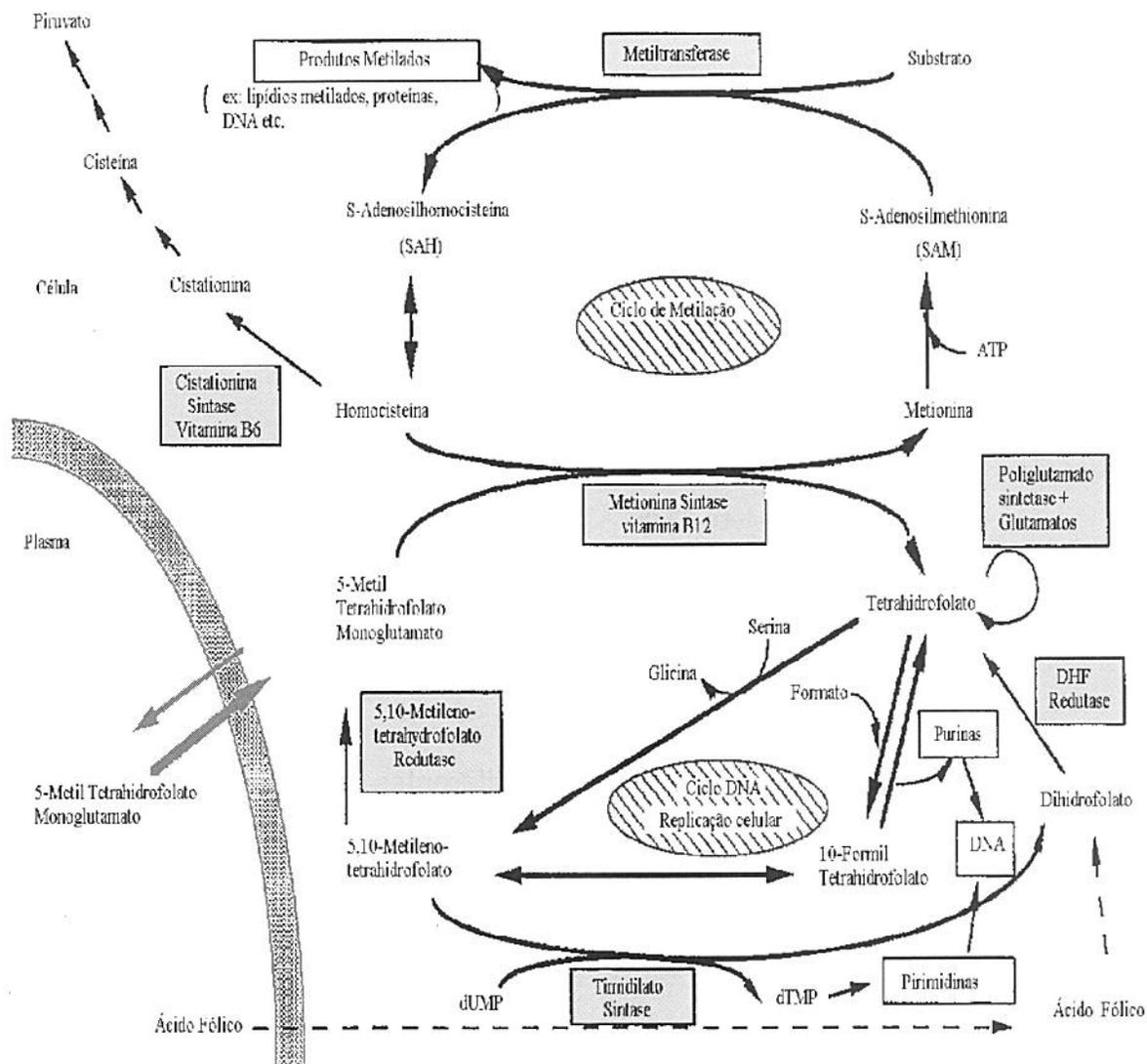
**Figura 2** – Estrutura química de algumas das diferentes formas de folatos através de seus substituintes (traduzida). Os triângulos marcam os locais onde ocorre o ataque das enzimas catalíticas (Fonte: Hanson e Gregory, 2002).

### 2.1.2. Importância

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel e como tal é pouco armazenada no organismo. É essencial para as reações metabólicas específicas no meio celular e vital para o funcionamento e crescimento normal do organismo (VANNUCCHI e JORDÃO, 1998). Os folatos participam de dois processos biológicos fundamentais: atua como co-fator para as enzimas implicadas na biossíntese de RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico) e como

co-fator na formação da metionina (CZEIZEL e DUDAS, 1992) conforme mostra a

Figura 3.



**Figura 3** – Vias metabólicas dos folatos (Fonte: Scott et al., 2000).

Quantidades adequadas de ingestão de folatos são necessárias para um metabolismo normal, divisão celular, função neural e crescimento (CHO, JOHNSON E SONG, 2002).

A deficiência desta vitamina está sendo apontada como a principal responsável pela incidência de malformações congênitas (MILUNSKY, JICK e JICK, 1989; SHAW, SCHAFFER e VELIE, 1995), os chamados defeitos do tubo neural (GREGORY, 2001; EVANS et al., 2004), que são consequência de alterações em sua configuração física durante a primeira etapa da gestação, e podem atingir dois níveis, no cérebro (podendo dar lugar a anencefalia ou a um encefalocele) ou na coluna vertebral (espinha bífida) (GONZÁLEZ e CARBALLO, 2003; CABRERA et al., 2004; RAMAEKERS e BLAU, 2004), pois no período de gestação ocorre aumento do número de células em divisão associada com o rápido crescimento do feto e da placenta (CZEIZEL e DUDÁS, 1992). Nos Estados Unidos dados de monitoramento dos nascidos vivos sugerem que o ácido fólico pode prevenir outros defeitos congênitos como fissura do palato e labial e defeitos nos membros inferiores e posteriores (CDC, 2000).

O tubo neural é formado entre os dias 21-27 após a concepção, antes de muitas mulheres perceberem que estão grávidas. Para se prevenir os defeitos do tubo neural, as mulheres devem consumir folatos em quantidades adequadas desde a fase antes da concepção até 12 semanas de gestação (revisado em STOROZHENKO et al. 2005). Segundo Charmichael et al. (2003) e Paz e Hernández-Navarro (2006), mulheres grávidas podem tornar-se deficientes, especialmente se suas dietas oferecem quantidades marginais dessa vitamina.

Os folatos também participam na produção normal das hemácias e a carência dessa vitamina na dieta pode levar à anemia megaloblástica (GREGORY, 1989; DIERKES, KROESEN e PIETRZIK, 1998; GREEN e MILLER, 1999; SCOTT, RÉBEILLE e FLETCHER, 2000; ASOK, 2005).

A deficiência dos folatos no organismo humano têm sido, cada vez mais, associada com a prevalência de doenças cardiovasculares. Níveis elevados de homocisteína plasmática estão associados com a baixa ingestão de folatos e vitamina B<sub>12</sub>. Os folatos, assim como a vitamina B<sub>12</sub>, agem sobre a homocisteína, transformando-a em metionina, aminoácido benéfico ao organismo humano (DEVLIN, 1997; MOAT, LANG e MCDOWELL, 2004; ANDRIA, SCALA e SEBASTIO, 2005). Doenças cardiovasculares representam a maior causa de morte em países ocidentais. No Brasil correspondem a 300 mil pessoas ao ano. Mais de 40 % dos pacientes com doença primária da artéria coronária, cerebrovascular ou vascular periférica têm hiper-homocisteinemia (GAULL, STURMAN e SCHAFFNER, 1974; NAIR, 2000). Há indícios de que essa possa ser a principal causa de risco de doenças coronárias e cardiovasculares (SESHADRI et al., 2002).

A homocisteína vem alcançando grande importância como fator de risco para a doença arterial coronária (WELCH e LOSCALZO, 1998; NETO e CHAGAS, 2001; RODRIGO, PASSALACQUA e ARAYA, 2003; SCHNABEL, LACKNER e RUPPRECHT, 2005), pois o alto nível de homocisteína no sangue pode aumentar a agregação de plaquetas, causando trombose e inativando anticoagulantes (MALINOW, 1994; SCHOLL e JOHNSON, 2000; WILLCOX, CATIGNANI e LAZARUS, 2003).

O ácido fólico é um importante co-fator na metilação da homocisteína que reduz a hiperhomocisteína. O nível sérico de folatos tem associação inversa com a homocisteína tanto em indivíduos saudáveis como em doentes, sendo assim um

tratamento efetivo para reduzir a homocisteína em saudáveis, juntamente com a correção da deficiência da vitamina B12 (NEVES, MACEDO e LOPES, 2004).

Além disso, estudos têm apontado os folatos como substâncias que previnem, reduzem ou retardam o surgimento de doenças degenerativas como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer (JACQUES et al., 1999; ALPERT et al., 2000).

A carência deste grupo de vitaminas vem sendo associada a doenças neurológicas por prejudicar a biossíntese de mielina, proteína que participa da biossíntese de camadas de lipídios que separam os nervos axônios (SCOTT, RÉBEILLE e FLETCHER, 2000). Estão também envolvidos na síntese dos ácidos nucléicos, as moléculas que transportam a informação genética nas células, bem como na formação das células sanguíneas e de alguns dos constituintes do tecido nervoso. Sendo assim, essenciais para o crescimento correto e para o funcionamento ótimo do sistema nervoso e da medula óssea (KATZUNG, 1994; DANG, ARCOT e SHRESTHA, 2000).

Recentemente os folatos estão sendo investigados por sua associação a certos tipos de câncer (JÄGERSTAD, JASTREBOVA e SVENSSON, 2004). Dados clínicos e epidemiológicos colocam em evidência baixos níveis de folatos associados com o aumento do risco de cânceres como o coloretal (CHOI e MASON, 2000; KIM, 2003; SHARP e LITTLE, 2004), mama (SHRUBSOLE et al., 2001; ZHANG et al., 2003; BEILBY et al., 2004), pâncreas, brônquios, cervical, assim como leucemia (revisado em LUCOCK et al., 2003).

### 2.1.3. Segurança

Ainda que o ácido fólico seja considerado livre de toxicidade e seguro, questões como interações com drogas, reações de hipersensibilidade, promoção a certos tipos de câncer, e aumento de nascimentos múltiplos tem sido relatados (EICHHOLZER et al., 2002).

Quanto à capacidade em mascarar os sintomas da deficiência da vitamina B<sub>12</sub>, cuja carência é estimada entre 10-15 % da população acima dos 60 anos de idade, o Instituto de Medicina determinou que há evidências sugestivas, mas não conclusivas, que o ácido fólico, além de mascarar a deficiência da vitamina B<sub>12</sub> levaria à uma progressão dos sintomas neurológicos causados por esta deficiência (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998; MCCARTHY, 1997).

Entretanto, Mills e colaboradores relataram que pacientes americanos com a vitamina B<sub>12</sub> abaixo do normal, mas sem anemia, era de 39 % antes da fortificação e após fortificação manteve-se em 38 %. Um outro estudo, em canadenses idosos, relatou não haver alterações significativas nos índices de vitamina B<sub>12</sub> e nenhuma evidência que o folato poderia mascarar as manifestações hematológicas de vitamina B<sub>12</sub> (LIU, 2004).

Além disso, a deficiência vitamina B<sub>12</sub> é diagnosticada atualmente não somente com dados hematológicos sozinhos, mas também por determinação séricas de vitamina B<sub>12</sub> e, possivelmente pelo ácido metilmalônico, transcobalamina II e concentração de homocisteína (SUTER, 2002).

A indicação de consumo do ácido fólico como suplemento alimentar entre os epiléticos tem sido cada vez mais comum, já que o uso prolongado de drogas

antiepiléticas está ligada ao aumento da homocisteinemia e, conseqüentemente, ao risco de arteriosclerose (HAMED e NABESHIMA, 2005). No entanto, especula-se que a vitamina em grandes quantidades pode anular o efeito antiepilético do fenobarbital, da fenitoína e da primidona e aumentar a frequência de convulsões em crianças suscetíveis (REYNOLDS, 1968).

No Canadá, os níveis plasmáticos de fenitoína foram avaliados nas populações epiléticas usuárias dos medicamentos após a implementação da lei de fortificação alimentar com o ácido fólico. Concluiu-se que a exposição desses pacientes aos níveis encontrados nos alimentos não alteraram significativamente a concentração e a meia-vida plasmática do anticonvulsivante (RAY et al., 2005).

As publicações que relacionam a suplementação com o ácido fólico durante a gravidez ao risco de aborto são poucas e inconsistentes (GEORGE et al., 2002; HOOK e CZEIZEL, 1997). Um grande estudo na China envolvendo 23.806 nascimentos não mostrou evidências de que a suplementação tenha qualquer influência no risco de aborto (GUINDLER et al., 2002).

Outros estudos sugerem a possibilidade de um aumento na ocorrência de nascimentos múltiplos. Alguns autores relacionam a implementação da fortificação alimentar a alterações na frequência do nascimento de gêmeos (SHAW et al., 2003; WALLER et al., 2003; KÄLLÉN, 2004). Contudo, associações positivas, em parte podem ser explicadas pela confusão residual da fertilização *in vitro* e estimulação ovariana, ou pelo uso de outras vitaminas em medicamentos polivitamínicos consumidos (BERRY, 2005; VOLLSET, 2005).

Embora o ácido fólico possa prevenir o câncer em pessoas saudáveis, já existem sinais que possa promover a progressão da pré-malignas e lesões

malignas (WRIGHT, FINGLAS e SOUTHON, 2001; KIM, 2004). No entanto, dados relatam que a deficiência de folato no epitélio normal de tecidos parece predispor a transformações neoplásicas (KIM, 2004).

Apesar de estudos oficiais apresentem dados divergentes, o FDA recomendou que os comprimidos orais de ácido fólico seja limitados a uma concentração de 1 mg ou menos (GOODMAN e GILMAN, 2004).

#### **2.1.4. Solubilidade**

O folato em sua forma monoglutâmica, ácido fólico, é solúvel em pH baixo, porque as espécies catiônicas são a forma dominante. Para pH 7,0 ou maior os folatos poliglutamatos são mais solúvel que o ácido fólico, devido à presença de outros grupos carboxila  $\alpha$  ionizáveis. Folatos poliglutamatos, em geral, apresentam pouca solubilidade em solventes ácidos (pH 2,0 a 4,0), devido as formas monocatiônicas serem dominantes. A solubilidade aumenta, pH acima de 4,0, quando há um aumento na concentração de espécies aniônicas. Cadeias mais longas de poliglutamatos são mais hidrofóbicas que os de cadeias mais curtas em pH mais baixos, onde o grupo  $\alpha$ -carboxila está predominantemente protonado (GREGORY, 1989).

#### **2.1.5. Estabilidade**

Na maior parte dos casos, o ácido fólico apresenta substancialmente uma maior estabilidade que os folatos na forma reduzida. Por ser uma forma barata de ser produzida sinteticamente pelas indústrias e apresentar maior estabilidade se

comparado aos folatos, o ácido fólico é a forma da vitamina utilizada em suplementos nutricionais e na fortificação de cereais matinais e farinhas (LUCOCK, 2000; SWIGLO, 2007).

O estudo da estabilidade de folatos em alimentos é dificultado pela existência de várias formas dessa vitamina. Segundo Gregory (1996) a ordem de estabilidade das formas reduzidas são: 5-formiltetrahydrofolato > 5-metiltetrahydrofolato > 10-formiltetrahydrofolato > tetrahydrofolato.

A reatividade química dos folatos tornam esta vitamina uma das mais vulneráveis para perdas durante o processamento. Fatores como temperatura, luz, pH, presença de catalisadores e agentes oxidantes são responsáveis pela degradação dos folatos (BRUBACKER, MULLER-MULLOT e SOUTHGATE, 1985; GREGORY, 1989; HAWKES e VILLOTA, 1989; BRODY, 1991; SCOTT et al., 2000).

A suscetibilidade à degradação do ácido fólico foi primeiramente demonstrada por Stokstad et al. (1948) e Hutching et al. (1948), que identificaram pterinas e aminas como produtos de oxidação e redução. Na oxidação de ácido fólico e folatos é verificada a quebra da ligação C<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>. Muitas diferenças foram observadas entre os vários folatos no que diz respeito à resistência a degradação oxidativa. A resistência à 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).

Estudando o processo de decomposição térmica do ácido fólico, Vora et al. (2002 e 2004) verificaram três estágios: inicialmente é perdida a água adsorvida, posteriormente, o ácido glutâmico e os outros constituintes da vitamina (amida e

pteridina) são degradados antes da temperatura de 195 °C. Patro et al. (2005) avaliaram um dos mecanismos de degradação oxidativa do ácido fólico, utilizando o sistema Fenton ( $\text{Fe}^{2+}$  - EDTA -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e verificaram que a exposição da vitamina a esse agente oxidante acarretou na quebra da ligação  $\text{C}_9\text{-N}_{10}$  e parece ser um dos principais mecanismos de degradação da vitamina em sistemas celulares.

Por ser uma vitamina hidrossolúvel perdas de folatos durante colheita, armazenamento, distribuição e preparo devem ser considerados (PIETRZIK, 1984; GREGORY, 1996). Metade ou até três quartos da atividade inicial do folato pode ser perdida durante estes processos (FAO/WHO, 1996). Há uma perda considerável de folato nos alimentos armazenados à temperatura ambiente, podendo perder até 70 % da sua atividade em três dias. Perdas consideráveis ocorrem também por extração para a água de cozimento, lixiviação (até 95 %), e pelo aquecimento (GREGORY, 1989; HAWKES e VILLOTA, 1989; KATZUNG, 1994; SCOTT, 2000).

Alguns estudos da estabilidade do ácido fólico adicionado a alguns alimentos já foram realizados no Brasil. Lima-Pallone, Catharino e Godoy (2006) estudaram a estabilidade do ácido fólico adicionados a leites, durante o processo de esterilização e verificaram que a oxidação térmica ocasionou perda de aproximadamente 10 % da vitamina. Durante o assamento de pães, confeccionados com farinhas enriquecidas em laboratório, Lima, Catharino e Godoy (2004) encontraram a porcentagem de degradação da vitamina em torno de 26 %.

### 2.1.6. Biodisponibilidade

A biodisponibilidade está associada à eficiência de absorção e à utilização metabólica de um nutriente ingerido. Diversos estudos têm mostrado uma conexão entre a biodisponibilidade dos folatos com a saúde humana.

Os folatos naturais, ou seja, os poliglutamatos tornam-se significativamente menos biodisponíveis que o monoglutamato, ácido fólico, adicionado ao alimento (BROWE et al., 2001; JOHANSSON et al., 2002; MCNULTY e PENTIEVA, 2004).

A absorção do folato alimentar é feita principalmente no primeiro terço do intestino delgado através de um processo ativo saturável pH dependente (SHILSME e SHIKE, 1994; HENDLER e RORVIK, 2001). Nesta absorção interferem várias enzimas conjugases presentes na mucosa do intestino que hidrolisam poliglutamatos em monoglutamatos através da redução ou da metilação dos diferentes compostos (HERBERT, 1999; O'LEARY e SHEEHY, 2001).

Portanto, acredita-se que devido à exigência de hidrólise de poliglutamatos a biodisponibilidade do monoglutamato deva ser maior (SHILSME e SHIKE, 1994; FITZPATRICK, 2003). É o que demonstra, por exemplo, o estudo de HANNON-FLETCHER et al. (2004) no qual os folatos contidos no espinafre apresentaram um potencial de biodisponibilidade em torno de 30 % quando comparado à mesma quantidade de ácido fólico. Mas alguns estudos sugerem que essa relação ainda não está bem definida (SYBESMA et al., 2003A; MCNULTY e PENTIEVA, 2004; WRIGHT e FINGLAS; 2005)

Entretanto estudos demonstram que o ácido fólico tomado com o estômago vazio é duas vezes mais disponível que o folato naturalmente encontrado nos alimentos e quando ingerido com alimentos é de 1,7 vezes mais disponível (HENDLER e RORVIK, 2001).

Por outro lado, uma grande variedade de fatores pode contribuir para a incompleta biodisponibilidade dos folatos, incluindo variáveis pré e pós-absortivas. Dentre as variáveis pré-absortivas estão, entre outros fatores, as estruturas celulares vegetais que impedem a liberação dos folatos (VAN HET HOF et al., 1999; CASTENMILLER et al., 2000) e a instabilidade gástrica dos folatos naturalmente presentes nos alimentos (SEYOUM e SELHUB, 1998). No entanto, a maior preocupação quanto a biodisponibilidade envolve a incompleta desconjugação intestinal dos poliglutamatos o que levaria a sua incompleta absorção (GREGORY et al., 1991; MELSE-BOONSTRA et al., 2004).

Os fatores pós-absortivos na biodisponibilidade dos folatos também não podem ser ignorados. De grande importância na era da fortificação alimentar, o polimorfismo do gene humano diidrofolato redutase, aparentemente está associado à reduzida expressão da enzima DHFR, responsável pela redução química do ácido fólico em dois níveis após sua absorção (COWARD et al., 1974), o que tem sido associado ao aumento do risco de surgimento de defeitos do tubo neural em crianças geradas por mães portadoras de tal deleção genética (JOHNSON et al., 2004).

### 2.1.7. Fontes

Os folatos são encontrados numa grande variedade de alimentos. O conteúdo é variável conforme o tipo, estado de maturação e parte do alimento em questão. As principais fontes são os cogumelos, rim, fígado, leveduras e vegetais (BRODY, 1991; FRANCO, 1992; QUIRÓS et al., 2005; LIMA, 2005). Também são encontrados em carnes, gema de ovo, cereais, frutas e em algumas raízes (QUIRÓS et al, 2005). Eitenmiller, também inclui os laticínios, entre eles, o leite e os lácteos fermentados como importante fonte na dieta (EITENMILLER, 1999; LIN e YOUNG, 2000). Segundo The National Findiet Study (2003), os cereais, principalmente os produtos de grãos inteiros, são os maiores contribuidores de folatos na dieta.

### 2.1.8. Doses Recomendadas

As doses diárias recomendadas se definem como os níveis de ingestão de nutrientes essenciais que são considerados adequados para satisfazer as necessidades nutricionais de toda pessoa saudável.

Para o adulto normal a ingestão diária recomendável, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é de 240 µg, enquanto as mulheres grávidas ou os pacientes com alta taxa de renovação celular podem necessitar de 355 µg /dia.

Estudos têm demonstrado que a suplementação de ácido fólico, desde três meses antes da concepção até a décima segunda semana da gestação pode prevenir a doença do tubo neural (DTN) no feto. A razão para a administração

antes da gestação se deve ao fato do tubo neural se formar entre o 25º e 27º dia após a concepção, antes que a maioria das mulheres se de conta de que estão grávidas (VILLAREAL et al., 2001). As necessidades diárias de folatos, segundo a ANVISA, estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Necessidades diárias recomendadas de folato.

<i>Categoria</i>	<i>Faixa etária</i>	<i>Folato (µg/dia)</i>
Lactentes	0 – 6 meses	48
	7 – 11 meses	48
Crianças	1 – 3 anos	95
	4 – 6 anos	118
	7 – 10 anos	177
Homens		240
Mulheres		240
Gestantes		355
Lactantes		295

Fonte: ANVISA (2005).

### 2.1.9. Métodos de análise

Para realizar a determinação de folatos, podem ser aplicados métodos biológicos, químicos, microbiológicos, imunológicos ou físicos.

Os métodos biológicos são caros e bastante demorados, além de possuir baixa repetibilidade. Entretanto não se pode esquecer que este método fornece importantes ferramentas para o estabelecimento das vias bioquímicas dos folatos no organismo (SCOTT et al., 2000).

Os métodos químicos são muito criticados principalmente pela falta de sensibilidade quando comparados aos outros métodos, além disso, a presença de muitos interferentes compromete a análise sendo muito pouco utilizados principalmente para análise quantitativa (KEAGY, 1985).

O método microbiológico é tradicionalmente utilizado para quantificar folatos através de ensaio usando *Lactobacillus*. No entanto, o ensaio microbiológico é lento, monótono e requer considerável experiência analítica, o que faz deste um método inapropriado para análises laboratoriais de rotina. Além disso, o método permite apenas a quantificação total dos folatos presentes na matriz indistintamente de suas formas químicas, naturais ou sintética (OSSEYI, WEHLING e ALBRECHT, 1998; FINGLAS et al., 1999).

Novos métodos que envolvem procedimentos bio-específicos como: ensaio por ligação a proteína enzimática (EPBA), ensaio por enzima ligada a fase imune (ELISA) e radioensaios têm algumas vantagens sobre o ensaio microbiológico. São, comparativamente, mais rápidos e menos sujeitos a variações (OSSEYI, WEHLING e ALBRECHT, 1998). No entanto, o radioensaio é mais utilizado em análises sanguíneas, já sua aplicação nas análises de alimentos é limitada. Os métodos por EPBA e ELISA são ainda técnicas novas, necessitam de certos conhecimentos do analista além de serem, em geral, mais caros que os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os métodos físicos envolvem as técnicas cromatográficas. Uma das técnicas mais empregadas para esta determinação é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), devido à possibilidade de se determinar as diferentes formas de folatos ativos, em uma única análise (KONINGS, 1999; CATHARINO, 2004). É um método rápido, altamente sensível e exato, além de fornecer a melhor resolução na separação das diversas formas bioativas presentes nos alimentos, sendo a mais usada das técnicas analíticas (AGOSTINO; 1996).

## **2.2. Ferro**

### **2.2.1. Descrição**

O ferro é um importante elemento químico, metálico, necessário à vida dos seres vivos e a fisiologia humana normal (CUNHA E CUNHA, 1998). Está presente em todas as células do corpo, sendo um componente essencial de muitas proteínas e enzimas do corpo (MAHAN e ARLIN, 2002). Quase dois terços do ferro no corpo é encontrado na hemoglobina, a proteína dos glóbulos vermelhos que transporta oxigênio para os tecidos. Pequenas quantidades de ferro encontram-se na mioglobina, uma proteína que ajuda a fornecer oxigênio ao músculo, e enzimas que auxiliam as reações bioquímicas. Outra parte está ligada às enzimas no interior de cada célula do organismo (CUNHA E CUNHA, 1998; MIRET, SIMPSON e MCKIE, 2003).

### **2.2.2. Biodisponibilidade**

A possibilidade do requerimento de ferro fisiológico ser atendido, por meio da dieta, depende do seu conteúdo total e da biodisponibilidade que lhe é inerente, sendo este o fator que determina a probabilidade da deficiência do mesmo. A eficiência de sua absorção depende das reservas orgânicas e da taxa efetiva da eritropoiese e de fatores exógenos, havendo um aumento da absorção na deficiência e diminuição na sobrecarga das reservas (MAHAN e ARLIN, 2002; BATISTA-FILHO e RISSIN, 2003).

O tipo de ferro presente nos alimentos é um dos principais fatores relacionados à sua biodisponibilidade. Na dieta, o ferro está presente sob duas formas, heme e não-heme. O ferro heme, ligado a hemoglobina e mioglobina, corresponde a 40% do ferro contido nos alimentos de origem animal; e o ferro não heme, compreende todas as demais formas, e está presente principalmente nos alimentos de origem vegetal (ZIJP et al., 2000). O ferro-heme é muito mais absorvido que o ferro não heme. A biodisponibilidade do ferro ingerido depende de sua fórmula química e da presença ou ausência de fatores da dieta que influenciam na sua absorção e também por fatores relacionados ao organismo (HEALTH e FAIRWEATHER-TAIT, 2002).

Cerca de 20 a 30 % do ferro heme é absorvido pelo organismo humano, podendo chegar a 40 % em casos de deficiência, e é ligeiramente afetado por outros fatores da dieta. Já o ferro não heme é absorvido entre 5 e 10 % e sua absorção é muito influenciada pelo estado nutricional relativo ao ferro do indivíduo e por fatores da dieta (ZIJP et al., 2000). Alguns inibidores seriam o ácido fítico, chás, café, farelo, ovo, fosfatos, polifenólicos, alguns temperos e fibras (HURRELL et al., 1999).

Em contrapartida, substâncias como ácido ascórbico, carne, aves e peixes, ácidos orgânicos (ex. ácido cítrico, ácido málico, ácido lático), produtos fermentados de soja, cisteína e peptídeos contendo cisteína aumentam a absorção do ferro não heme (HEALTH, FAIRWEATHER-TAIT, 2002).

Não existe, nos mamíferos, um mecanismo regulatório de excreção para o ferro. As perdas fisiológicas de ferro no homem são pequenas, principalmente pela descamação do epitélio intestinal e da pele. A homeostase desse elemento é,

portanto, regulada principalmente pela absorção e não pela excreção (CLAUD e FREITAS, 1994), por isso a necessidade individual de ferro deve ser suficiente para repor as perdas do organismo (CUNHA e CUNHA, 1998).

### **2.2.3. Administração de sais de ferro**

Recomenda-se a utilização de sais ferrosos, preferencialmente por via oral. Os sais ferrosos (sulfato, fumarato, gluconato, succinato, citrato, dentre outros) são de mais baixo custo e absorvidos mais rapidamente, porém produzem mais efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, dor epigástrica, diarreia ou constipação intestinal, fezes escuras e, em longo prazo, o aparecimento de manchas escuras nos dentes (UNICEF et al., 2001).

A partir de vários estudos têm sido sugeridas formas alternativas ao esquema convencional de suplementação com administração de doses em intervalos maiores (a cada dois ou três dias na semana ou, até mesmo, dose única semanal) ou a oferta de ferro e outros micronutrientes em sachês (ZLOTKIN et al., 2003), observando-se bons resultados, como maior adesão ao tratamento e redução dos efeitos colaterais.

Mais recentemente, tem se verificado o desenvolvimento de compostos alternativos que apresentam alta biodisponibilidade de ferro e ausência ou redução dos efeitos adversos do sulfato ferroso (CLAUD e FREITAS, 1994), como o aminoácido quelato de ferro e o ferro EDTA.

#### 2.2.4. Importância

O papel do ferro no organismo está intimamente associado à hemoglobina, mioglobina, outras hemoproteínas, citocromos, peroxidases e catalases (DUTRA DE OLIVEIRA e MARCHINI, 1994; MAHAN e ARLIN, 2002). Participa na formação sangüínea e no transporte de oxigênio, sendo constituinte de várias enzimas complexas envolvidas no processo de respiração celular, produção de adenosina trifosfato (ATP), conversão catalítica do  $\beta$ -caroteno para vitamina A, síntese de purinas, transporte de lipídios no sangue, síntese de colágeno, produção de antibiótico, e desintoxicação de drogas no fígado (ANGELIS e CTENAS, 1993; MAHAN e ARLIN, 2002).

O ferro é um constituinte da hemoglobina. A hemoglobina é composta de quatro grupos heme contendo o mineral, cada um ligado a quatro cadeias polipeptídicas, que formam sua molécula da hemoglobina (GERMANI et al., 2001).

A deficiência de ferro decorre do balanço negativo entre o metabolismo de ferro da dieta e a demanda, por parte do organismo. Anemia nutricional é condição na qual o conteúdo de hemoglobina do sangue está abaixo dos valores considerados normais para a idade, o sexo, o estado fisiológico e a altitude, sem considerar a causa da deficiência (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS, 1972).

Apesar de outros nutrientes estarem envolvidos na síntese de hemoglobina, acredita-se que a maioria dos casos de anemia seja causada por deficiência de ferro. Esta é, isoladamente, a mais comum das deficiências nutricionais do mundo

e ocorre como resultado de perda sanguínea crônica, perdas urinárias, ingestão e/ou absorção deficiente e aumento do volume sanguíneo.

Na anemia ferropriva ocorre diminuição dos níveis plasmáticos de ferro. Em escala populacional, define-se anemia como o estado em que a concentração de hemoglobina no sangue está abaixo de um nível considerado ótimo. A anemia está presente (em um indivíduo) quando a concentração de hemoglobina está abaixo de dois desvios-padrão da média de uma distribuição de uma população de referência, com a mesma idade, sexo, condição de gravidez e vivendo na mesma altitude (UNICEF et al., 2001). A tabela 2 apresenta a concentração de hemoglobina abaixo da qual a anemia está presente.

Segundo a OMS, a anemia, em termos de magnitude, constitui o principal problema carencial em escala de saúde pública no mundo. Estima-se que mais de dois bilhões de pessoas sejam anêmicas, na maioria, crianças e mulheres em fase reprodutiva, em diferentes graus de intensidade, o que corresponde a aproximadamente um terço da população do mundo (UNICEF et al., 2001).

Estudos realizados em diferentes regiões brasileiras mostram prevalências de anemia entre 34,6 e 70,4 % em menores de 24 meses, sendo as maiores prevalências encontradas principalmente em regiões mais pobres (SILVA e CAMARGOS, 2006; SILVA, PRIORE e FRANCESCHINI, 2007; ROCHA et al., 2008). No caso de gestantes, estima-se uma média nacional de prevalência de anemia em torno de 30 % (CGPAN/MS, 2007).

**Tabela 2.** Valores de concentração de hemoglobina e de hematócrito de acordo com o sexo, idade e condição de gravidez abaixo dos quais a anemia está presente.

<i>Grupos populacionais</i>	<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	<i>Hematócrito (%)</i>
Crianças de 6 a 59 meses	11,0	33
Crianças de 5 a 11 anos	11,5	34
Crianças de 12 a 14 anos	12,0	36
Mulheres não grávidas	12,0	36
Mulheres grávidas	11,0	33
Homens (>15 anos)	13,0	39

Fonte: UNICEF et al., 2001.

### 2.2.5. Fontes em alimentos

Existem duas formas de ferro na dieta: heme e não-heme. O ferro heme, derivado da hemoglobina, é encontrado em alimentos de origem animal tais como carnes vermelhas (principalmente o fígado e outras vísceras), carne de peixes, frutos do mar (como ostras, camarões e caranguejo) e aves. O ferro proveniente de alimentos vegetais é organizado em uma estrutura química denominada ferro não heme e suas principais fontes são verduras de folhas escuras (brócolis, couve e espinafre), leguminosas, grãos (feijões, lentilha, soja e outros) e cereais. (HURRELL, 1997; MAHAN e ARLIN, 2002).

### 2.2.6. Doses Recomendadas

Em média, um homem e uma mulher na mesma faixa (30 a 45 anos) necessitam de 14 mg de ferro por dia. As necessidades diárias de ferro, segundo a ANVISA, estão apresentadas na Tabela 3.

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

<i>Categoria</i>	<i>Faixa etária</i>	<i>Ferro (mg/dia)</i>
Lactentes	0 – 6 meses	0,27
	7 – 11 meses	9
Crianças	1 – 6 anos	6
	7 – 10 anos	9
Homens		14
Mulheres		14
Gestantes		27
Lactantes		15

Fonte: ANVISA (2005).

### 2.2.7. Segurança

A superdosagem de ferro é uma condição rara, ocorrendo principalmente com uso de medicamentos. Entretanto alto conteúdo de ferro tissular tem sido associado com sérias condições patológicas, incluindo doenças hepáticas e cardíacas, certos tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes e anormalidades do sistema imune (FRAGA e OTEIZA, 2002).

### 2.2.8. Métodos de análise

A determinação do elemento ferro se dá após a digestão da amostra, por via seca (cinzas) ou úmida (digestão com ácidos), seguida da determinação do elemento. Isto pode ser realizado por meio de técnicas eletroquímicas (polarografia, coulometria, condutometria, amperometria), técnicas baseadas em espectroscopia atômica (emissão, absorção, fluorescência, ressonância nuclear), técnicas colorimétricas e/ou espectrofotométricas (KASS e IVASKA, 2002; OSHTRAKH et al., 2004), técnicas cromatográficas, complexométricas, volumétricas e gravimétricas (MALOWSKA, 1996; BERMEJO et al., 2000) e ainda por eletroforese capilar (MOPPER, 1996).

As técnicas de espectrometria atômica são extensivamente empregadas para a quantificação de espécies metálicas (PEREIRA e ARRUDA, 2003). Em particular, a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) tem sido uma das técnicas mais aplicadas em uma variedade de amostras por ser uma técnica relativamente simples e apresentar baixo custo de instrumentação (TAO et al., 2003).

Nos métodos convencionais de análise, as amostras são analisadas na forma de solução. Tradicionalmente, a amostra é preparada por meio de técnicas de digestão por via úmida, tais como, fusão ou dissolução ácida (SULCEK e POVONDRA, 1989) ou por microondas (FISCHER, 1986; DOLAN e CAPAR, 2002). Soeiro et al. (2009) utilizaram o método de absorção atômica com chama para a determinação de ferro em farinhas enriquecidas.

### **2.3. Fortificação de alimentos**

A fim de prevenir doenças decorrentes da deficiência de folato (especialmente aquelas relacionados ao fechamento do tubo neural em recém-nascidos) em muitos países, tornou-se obrigatória a fortificação de certos alimentos.

De acordo com o Codex Alimentarius (1987) a fortificação de alimentos ou o enriquecimento é "a adição de um ou mais nutrientes essenciais aos alimentos com a finalidade de prevenir ou corrigir uma deficiência comprovada de um ou mais nutrientes na população ou grupo populacional", definição que deve ser distinguida do complemento, tal como definido pela FDA como "um produto tomado por via oral que contém um ou mais ingredientes alimentares destinados a

complementar a dieta." Estes ingredientes alimentares podem ser vitaminas, minerais, plantas ou ervas, aminoácidos e até mesmo substâncias tais como enzimas, tecidos de órgãos, tecidos glandulares e metabolitos (FDA, 1994).

A deficiência de vitaminas e minerais é um grave problema de nutrição e saúde pública em todo o mundo e principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, atingindo especialmente crianças em idade pré-escolar, adolescentes, gestantes e mulheres em idade fértil (UNICEF et al., 2001).

Desta forma, a fortificação de alimentos, ou seja, a adição de vitaminas e minerais a alimentos de grande consumo, visando garantir a ingestão diária recomendada, é um procedimento eficaz na prevenção da deficiência de vários micronutrientes, como do ferro e ácido fólico (BROGNOLI, 2008).

A escolha do produto alimentício para fortificação depende dos hábitos alimentares da população, dos aspectos logísticos do processo de fortificação e a relação química entre o ácido fólico e o produto a ser fortificado. O alimento mais freqüentemente escolhido tem sido a farinha de trigo (MARTINEZ, 2005).

A fortificação da farinha de trigo vem sendo realizada desde a década de 90 em El Salvador, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Nicarágua e Panamá. Os teores de ácido fólico adotados para o enriquecimento variam entre os países, como por exemplo, na Guatemala utiliza-se 0,35-0,45 mg Kg<sup>-1</sup>, no México 2,0 mg Kg<sup>-1</sup> e na Costa Rica 1,5 mg Kg<sup>-1</sup>(MARTINEZ, 2005). Em 1998, a fortificação obrigatória de produtos de cereais em grãos teve início nos Estados Unidos com 1,40 mg Kg<sup>-1</sup> de produto e no mesmo ano no Canadá com teores mínimos de 1,5 mg Kg<sup>-1</sup> de farinha de trigo (NATHOO, 2005), enquanto que no Chile começou em 2002 utilizando-se 2,20 mg Kg<sup>-1</sup> de farinha de trigo.

Depois do início da fortificação obrigatória das farinhas nos Estados Unidos, os níveis médios de folato no soro sanguíneo de mulheres em idade reprodutível mais do que dobraram. A fortificação tem sido responsável pela redução de 30 % de defeitos do tubo neural. No Canadá esta redução foi de 50 %, no Chile cerca de 70 % (MABERLY, 2005) e 44 % no México (KONDO, 2007). Resultados similares foram observados para o efeito protetor do ácido fólico em alguns países (Estados Unidos, Canadá, Chile e Austrália), verificando-se percentuais de redução da prevalência de defeitos do tubo neural na faixa de 16 a 78 % (SANTOS, 2007).

Pela observação da tendência mundial em se adicionar micronutrientes nos alimentos e dos potenciais benefícios de um enriquecimento alimentar, aliada aos altos índices de anemia e de doenças causadas pela deficiência do ácido fólico e ferro na população brasileira levaram o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, segundo a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornar obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, no Brasil, a partir de junho de 2004. Para cada 100 g de farinha de milho ou trigo deve conter 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2002).

No tocante à deficiência de ferro, uma estratégia para superar a alta prevalência de anemia causada por deficiência de ferro, em países em desenvolvimento, é também fortificar diversos produtos alimentícios (HURRELL, 1997).

A informação disponível das Américas (Norte, Sul e Central), indica que aproximadamente 94 milhões de pessoas sofrem de deficiência de ferro e/ou

anemia. Entre essa população, mulheres grávidas e crianças pré-escolares têm alta prevalência de deficiência de ferro seguida de anemia (OMS, 2006).

Estudos da OMS demonstram uma prevalência mundial de anemia ferropriva em crianças e lactentes em torno de 36 %. Estimativas da Organização Panamericana de Saúde (OPAS), com base em dados regionais, apontam o Peru como o país de maior prevalência de anemia na América Latina e Caribe (57 %), em crianças de 1 a 4 anos, seguido pelo Brasil com 35 % (FISBER et al., 2003).

No Brasil a anemia continua com prevalência elevada e indicações de tendências epidêmicas com freqüência modal de 40 a 50 % em menores de 5 anos e de 30 a 40 % em gestantes, com estudos demonstrando aumento de 116 % no período de 1974-1975 a 1995 em Pernambuco (BATISTA-FILHO e RISSIN, 2003) e aumento de cerca de 88 % na Paraíba em dez anos (OLIVEIRA et al., 2002).

Um aspecto essencial da fortificação de alimentos é a eleição do veículo alimentar. Para que um alimento possa ser um veículo potencial de fortificação, deve ser de baixo custo, de alto consumo pela população-alvo e ter um consumo padrão constante com baixo risco de excesso (FAO, 1996).

Os produtos lácteos e os cereais são considerados os principais veículos para serem fortificados com ferro (SALGUERIO et al., 2002). Leite e cereais são veículos que apresentam vantagens, porque são muito usados e bem adaptados à alimentação de crianças (STEKEL e OLIVARES, 1988). Mas existem outros produtos, tais como: sal, açúcar, condimentos e café que também fortificados com ferro (HURRELL, 1997).

O enriquecimento de alimentos é uma forma barata, prática e efetiva utilizada pela indústria de alimentos, seja para atender as recomendações regulamentadas, seja como estratégia de marketing para impulsionar a venda dos produtos (LUCOCK, 2000).

Um estudo do comportamento dos nutrientes após o enriquecimento torna-se necessário, a fim de se avaliar a quantidade presente da vitamina após o processamento e estocagem do alimento enriquecido, uma vez que tais condições podem alterar essa quantidade (PHILLIPS et al., 2005).

### **3. Agradecimentos**

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos, Laboratório de Análise de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto e a CAPES e CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

#### 4. Referências Bibliográficas

- AGOSTINO, T. S. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos**, 1996, 81p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- ALPERT, J. E.; MISCHOULON, D.; NIERENBERG, A. A.; FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, 16(7/8): 544-546, 2000.
- ANDRIA, G.; SCALA, I.; SEBASTIO, G. Health implications of homocysteine and folatos: possible preventive measures. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 15: 87-93, 2005.
- ANGELIS, R. C.; CTENAS, M. L. B. **Biodisponibilidade de ferro na alimentação infantil**. [S.l.]: Nestlé, Serviços de Informação Científica, 1993. 53 p. (Temas de Pediatria, 52).
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico**. Diário oficial da união, Brasília, 18 de dezembro de 2002. Disponível em <www.anvisa.gov.br > acesso em 09/2009.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Diário oficial da união, Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em <www.anvisa.gov.br > acesso em 09/2009.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, A.K.; GUSANOV, U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. **Food Control**, 13: 245-252, 2002.
- ASOK, C. A. Megaloblastic anemias. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Hematology. **Basic Principles and Practice**. 2 ed. Nova York: Churchill Livingstone, 2005, p. 519-556.
- BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, 19 (1): s181-s191, 2003.
- BEILBY, J.; INGRAM, D.; HAHNEL, R.; ROSSI, E. Reduced breast cancer risk with increasing serum folate in a casecontrol study of the C677T genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene. **European Journal of Cancer**, 40: 1250-1254, 2004.
- BERMEJO, P.; PEÑA, E.; DOMÍNGUEZ, R.; BERMEJO, A.; FRAGA, J. M., COCHO, J. A. Speciation of iron in breast milk and infant formulas whey by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 50: 1211-1222, 2000.
- BERRY, R.J.; KIHILBERG, R.; DEVINE, O. Impact of misclassification of in vitro fertilisation in studies of folic acid and twinning: modeling, using population based Swedish vital records. **British Medical Journal**, 330: 815-18, 2005.

- DE BREE, A.; Van DUSSELDORP, M.; BROUWER, I. A.; Van Het HOF, K.H.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. **European Journal Clinical Nutrition**, 51: 643-660, 1997.
- BRODY, T. **Folic acid In: MACHLIN, L. J. Handbook of Vitamins**. 2 ed Rev. and Expanded, New York: Marcel Decker, 1991, p. 453-490.
- BROGNOLI, A.F. et al. Gestação: Anemia ferropriva, deficiência de folato versus fortificação alimentar. **Cadernos da escola da saúde e nutrição**, 1:1-7, 2008.
- BROWE, I.A.; VAN DUSSELDORP, M.; WEST, C.E.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Bioavailability and bioefficacy of folate acid in humans. **Nutrition Research Reviews**, 14: 267-293, 2001.
- 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.
- CABRERA, R.M.; HILL, D.S.; ETHEREDGE, A.J.; FINNELL, R.H. Investigations into the etiology of neural tube defects. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, 72(4): 330-344, 2004.
- CASTENMILLER, J.J.; VAN DE POLL, C.J.; WEST, C.E.; BROWER, I.A.; THOMAS, C.M.; VAN DUSSELDORP, M. Bioavailability of folate from processed spinach in humans. Effect of food matrix and interaction with carotenoids. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 44: 163-169, 2000.
- CATHARINO, R.R. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Folatos em Alimentos**, 2004, 96p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2004.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Neural tube defect surveillance and folic acid intervention – Texas-Mexico border 1993-1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49: 1-4, 2000.
- CGPAN/MS - **Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição**, 2ª Reunião Ordinária da Câmara Setorial de Alimentos, fevereiro de 2007, Brasília - DF.
- CHARMICHAEL, S.L.; SHAW, G.M.; SELVI, S.; SCHAFFER, D.M. Diet quality and risk of neural tube defects. **Medical Hypotheses**, 60(3): 351-355, 2003.
- CHO, S.; JOHNSON, G.; SONG, W.O. Folate Content of Foods: Comparison Between Databases Compiled and After New FDA Fortification Requirements. **Journal of Food Composition Analysis**, 15: 293-307, 2002.
- CHOI, S.-W.; MASON, J. B. Folate and carcinogenesis: An integrated scheme. **Journal of Nutrition**, 130: 129-132, 2000.
- CLAUD, M. V., FREITAS, O. Compostos alternativos para o tratamento e/ou prevenção da anemia ferropriva. **Cadernos de Nutrição**, 8: 1-9, 1994.
- CODEX ALIMENTARIUS. **General principles for the addition of essential nutrient to foods**. CAG/GL 09-1987. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/299/CXG\\_009e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/299/CXG_009e.pdf). Acesso em 16/10/2009.
- COTTER, A.M.; DALY, S.F. Neural tube defects: is a decreasing prevalence associated with a decrease in severity? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 119: 161-163, 2005.

- COWARD, J.K.; PARAMESWARAN, K.N.; CASHMORE, A.R.; BERTINO, J.R.. 7,8-Dihydropteroyl oligo-gamma-L-glutamates: Synthesis and kinetic studies with purified dihydrofolate reductase from mammalian sources. **Biochemistry**, 13: 3899-3903, 1974.
- CUNHA, D.F.; CUNHA, SFC. Microminerais: In: DUTRA-DEOLIVEIRA JE & MARCHINI JS. **Ciências Nutricionais**. Sarvier; São Paulo, p. 141-165, 1998.
- CZEIZEL, 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.
- DANG, J.; ARCOT J.; SHRESTHA, A. Folate retention in select processed legumes. **Food Chemistry**, 68(3): 295-298, jan 2000.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1997, 1007p.
- DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. Intern. **Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 68: 98-103, 1998.
- DOLAN, S. P.; CAPAR, S. G. Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Journal of Food Composition Analysis**, 15: 593-615, 2002.
- DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. Levantamento bibliográfico de estudos bioquímicos-nutricionais sobre micronutrientes realizados no Brasil. **Cadernos de Nutrição**, 8: 31-67, 1994.
- EICHHOLZER, M.; LUTHY, J.; MOSER, U.; STAHELIN, H.B.; GUTZWILLER, F. Safety aspects of folic acid for the general population. **Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis**, 91: 7-16, 2002.
- EITENMILLER, R.R.; LANDEN, W.O. Folate. In: Eitenmiller RR, Landen WO, editors. **Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences**. Boca Raton, Fla.: CRC Press, p. 411-66, 1999.
- EVANS, M.I.; LLURBA, E.; LANDSBERGER, E.J.; O'BRIEN, J.E.; HARRISON, H. H. Impact of folic acid fortification in the United States: Markedly diminished high maternal serum alpha-feto-protein values. **Obstetrics and Gynecology**, 103: 474-479, 2004.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Food Fortification: technology and quality control**. Report of an FAO Technical Meeting, Rome, 20-23; 1995. FAO Food and Nutrition Paper. Rome: FAO; 1996.
- FDA - U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA)**. 1994.
- FDA - Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. **Federal Register**, 61: 8781- 8791, 1996.
- FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L. WITTHÖFT, C.; SOUTON, S., FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, 64: 245-255, 1999.

- FISBER, M; LIMA, A.M.; RHEIN, S.O.; NAUFEL, C.; RODRIGUES, C. Feijão enriquecido com ferro na prevenção de anemia em pré-escolares. São Paulo, **Revista Nutrição em Pauta**, Março/ abril, 59: 37-39, 2003.
- FISCHER, L. B. Microwave dissolution of geological material: application to isotope dilution analysis. **Analytical Chemistry**, 58(1): 261-263, 1986.
- FLYNN, A.; MOREIRAS, O.; STEHLE, P.; FLETCHER, R.J.; MULLER D.J.; ROLAND Vitamins and Minerals: A model for safe addition to foods. **European Journal of Nutrition**, 42: 118-130, 2003.
- FOKKEMA, M.R.; MEIJER, W.M.; DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W. Benefits and concerns regarding folic acid fortification. **Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde**, 30(3): 218-223, 2005.
- FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, 180: 23-32, 2002.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos** 9ed. São Paulo: Atheneu, 1992, 307p.
- FRENCH, A.E.; GRANT, R.; WEITZMAN, S.; RAY, J.G; VERMEULEN, M.J., SUNG, L.; GREENBERG, M.; KOREN, G. Folic acid fortification is associated with a decline in neuroblastoma. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, 74: 288-294, 2003.
- GAULL, G.; STURMAN, J.A.; SCHAFNER, F. Homocystinuria due to cystathionine  $\beta$  synthase deficiency: enzymatic and ultrastructural studies. **Journal of Pediatrics**, 84: 381-390, 1974.
- GEORGE, L.; MILLS, J.L.; JOHANSON, A.L.; NORDMARK, A.; OLANDER, B.; GRANATH, F. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. **Journal of American Medical Association**, 288: 1867-1873, 2002.
- GERMANI, R.; ASCHERI, J.L.R.; SILVA, F.T.; TORREZAN, R.; SILVA, K.L.; NETTO, A.G.; NUTTI, M.R. **Manual de fortificação de fubá e flocos de milho com ferro**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2001, 54 p. Disponível em <<http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/doc46-2001.pdf>> acesso em 11/2009.
- GOLDMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1991.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.
- GONZÁLEZ GONZÁLEZ, A. I.; CARBALLO, M.M.G. Ácido fólico y defectos del tubo neural en Atención Primaria. **MEDIFAM**, 13(4): 305-310, 2003.
- GREEN, R.; MILLER, J.W. Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. **Seminars in Hematology**, 36: 47-64, 1999.
- GREGORY, J.F.III. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. **Advanced Food and Nutritional Research**, 33: 1-101, 1989.
- GREGORY, J.F.; BHANDARI, S.D.; BAILEY, L.B.; TOTH, J.P.; BAUMGARTNER, T.G.; CERDA, J.J. Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, 53: 736-740, 1991.

- GREGORY, J. F. **Vitamins**. In Food chemistry (Eds, Fennema, O. R.) Marcel Dekker Inc, New York, 1996, p. 531-610.
- GREGORY, J.F. Case study: Folate bioavailability. **Journal of Nutrition**, 131: 1376-1382, 2001.
- GUINDLER, J.; LI, Z.; ZHENG, J.; CORREA, A.; SUN, X.; WONG, L. Folic acid supplements during pregnancy and risk of miscarriage. **Lancet**, 288: 1867-1873, 2002.
- HAMED, S.A.; NABESHIMA, T. The high atherosclerotic risk among epileptics: the atheroprotective role of multivitamins. **Journal of Pharmacological Sciences**, 98(4): 340-353, 2005.
- HANNON-FLETCHER, M.P.; ARMSTRONG, N.C.; SCOTT, J.M.; PENTIEVA, K.; BRADBURY, I.; WARD, M.; STRAIN, J.J.; DUNN, A.A.; MOLLOY, A.M.; KERR, M.A.; MCNULTY, H. Determining bioavailability of food folates in a controlled intervention study. **American Journal of Clinical Nutrition**, 80(4): 911-918, 2004.
- HANSON, A.D.; GREGORY, J.F.III Synthesis and turnover of folates in plants, **Current Opinion in Plant Biology**, 5: 244-249, 2002.
- HAWKES, J.G.; VILLOTA, T.H. Folates in foods: Reactivity, Stability during processing and nutritional implications. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, 28(6): 439-539, 1989.
- HEALTH, A-L.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, 15(2): 225-241, 2002.
- HENDLER, S.; RORVIK, D. 2001. Supplement monographs. In: Hendler SS, Rorvik D, editor. PDR for nutritional supplements. 1st ed. Montvale, N.J.: **Medical Economics**, 157-65, 2001.
- HERBERT, V. Folic acid . In: Shils, ME; Olson, JA; Moshe, S. **Modern nutrition in health and disease**. 9 ed . Pensilvânia: Willians & Wilkinsp, 433-45, 1999.
- HOOK, E.B.; CZEIZEL, A.E. Can terathanasia explain the protective effect of folic-acid supplementation on the birth defects? **Lancet**, 350: 513-535, 1997.
- HURRELL, R.F. Preventing iron deficiency through food fortification. **Nutrition Reviews**, 55: 210-222 1997.
- HURRELL, R.F.; REDDY M.; COOK J.D. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. **British of Journal Nutrition** 81: 289-295, 1999.
- HUTCHING, B.L.; STOKSTAD, E.L.R.; MOWAT, J.H.; BOOTHE, J.H.; WALLER, C.W.; ANGIER, R.B.; SEMB, J.; SUBBARROW, Y. **Journal of the American Chemical Society**, 70(1), 10-17, 1948.
- INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington, USA: National academic Press, 1998.
- JACQUES, P.F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A.G.; WILSON, P.W.F.; ROSENBERG, I. H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **New England Journal of Medicine**, 340(19): 1449-1454, 1999.

- JÄGERSTAD, M.; JASTREBOVA, J.; SVENSSON, U. Folates in fermented vegetables – A pilot study. *LWT- Food Science and Technology*, 37: 603-611, 2004.
- JOHANSSON, M.; WITTHOFT, C.M.; BRUCE, A.; JÄGERSTAD, M. Study of wheat breakfast rolls fortified with folic acid. The effect on folate status in women during a 3-month intervention. *European Journal of Nutrition*, 41: 279-286, 2002.
- JOHNSON, W.G., STENROOS, E.S., SPYCHALA, J.R., CHATKUPT, S., MING, S.X., BUYSKE, S. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): A risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? *American Journal of Medical Genetics*, 124A: 339-345, 2004.
- KÄLLÉN, B. Use of folic acid supplementation and risk for dizygotic twinning. *Early Human Development*, 80: 143-151, 2004.
- KALTER, H. Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. *Reproductive Toxicology*, 14: 463-476, 2000.
- KASS, M.; IVASKA, A. Spectrophotometric determination of iron (iii) and total iron by sequential injection analysis technique. *Talanta*, 58: 1131-1137, 2002.
- KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*, 5ed, São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.
- KEAGY, P.M. *Folacin I: Methods of vitamin assay*, 4ed, New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- KIM, Y.I. Role of folate in colon cancer development and progression. *Journal of Nutrition*; 133(1): 3731S–3739S, 2003.
- KIM, Y.I. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1123–28, 2004.
- KONDO, A.; KAMIHIRA, O.; GOTOH, M.; OZAWA, H.; LEE, T.Y.; LIN, A.T.L. ET AL. Folic acid prevents neural tube defects: International comparison of awareness among obstetricians/gynecologists and urologists. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 33(1): 63-67, 2007.
- 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.
- LIMA, J.A.; GODOY, H.T. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. 2001, 93p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- LIMA, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. HPLC Methodology For Folic Acid Determination In Enriched Wheat Flour And Bread. *Tecnica Molitoria International*, 55 (3A): 151-158, 2004.
- LIMA, J.A. **Folatos em Vegetais – Influência do Tipo de Cultivo e do Processamento**, 2005, 84p. Tese (Doutora em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- LIMA-PALLONE J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.G. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9(1), 57-62, 2006.
- LIN, M.Y.; YOUNG, C.M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 10: 409–14, 2000.

- LIU, S.; WEST, R.; RANDELL, E. LONGERICH, L.; O'CONNOR, K.S.; SCOTT, H.; CROWLEY, M.; LAM, A.; PRABHAKARAN, V.; MCCOURT, C. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. **BMC Pregnancy and Childbirth**, 4: 20–29, 2004.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Molecular Genetics and Metabolism**, 71: 121-138, 2000.
- LUCOCK, M.Z.; YATES, Z.; GLAVILLE, T.; LEEMING, R.; SIMPSON, N.; DASKALAKIS, I. A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. **Nutrition Research**, 23(11): 1463-1475, 2003.
- MABERLY, G.F.; STANLEY, F.J. Mandatory fortification of flour with folic acid: an overdue public health opportunity. **Journal of the Australian**, 183(7): 342-3, 2005.
- MAHAN, L. K.; ARLIN, M. T. KRAUSE **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2002. 957 p.
- MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. KRAUSE **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9 ed. São Paulo: Roca, 1998. 1179p.
- MALINOW, M.R. Plasma homocystine and arterial occlusive diseases: a mini-review. **Clinical Chemistry**, 40: 173-176, 1994.
- MALOWSKA, J. **Metal Contamination In: NOLLET, L. M. L.** Handbook of Food Analysis. II Series: Food Science and Technology. Marcel Dekker, Inc, v. 77. New York, 1996, p. 1665-1682.
- MARTINEZ A.B.O; BERRUEZO G.R.; CAVA M.J.B.; GRACIA C.M.; CASTON M.J.P. Estimacion de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico em alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 55(1): 5-14, 2005.
- MATOSO, E.; KUBOTA, L. T.; CADORE, S. Use of silica gel chemically modified with zirconium phosphate for preconcentration and determination of lead and copper by flame atomic spectrometry. **Talanta**, 60: 1105-1111, 2003.
- MCCARTHY, M. On the balance, folic acid fortification benefits elderly. **Lancet**, 349: 35, 1997.
- MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proceedings of the Nutrition Society**, 63(4): 529-536, 2004.
- MELSE-BOONSTRA, A.; WEST, C.E.; KATAN, M.B.; KOK, F.J.; VERHOEF, P. Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in health adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79: 424-429, 2004.
- MILUNSKY, A.; JICK, H.; JICK, S.S. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. **Journal of the American Medical Association**, 262: 2847-2852, 1989.
- MIRET, S.; SIMPSON, R.J.; MCKIE, A.T. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. **Annual Review of Nutrition**, 23: 283-301, 2003.
- MOAT, S.J.; LANG, D.; McDOWELL, I.F.W. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, 15: 64-79, 2004.
- MOPPER, B. **Determination of Cations and Anions by Capillary Electrophoresis**. In: NOLLET, L. M. L. Handbook of Food Analysis. II Series:

- Food Science and Technology Marcel Dekker, Inc, v. 77. New York. 1996, p. 1867-1887.
- MUSKIET, F.A.J. The importance of early folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 20(3): 403-410, 2005.
- NAIR, K.G. The genetic basis of hiperhomocysteinemia. **International Heart Journal**, 52: 516-517, 2000.
- NATHOO, T.; HOLMES, C.P.; OSTRY, A. An analysis of the development of Canadian food fortification policies: the case of vitamin B. **Health Promotion International**, 20(4): 375-82, 2005.
- NETO, J.R.F.; CHAGAS, A.C.P. A homocisteína como fator de risco coronariano. **Atherosclerosis**, 1(12): 20-25, 2001.
- NEVES, L.B.; MACEDO, D.M.; LOPES, A.C. Homocisteína. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 40(5): 311-320, 2004.
- O'LEARY, K.O.; SHEEHY P.J.A. Influence of folic acid-fortified foods on folate status in a folate depletion-repletion rat model. **British Journal of Nutrition**, 85: 441-446, 2001.
- OLIVEIRA, R. J.; DINIZ, A. S.; BENIGNA, M. J.; MIRANDA-SILVA, S. M.; LOLA, M. M. & GONÇALVES, M. C. Magnitude, distribuição espacial e tendência da anemia em pré-escolares da Paraíba. **Revista de Saúde Pública**, 36: 26-32, 2002.
- OMS-Organização Mundial da Saúde. Global Database on child growth and nutrition. Genebra, 1997. **Comunicação em Ciências da Saúde**, 17(1): 53-61, 2006.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS. **Anemia nutricionales**: informe de um grupo de expertos em nutricion de la OMS. Genebra: OMS (Technical Reports Series), 1972, 503 p.
- OSHTRAKH, M. I.; MILDER, O. B.; SEMIONKIN, V. A. Analysis of the iron state in iron containing vitamins and dietary supplements by mössbauer spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, 506: 155-160, 2004.
- OSSEYI, E.S.; WEHLING, R.L.; ALBRECHT, J.A. Liquid chromatography method for determination added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, 826(2): 235-240, 1998.
- PATRO B.S.; ADHIKARI S.; MUKHERJEE T.; CHATTOPADHYAY S. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15: 67-71, 2005.
- PAZ, R.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, F. Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico - Recomendaciones terapéuticas, **Nutrición Hospitalaria**, 21(1): 113-119, 2006.
- PEREIRA, M. G.; ARRUDA, M. A. Z. Trend in preconcentration procedures for metal determination using atomic spectrometry techniques. **Microchimica Acta**, 141: 115-131, 2003.
- PHILLIPS, K. M.; WUNDERLICH, K. M.; HOLDEN, J. M.; EXLER, J.; GEBHARDT, S. E.; HAYTOWITZ, D. B.; BEECHER, G. R.; DOHERTY, R. F. Stability of 5-methyltetrahydrofolate in frozen fresh fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 92: 587-595, 2005.

- PIETRZIK, K. **Nutrients considered worthy of examination in processed foods**, *Thermal Processing and Quality of Foods*. Ed Elsevier Applied Science, London, 1984, 825 p.
- QUIRÓS, A.R.B.; RON, C.C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; LAGE-YUSTY, M.A. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1032: 135-139, 2005.
- RADER, J.I.; WEAVER, C.M.; ANGYAL, G. Use of microbiological assay with trienzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chemistry*, 62(4): 451-465, 1998.
- RAMAEKERS, V.T.; BLAU, N. Cerebral folate deficiency. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 46(12): 843-851, 2004.
- RAY, J.G.; LANGMAN, L.J.; MAMDANI, M.M.; COLE, D.E.C. Absence of effect of folic acid flour fortification on anticonvulsant drug levels. *The American Journal of Medicine*, 18(4): 444-445, 2005.
- REYNOLDS, E.H. Mental effects of anticonvulsants and folic acid metabolism. *Brain*, 91: 197-214, 1968.
- ROCHA, D. S. *et al.* Estado nutricional e prevalência de anemia em crianças que frequentam creches em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista Paulista de Pediatria*, São Paulo, 26(1): 6-13, 2008.
- RODRIGO, R.; PASSALACQUA, W.; ARAYA, J. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 42: 453-461, 2003.
- SALGUERIO M; ZUBILLAGA M; LYSIONEK A; CARO R; WEILL R & BOCCIO J. Fortification Strategies to combat zinc and iron deficiency. *Nutrition Reviews*, 60: 52-58, 2002.
- SANTOS, L.P.M.; PEREIRA, M.Z. Efeitos da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(11): 17-24, 2007.
- SCHNABEL, R.; LACKNER, K. J.; RUPPRECHT, H. J. Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction. *Journal of the American College Cardiology*, 45: 1631-1637, 2005.
- SCHOLL, T.O.; JOHNSON, W.G. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5): 1295-1305, 2000.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review; Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 795-824, feb 2000.
- SESHADRI, S.; BEISER, A.; SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; D'AGOSTINO R.B. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 346(7): 476-483, 2002.
- SEYOUM, E., SELHUB, J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *Journal of Nutrition*, 128: 1956-1960, 1998.
- SHARP L.; LITTLE J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*, 159: 423-443, 2004.

- SHAW, G.M.; SCHAFFER, D.; VELIE, E.M. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. **Epidemiology**, 6: 219-226, 1995.
- SHAW, G.M.; CARMICHAEL, S.L.; NELSON V.; SELVIN S.; SCHAFFER D.M. Food fortification with folic acid and twinning among Californian infants. **American Journal of Medical Genetics**, 119(A): 137-140, 2003.
- SHILSME, OLSEN J.; SHIKE, M. IN: SHILS, M.; OLSON, J.; SHIKE, M.; ROSS, A.C.; EDITORS. **Modern nutrition in health and disease**. 8th ed. Media, Pa.:Williams andWilkins, 1994, p. 402–25.
- SHRUBSOLE, M.J.; JIN, F.; DAI, Q.; SHU, X.O.; POTTER, J.D.; HEBERT, J.R.; GAO, Y.T.; ET AL. Dietary folate intake and breast cancer risk: Results from the Shanghai Breast Cancer Study. **Cancer Research**, 61: 7136–7141, 2001.
- SILVA, A. P. R.; CAMARGOS, C. N. Fortificação de alimentos: instrumento eficaz no combate a anemia ferropriva? **Comunicação em Ciências da Saúde**, Brasília, 17(1): 47-52, 2006.
- SILVA, D. G.; PRIORE, S. E.; FRANCESCHINI, S. C. C. Fatores de risco para anemia em lactentes atendidos nos serviços públicos de saúde: a importância das práticas alimentares e da suplementação com ferro. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, 83(2): 149-156, mar./abr. 2007.
- SOEIRO, B.T.; BOEN, T.R.; WAGNER, R.; LIMA-PALLONE, J.A. Physico-chemical quality and homogeneity of acid folic and iron in enriched flour using principal component analysis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 1-13, 2009.
- STEKEL, A.; OLIVARES M. Prevention of iron deficiency by milk fortification II – A field trial with a full-fat acidified milk. **American Journal of Clinical Nutrition**, 47: 265-269, 1988.'
- STOKSTAD, E.L.R.; HUTCHING, B.L.; MOWAT, J.H.; BOOTHE, J.H.; WALLER, C.W.; ANGIER, R.B.; SEMB, J., SUBBARROW, Y. **Journal of American Chemical Society**, 70(1), 5-10, 1948.
- STOROZHENKO, S.; RAVANEL, S.; ZHANG, G.F.; RÉBEILLÉ, F.; LAMBERT, W.; STRAETEN, D.V.D. Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. **Trends in Food Science & Technology**, 16: 271-281, 2005.
- SULCEK, Z.; POVONDRA, P. **Methods of Decomposition in Inorganic Analysis**, CRC Press, Boca Raton - Florida, 1989, 325 p.
- SUTER, P. **Nutrition checklist**. Stuttgart, New York: Thieme, 2002.
- SWIGLO, A. G. Foliates as antioxidants. **Food Chemistry**, 101: 1480-1483, 2007.
- SYBESMA, W.; STARRENBURG, M.; TIJSSELING, L.; HOEFNAGEL, M.H.N.; HUGENHOLTZ, J. Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, 69: 4542-8, 2003a.
- TAMURA, T. Determination of food folate. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, 9: 285-293, 1998.
- TAO, G.; FANG, Z.; BAASNER, J.; WELTS, B. Flow injection on-line dilution for flame atomic absorption spectrometry by micro-sample introduction and dispersion using syring pumps. **Analytica Chimica Acta**, 481: 273-281, 2003.

- THE NATIONAL FINDIET STUDY, In: Männistö, S.; Ovaskainen, M. L.; Valsta, L. (Eds), **Publications of the National Public Health Institute B3/2003**. Helsinki, Finland, 2003.
- UNICEF - UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND, UNITED NATIONS UNIVERSITY - UNU; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers**. Geneva: WHO, 2001. 115 p. (WHO/NHD/01.3). Disponível em: <<http://www.who.int/reproductivehealth/docs/anaemia.pdf>>. Acesso em: 19 Set. 2009.
- VAN HET HOF, K.H.; TIJBURG, L.B.; PETRZIK, K.; WESTSTRATE, J.A. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. **British Journal of Nutrition**, 82: 203-212, 1999.
- VANNUCCHI H.; JORDÃO JR AA. Vitaminas hidrossolúveis. In: Dutra-de-Oliveira, JE, Marchini JS . **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998, p.191-207.
- 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.
- VILLAREAL, L.E.M.; BENAVIDES, C.L.; VALDEZ-LEAL R.; SANCHEZ-PEÑA M.A.; VILLAREAL-PÉREZ J.Z. Efecto de La administración semanal de ácido fólico sobre los valores sanguíneos. **Salud Pública de México**, 43(2): 103-7, 2001.
- VOLLSET, S.E.; GJESSING, H.K.; TANDBERG, A. et al. Folate supplementation and twin pregnancies. **Epidemiology**, 16: 201-05, 2005.
- VORA, A.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K.S. Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, 302-393: 209-220, 2002.
- VORA, A.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. Thermal stability of folic acid in the solid-state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 75(3): 709-717, 2004.
- WALD, N. Prevention of neural tube defects: RESULTS FROM THE Medical Research Council Vitamin Study. **Lancet**, 338: 131-137, 1991.
- WALLER, D.K.; TITA, T.N.; ANNEGERS, J.F. Rates of twinning before and after fortification of foods in the US with folic acid, Texas, 1996-1998. **Pediatric and Perinatal Epidemiology**, 17: 378-383, 2003.
- WELCH, G.N.; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **New England Journal of Medicine**, 338: 1042-1050, 1998.
- WILLCOX, J.K.; CATIGNANI, G.L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 43(1): 1-18, apr 2003.
- WILLIAMS S. R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. Porto Alegre: Artmed Editora; 1997, 668p.
- WRIGHT, A.J.A.; FINGLAS, P.M. Differential kinetic behavior and distribution of pteroylglutamic acid and reduced folates. **Journal of Nutrition**, 135: 619-623, 2005.

- WRIGHT, A.J.A.; FINGLAS P.M.; SOUTHON, S. Proposed mandatory fortification of the UK diet with folic acid: have potential risks been underestimated? **Trends of Food Science and Technology**, 12: 313-321, 2001.
- ZHANG, S.M.; WILLETT, W.C.; SELHUB, J.; HUNTER, D.J.; GIOVANNUCCI, E.L.; HOLMES, M.D.; COLDITZ, G.A.; HANKINSON, S.E. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**, 95: 373–380, 2003.
- ZIJP, I.M.; KORVER, O.; TIJBURG, L.B. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, 40(5): 371-98, 2000.
- ZLOTKIN, S. et al. Use of microencapsulated iron fumarate sprinkles to prevent recurrence of anaemia in infants and young children at high risk. **Bulletin of the World Health Organization**, 81(2): 108-115, s2003.

---

---

## Artigo 2

# VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA A DETECÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM ALIMENTOS

Elede Martins Elias e Helena T. Godoy \*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

\* [helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)



## RESUMO

Atualmente a mais empregada das técnicas para a determinação de ácido fólico é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Quando um método de análise de um determinado composto é definido, este método deve ser validado de modo a garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis. A matriz a ser analisada pode ser bastante complexa, como é o caso de alimentos, dificultando as análises e requerendo também uma validação específica do analito em seu meio. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise de ácido fólico em leite e suco de soja enriquecido, bolo de fubá e seus ingredientes (mix, farinha de trigo, fubá de milho). O ácido fólico foi extraído com tampão fosfato e hidróxido de potássio, seguida por uma etapa de limpeza utilizando ácido tricloroacético, filtração e injeção no cromatógrafo a líquido. No processo cromatográfico utilizou-se coluna C<sub>18</sub> e sistema de eluição por gradiente, sendo a fase móvel composta por solução de ácido acético e acetonitrila. A detecção foi obtida utilizando um detector de arranjo de diodos (DAD) a 290 nm. A identificação foi feita por comparação com os tempos de retenção, co-cromatografia e espectros de absorção. A quantificação foi realizada por padronização externa. Satisfatórios resultados foram obtidos para os diferentes parâmetros analíticos como linearidade, com coeficientes de correlação variando de 0,997 a 0,998, precisão com um coeficiente de variação menor que 9,0 %, faixa de recuperação entre 92 a 106 % e limites de detecção e quantificação de 2,50 e 8,40 µg 100 mL<sup>-1</sup> para leite

e suco de soja e 2,98 e 9,00  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  para bolo de fubá e ingredientes. Os resultados da validação realizada demonstram que o método é eficiente, rápido e preciso para a determinação de ácido fólico nas matrizes estudadas.

Palavras-chave: Validação, CLAE, ácido fólico, alimentos fortificados.

## ABSTRACT

Currently the most used techniques for the determination of folic acid is the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). When a method for analyzing a given compound is defined, this method must be validated to ensure that the results are reliable. The matrix to be analyzed can be quite complex, such as food is, which complicates the analysis and also requires a specific validation of the analyte in their midst. Therefore, the objective of this work was to adapt and validate a methodology for high performance liquid chromatography (HPLC) for analysis of folic acid in juice and soy milk, fortified cornmeal cake and its ingredients (mix, flour, corn). Folic acid was extracted with phosphate buffer and potassium hydroxide, followed by a cleaning step using trichloroacetic acid, filtration and injection into the liquid chromatograph. In the chromatographic process, a C<sub>18</sub> column and gradient elution system were used, with a mobile phase consisting of acetic acid and acetonitrile. The detection was achieved using a diode array detector (DAD) at 290 nm. The identification was made by comparison with the retention times, co-chromatography and absorption spectra. Quantification was performed by external standardization. Satisfactory results were obtained for the various analytical parameters such as linearity with correlation coefficients ranging from 0.997 to 0.998, with a precision coefficient of variation of less than 9.0 % recovery range between 92 to 106 % and limits of detection and quantification of 2.50 e 8.40  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  for soy milk and soy juice, and 2.98 and 9.00  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  for cake flour and ingredients. The validation results demonstrate that the method is

efficient, fast and accurate for the determination of folic acid in the matrices studied.

Keywords: Validation, HPLC, folic acid, food enrichment.

## 1. Introdução

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel e como tal é pouco armazenada no organismo. É uma vitamina do complexo B, quimicamente denominado ácido pteroilglutâmico. Dentre as substâncias que possuem como estrutura básica o ácido pteroilglutâmico, estão os pteroilglutamatos, os diidrofolatos, os tetraidrofolatos (THF) e os metiltetraidrofolatos, denominado folatos (LORENZI, 1991). O termo folato, encontrado na natureza, é utilizado para designar os poliglutamatos e o termo ácido fólico é reservado para o monoglutamato sintético e/ ou ácido pteroilglutâmico (DROGUETTE e PENTEADO, 2003; CZEIZEL 1996).

O ácido fólico (AF) participa de dois processos biológicos fundamentais: atua como co-fator para as enzimas implicadas na biossíntese de RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico) e como co-fator na formação da metionina (CZEIZEL, 1996). É essencial para as reações metabólicas específicas no meio celular e vital para o funcionamento e crescimento normal do organismo (VANNUCCHI e JORDÃO, 1998).

Age sobre a homocisteína, transformando-a em metionina, ajudando a evitar problemas cardíacos (MOAT, LANG e MCDOWELL, 2004); é essencial na prevenção e redução significativa do risco de malformação do tubo neural na gestação (MILUNSKY, JICK E JICK, 1989; CZEIZEL e DUDAS, 1992; SHAW, SCHAFFER e VELIE, 1995; CRANE; 1995; DALY et al., 1997); podem reduzir algumas doenças degenerativas como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson, (SCOTT, RÉBEILLE e FLETCHER, 2000) e ainda prevenir doenças crônicas como depressão, e alguns tipos de câncer, como mama e cólon (JACQUES et al., 1999;

ALPERT et al., 2000; LUCOCK, 2000). Assim, são fundamentais para o crescimento correto e para o funcionamento ótimo do sistema nervoso e da medula óssea (DANG, ARCOT e SHRESTHA, 2000).

Em relação às fontes do ácido fólico, apesar de a vitamina estar presente na maioria dos alimentos, quantidades apreciáveis são encontradas no fígado, rins, vegetais de folhas verde-escuras, aspargos e cogumelos (BRODY, 1991; FRANCO, 1992, QUIRÓS et al., 2005; LIMA, 2005). Também são encontrados em carnes, gema de ovo, cereais, frutas e em algumas raízes (QUIRÓS et al., 2005). Segundo o The National Findiet Study (2003), os cereais, principalmente os produtos de grãos inteiros, são os maiores contribuidores de folatos na dieta.

Para a determinação de folatos pode-se aplicar métodos biológicos, microbiológicos, imunológicos, químicos ou físicos. Os métodos biológicos são caros e bastante demorados, além de possuir baixa repetitividade, o método imunológico sofre interferência de diversos tipos de substâncias (RAUCH, STREJCEK e CERNA, 1989), métodos químicos são raramente utilizados para a análise de folatos em alimentos (ARCOT e SHRESTHA, 2005) e a técnica microbiológica é mais precisa e reprodutível quando comparada aos métodos biológicos e químicos (RADER, WEAVER e AGYAL, 1998), porém não permite a determinação simultânea de diferentes tipos de folatos (FINGLAS et al., 1999).

Os métodos físicos envolvem as técnicas cromatográficas. Atualmente a mais empregada das técnicas para a determinação de ácido fólico é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (CATHARINO, VISENTAINER e GODOY, 2003; LIMA, CATHARINO e GODOY, 2004; ALABURDA et al., 2008). É um método rápido, sensível e exato, além de fornecer a melhor resolução na

separação das diversas formas bioativas presentes nos alimentos (AGOSTINO; 1996).

Quando um método de análise de um determinado composto é definido, este método deve ser validado de modo a garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis. A matriz a ser analisada pode ser bastante complexa, como é o caso de alimentos, dificultando as análises e requerendo também uma validação específica do analito em seu meio. O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (PASCHOAL et al., 2008).

A IUPAC destaca que, para a análise de alimentos, os requerimentos para os métodos analíticos envolvem um exame das características de performance a partir de ensaios interlaboratoriais (que envolvem diferentes laboratórios, também conhecido como ensaio de proficiência, estudo colaborativo ou triagem colaborativa). Um número mínimo de laboratórios são requeridos para participarem dos estudos inter-laboratoriais, preenchendo os requisitos para comporem o que a IUPAC classifica como procedimento de validação completa do método analítico (*full validation*). No entanto, nem sempre é prático ou necessário promover a validação completa de um método analítico. Em tais circunstâncias a IUPAC considera apropriado o que chama de validação do método em um único laboratório (*single-laboratory validation*). Essas circunstâncias podem ocorrer quando se pretende garantir a viabilidade do método antes de se proceder à validação completa, e/ou como etapa preliminar de avaliação de um método

desenvolvido e na publicação de artigos científicos (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

A FAO classifica os diferentes níveis de validação em face de uma diferenciação de quatro diferentes tipos de métodos analíticos (conforme delineamento do *Codex Commodity Committees*): (Tipo I) Métodos de definição; (Tipo II) Métodos de Referência; (Tipo III) Métodos Alternativos Aprovados e, (Tipo IV) Métodos de Tentativa (FAO, 1997).

Segundo o INMETRO, convém que um procedimento de ensaio seja coerente, claro, correto e tão completo quanto necessário, dentro dos limites estabelecidos pelo seu campo de aplicação. Um formato padronizado assegura que nenhum ponto importante tenha sido esquecido, que as informações a serem incluídas no procedimento sejam fornecidas sempre na mesma ordem e que qualquer assunto desejado possa ser encontrado rapidamente. Na padronização do formato dos métodos validados, o INMETRO sugere que se utilize a ABNT ISO/IEC Diretiva – Parte 3, a Norma ISO 78/2, além das prescrições da NBR ISO/IEC 17025 (INMETRO, 2010).

A EC (Comissão Européia) e a ANVISA dispõem em seus documentos às definições dos parâmetros que compõem o procedimento geral de validação (EC, 2002; ANVISA, 2003).

No Brasil, a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, a partir de junho de 2004. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro no mínimo (ANVISA, 2002). Entretanto, a

população consome produtos em que estão adicionadas as farinhas e outras fontes que estão sendo enriquecidas.

Dentro deste panorama, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia para a determinação de ácido fólico em bolos os quais são adicionados as farinhas em suas formulações e produtos enriquecidos à base de soja.

## **2. Materiais e Método**

### **2.1. Produtos analisados**

As amostras de bolo de fubá, mix (preparado de farinha de trigo com fubá de milho), farinha de trigo e fubá de milho foram adquiridas na cidade de Campinas.

### **2.2. Reagentes**

O padrão de ácido fólico (lote: F-7876, com aproximadamente 98% de pureza) foi adquirido da SIGMA (USA). A acetonitrila, grau cromatográfico, fosfato de potássio monobásico, o ácido acético e tricloroacético, grau analítico, foram adquiridos da Merck (Brasil). A água utilizada no preparo do tampão, das amostras e da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). A fase móvel, os solventes orgânicos, as soluções padrões e as amostras foram filtradas em filtros de membrana da Millipore (HAWP e HAWP04700), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

### 2.3. Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100 (Agilent), com injetor automático e capacidade de 1 até 100  $\mu\text{L}$ , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível e de fluorescência, dispostos em série, e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica. O software HP-Chemstation foi utilizado para administração do sistema de aquisição e tratamento de dados. A coluna utilizada para o processo cromatográfico foi uma Hypersil, ODS-2, 3  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 4.6 mm d.i.

### 2.4. Metodologia

A análise foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a extração inicialmente a amostra foi homogeneizada e pesado 1,0 g ou utilizado a alíquota de 1 mL, dependendo da amostra. Foram adicionados 3,0 mL de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Logo após foi adicionado 1,5 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 2.6 com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Finalmente foi adicionado mais 0,5 mL de ácido tricloroacético de forma cuidadosa (sem agitação brusca) e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida todas as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 125000 x g, após isto foram filtradas em papel de filtro Watmamm (0,45  $\mu\text{m}$ ).

Para a amostra de farinha de trigo houve modificação na extração com adição de um modificador orgânico para melhores resultados. Iniciou-se, portanto

a extração com 1,0 mL de acetonitrila, 2,5 mL de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e 1,0 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 2.6, após isto, procedeu-se da mesma forma conforme descrito anteriormente.

Todas as amostras, as soluções padrões e a fase móvel foram filtradas em membrana 0,45 µm (Millipore HAWP e HAWP04700). Os extratos purificados foram injetados, volume de 100 µL, e imediatamente analisados utilizando CLAE.

A fase móvel utilizada para a separação do ácido fólico foi uma solução de ácido acético glacial (2,0 % v/v), com pH ajustado para 2,7 com KOH, a uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

O ácido fólico (AF) foi separado em sistema de eluição por gradiente, iniciando com 90 % de solução aquosa de ácido acético e 10 % de acetonitrila (v/v), chegando em 5 minutos a 80 % de solução ácido acético e 20 % de acetonitrila (v/v), e então a concentração de acetonitrila foi mantida nessas condições até o final da corrida, em 10 minutos. Após isto um período de limpeza foi feito com 100 % de acetonitrila até 15 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 5 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD). O ácido fólico foi detectado na região do ultravioleta com 290 nm.

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. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação foi feita por padronização externa e a curva de calibração foi construída para a forma da

vitamina encontrada no alimento analisado, sendo cada ponto representado pela média de três determinações com mínimo de 5 pontos.

## **2.5. Validação do Método**

Os parâmetros analíticos escolhidos para validação de métodos de separação foram: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

### **2.5.1. Seletividade**

A seletividade é a capacidade de um método em discriminar entre o analito de interesse e outras substâncias presentes na amostra. Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

A seletividade foi obtida por meio da avaliação com detector de arranjo de diodos que permite comparar o espectro de absorção na região do UV, obtido para amostra, com o padrão utilizando isto como uma indicação da presença do composto puro.

## **2.5.2. Linearidade e faixa de aplicação**

### **2.5.2.1. Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do composto analisado, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ANVISA, 2003).

A linearidade foi obtida com uma equação de reta chamada de curva analítica. A curva analítica para o ácido fólico com mínimo de 5 pontos foi preparada através de diluições de uma solução concentrada do padrão. As soluções concentradas foram preparadas após análises prévias das quantidades de ácido fólico presentes em amostras de bolo de fubá e ingredientes, leite e suco de soja.

### **2.5.2.2. Faixa de Aplicação**

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, atendendo aos requisitos de precisão e exatidão (ANVISA, 2003).

### **2.5.3. Precisão**

A avaliação da precisão foi realizada através da precisão intermediária e da repetitividade do método para o fólico ácido encontrado nas matrizes. Para a análise da repetitividade foram realizadas dez determinações consecutivas, em três diferentes níveis de concentração. Para a precisão intermediária foram realizadas três determinações consecutivas, em três níveis de concentrações, realizadas por três diferentes dias.

Para a determinação da precisão analisou-se inicialmente, o teor de ácido fólico naturalmente presentes em cada matriz. Posteriormente, antes do procedimento de preparo da amostra, adicionou-se o padrão de ácido fólico em três diferentes níveis, 25%, 50% e 100%, em relação à quantidade presentes nas diferentes amostras. Portanto, adicionou-se o padrão de ácido fólico nas concentrações de 13,0, 26,0 e 52,0  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  para o bolo de fubá; 43,0, 86,0 e 172,0  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  para o mix; 38,0, 76,0 e 153,0  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  para a farinha de trigo; 43,0, 87,0 e 175,0 para o fubá de milho e 4,5, 9,0 e 18,0 para suco e leite de soja.

#### **2.5.4. Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). A exatidão pode ser obtida mediante uso de material de referência certificado, comparação de métodos ou, ensaios de recuperação (MILLER e MILLER, 1993).

A exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (ANVISA, 2003).

Para a avaliação da exatidão do método foram realizados testes por meio de adição do padrão. Para a determinação da exatidão, adicionou-se o padrão de ácido fólico em três diferentes níveis, 25%, 50% e 100%, em relação à quantidade

presentes nas diferentes amostras. Portanto, adicionou-se o padrão de ácido fólico nas concentrações de 13,0, 26,0 e 52,0  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  para o bolo de fubá; 43,0, 86,0 e 172,0  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  para o mix; 38,0, 76,0 e 153,0  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  para a farinha de trigo; 43,0, 87,0 e 175,0 para o fubá de milho e 4,5, 9,0 e 18,0 para suco e leite de soja; calculando-se a recuperação de acordo com Rodriguez et al. (1995), através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração amostra}) \times 100\%}{\text{Concentração adicionada}}$$

#### **2.5.5. Limites de Detecção e Quantificação**

Para determinação do limite de detecção foram realizadas diluições sucessivas do ácido fólico em concentrações conhecidas, até que se obtivesse um sinal como sendo o valor da concentração do ácido fólico correspondente três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ( $S/R \geq 3$ ). O valor correspondente a este sinal foi considerado como a menor concentração (detectável).

Para o limite de quantificação considerou-se como sendo o valor da concentração do ácido fólico correspondente a dez vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento. (ANVISA, 2003).

Os limites de detecção e quantificação foram feitas nas mesmas condições de análise das amostras avaliadas em intervalos de 0,5 minuto e as diluições do padrão foram realizados em triplicatas.

### **3. Resultados e Discussão**

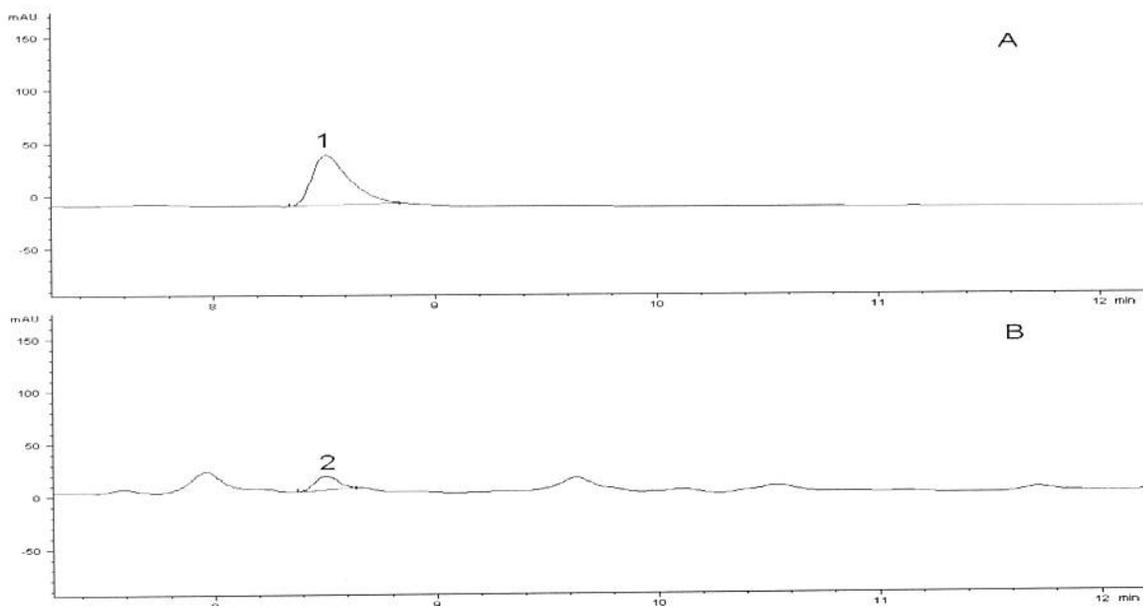
#### **3.1. Validação do Método**

##### **3.1.1. Seletividade**

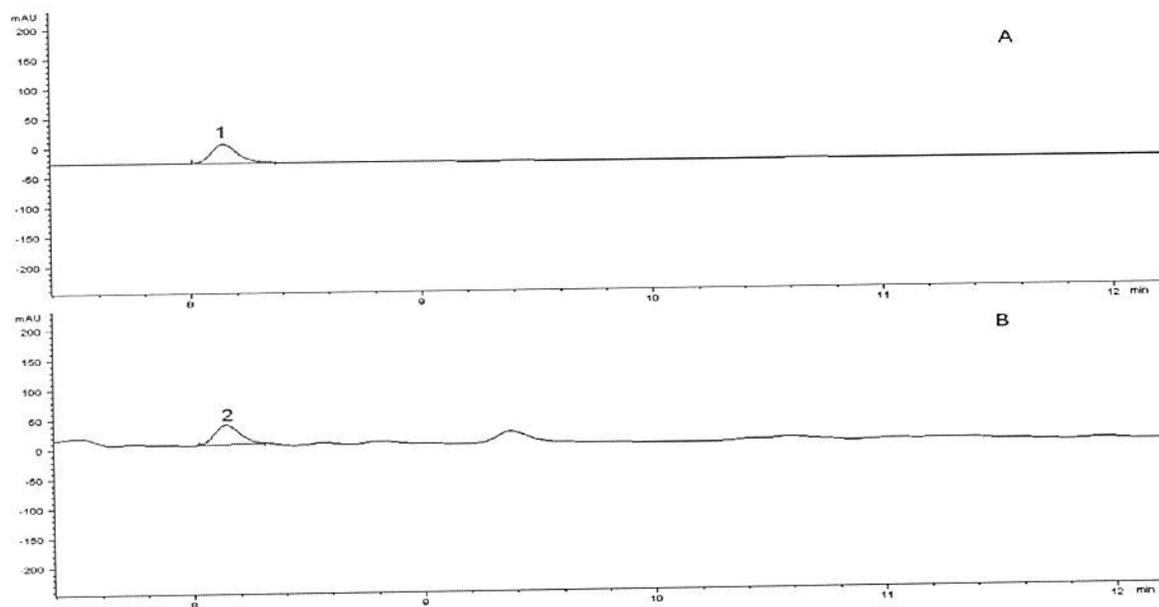
A pureza dos picos foi avaliada pela comparação dos espectros de absorção obtidos, amostra e padrão, e pela co-cromatografia realizada demonstrando que o processo cromatográfico foi seletivo. Foi utilizado o detector de arranjo de diodos e o comprimento de onda selecionado em 290 nm.

##### **3.1.2. Separação do Ácido Fólico**

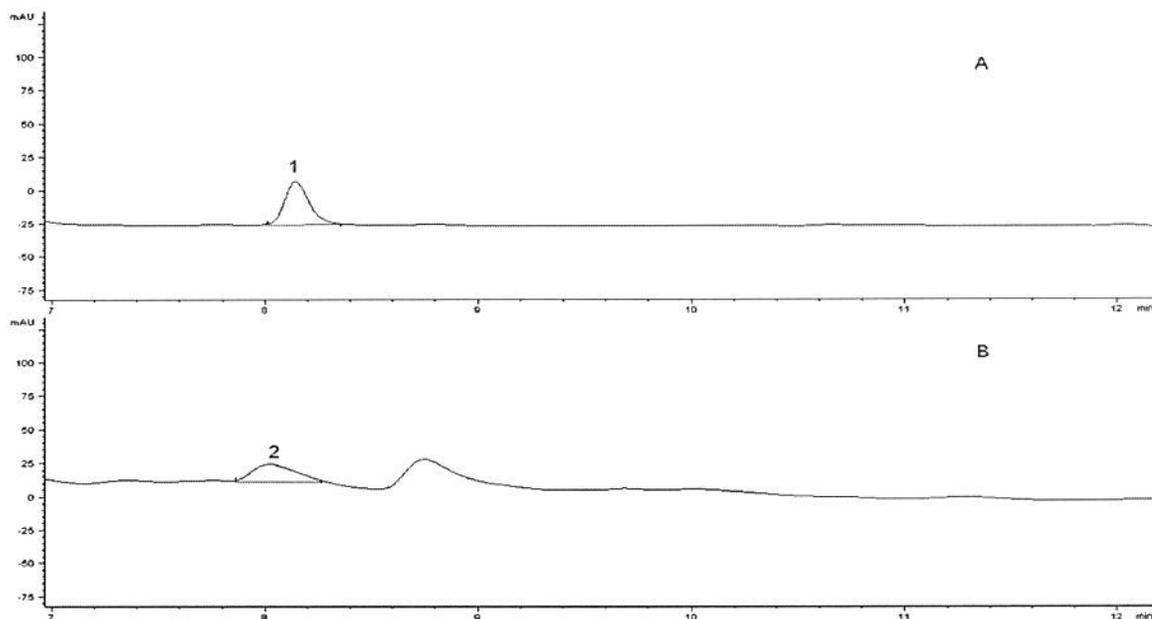
Nas Figuras a seguir (1, 2, 3, 4, 5 e 6) podem ser visualizados os perfis cromatográficos do padrão de ácido fólico (A1) e de cada uma das amostras analisadas (B2). Os tempos de retenção encontrados para as matrizes analisadas foram 8,52 min para o bolo, 8,13 min para o mix, 8,05 min para a fubá de milho e 8,38 min para a farinha de trigo, 9,52 min para o suco de soja e 9,58 min para o leite de soja em DAD a 290 nm.



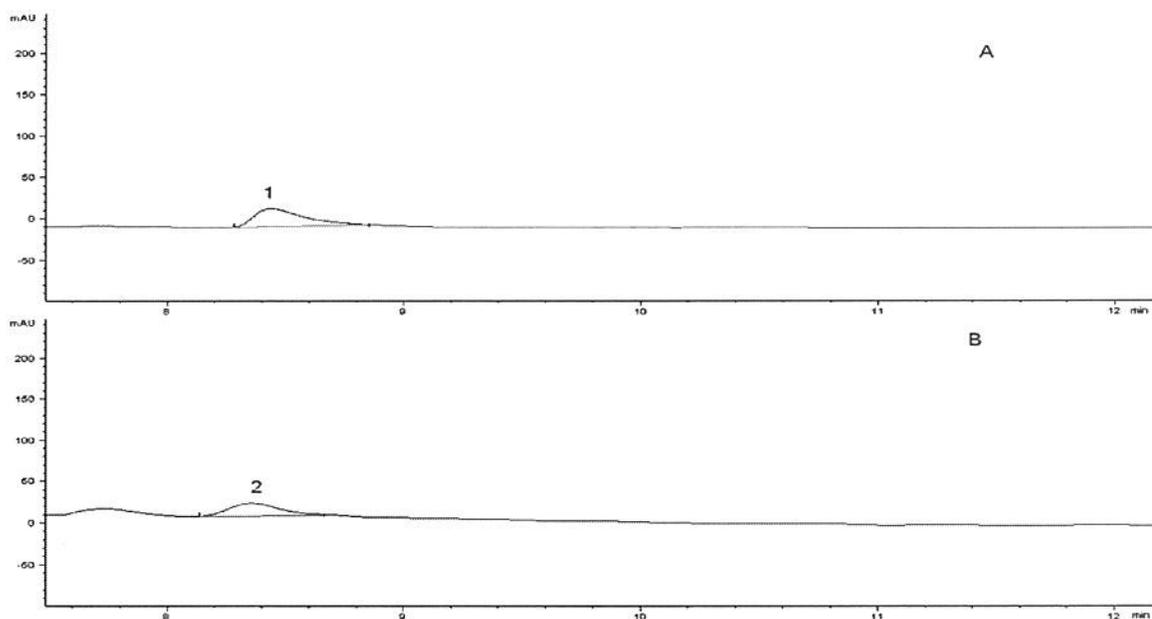
**Figura 1:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de bolo (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,53 min) e 2 (8,52 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



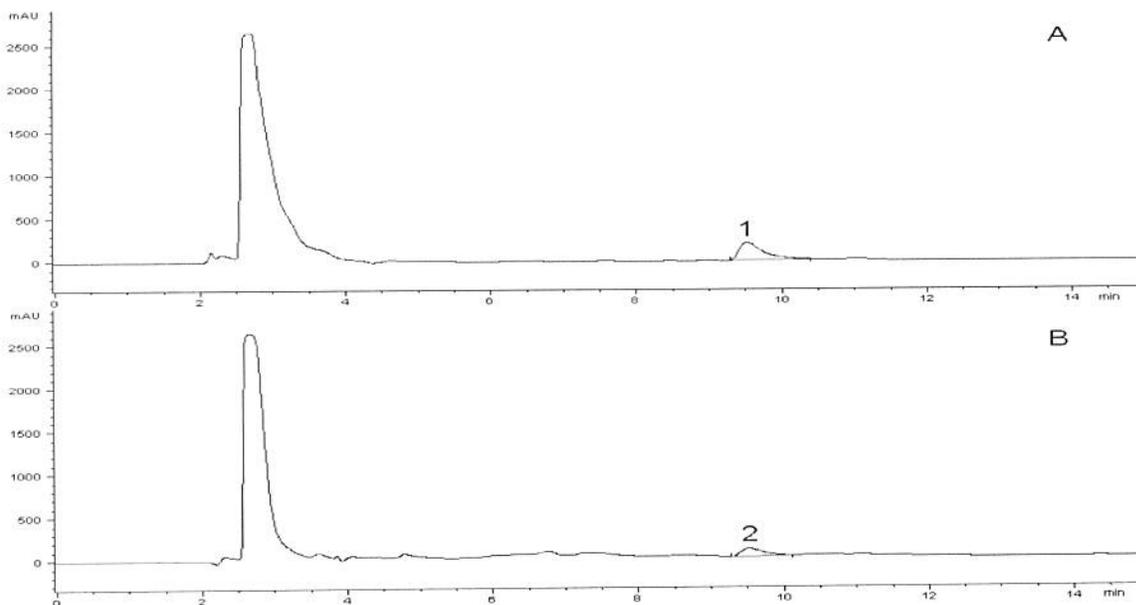
**Figura 2:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de mix (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,14 min) e 2 (8,13 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



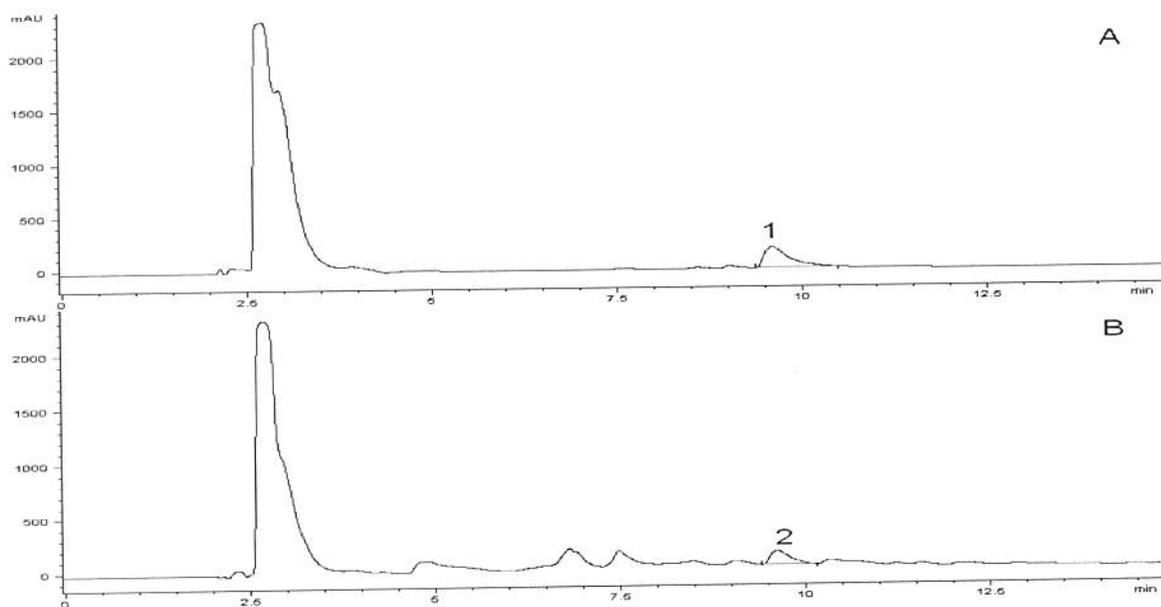
**Figura 3:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de fubá (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,15 min) e 2 (8,05 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 4:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de farinha de trigo (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,42 min) e 2 (8,38 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 5:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e suco de soja (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (9,52 min) e 2 (9,52 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 6:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e leite de soja (B). Os picos identificados são do ácido fólico: 1 (9,58 min) e 2 (9,58 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.

### 3.1.3. Curvas de Calibração

Cada ponto da curva de calibração do ácido fólico foi realizado em triplicata. Foram encontradas satisfatórias linearidades para as faixas avaliadas. O ácido fólico foi estudado entre 10 e 500  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  com  $R^2 = 0,997$  para as amostras de bolo e ingredientes. Para suco e leite de soja foi estudado entre 10 e 50  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  com  $R^2 = 0,998$  para o suco e  $R^2 = 0,997$  para o leite.

Dentro dos parâmetros de validação, para a linearidade a ANVISA (ANVISA, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99. Os valores obtidos para as curvas de calibração realizadas variaram de 0,997 a 0,998, apresentando-se dentro de uma faixa recomendada. Rybka (2010) e Pane (2007) obtiveram em seus trabalhos o coeficiente de 0,997 e 0,994 para o ácido fólico respectivamente.

### 3.1.4. Limites

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram obtidos por meio do método sinal/ruído, utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se pudesse distinguir entre ruído e sinal analítico através da visualização.

Os limites de detecção e quantificação para o ácido fólico avaliados para bolo e ingredientes foram respectivamente de 2,98 e 9,00  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e para suco e leite de soja foram respectivamente de 2,50 e 8,40  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ .

### 3.1.5. Precisão

Os resultados obtidos da avaliação de repetitividade e precisão intermediária do ácido fólico encontrados nas matrizes estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Os CV% obtidos para todas as amostras para a precisão não ultrapassaram o valor de 9,0 %.

Para a análise da repetitividade foram realizadas dez determinações consecutivas, em três níveis de concentração. Para a precisão intermediária foram realizadas três determinações consecutivas, em três níveis de concentrações, realizadas em três diferentes dias.

**TABELA 1.** Repetitividade para ácido fólico encontrados em bolo, mix, farinha de trigo e farinha de milho.

<i>Amostra</i>	<i>Nível Adição I</i> <i>µg 100 g<sup>-1</sup></i>	<i>Nível Adição II</i> <i>µg 100 g<sup>-1</sup></i>	<i>Nível Adição III</i> <i>µg 100 g<sup>-1</sup></i>
<b>Bolo de fubá (CA+CP)*</b>	52 + 13	52 + 26	52 + 52
<b>M ± DP**</b>	64,61 ± 2,77	77,23 ± 4,55	102,72 ± 5,04
<b>CV%***</b>	4,29	5,89	4,91
<b>Mix (CA+CP)*</b>	172 + 43	172 + 86	172 + 172
<b>M ± DP</b>	215,30 ± 9,55	256,53 ± 12,08	346,11 ± 11,18
<b>CV%</b>	4,43	4,71	3,23
<b>Farinha de trigo (CA+CP)*</b>	153 + 38	153 + 76	153 + 153
<b>M ± DP</b>	189,08 ± 10,95	224,94 ± 13,51	299,10 ± 14,95
<b>CV%</b>	5,79	6,00	5,00
<b>Fubá de milho (CA+CP)*</b>	175 + 43	175 + 87	175 + 175
<b>M ± DP</b>	216,34 ± 10,87	258,38 ± 12,29	351,98 ± 13,78
<b>CV%</b>	5,03	4,76	3,92

\*CA+CP: Concentração da amostra + concentração do padrão de ácido fólico.

\*\*M ± DP: média de dez determinações ± estimativa do desvio padrão. \*\*\*CV: % coeficiente de variação.

**TABELA 2.** Precisão intermediária para o ácido fólico encontrados em bolo, mix, farinha de trigo e farinha de milho.

<i>Bolo de Fubá</i>		<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>CV %*** (3 dias)</i>
Nível I (52+13 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	65,28 ± 3,47	64,61 ± 3,76	64,79 ± 3,20	0,53
	CV%**	5,31	5,81	4,94	
Nível II (52+26 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	77,09 ± 3,78	79,19 ± 4,40	76,40 ± 5,10	1,87
	CV%**	4,91	5,56	6,68	
Nível III (52+52 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	102,64 ± 4,70	101,58 ± 5,21	104,00 ± 5,96	1,18
	CV%**	4,57	5,13	5,73	
<i>Mix</i>		<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>CV %*** (3 dias)</i>
Nível I (172+43 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	213,42 ± 10,65	215,50 ± 12,36	214,19 ± 12,45	0,47
	CV%**	4,99	5,74	5,81	
Nível II (172+86 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	257,05 ± 11,34	256,07 ± 14,86	254,54 ± 14,61	0,77
	CV%**	4,41	5,80	5,74	
Nível III (172+172 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	345,14 ± 10,14	338,64 ± 17,95	342,02 ± 13,14	1,15
	CV%**	2,94	5,30	3,84	
<i>Farinha de Trigo</i>		<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>CV %*** (3 dias)</i>
Nível I (153+38 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	188,35 ± 10,18	189,85 ± 13,63	188,86 ± 11,56	0,40
	CV%**	5,40	7,18	6,12	
Nível II (153+76 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	224,36 ± 11,62	223,89 ± 16,21	225,54 ± 14,44	0,38
	CV%**	5,18	7,24	6,40	
Nível III (153+153 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	300,21 ± 11,87	299,43 ± 16,33	298,41 ± 14,38	0,30
	CV%**	3,95	5,45	4,82	
<i>Fubá de milho</i>		<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>CV %*** (3 dias)</i>
Nível I (175+43 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	216,42 ± 11,68	215,67 ± 12,22	216,79 ± 13,55	0,26
	CV%**	5,40	5,66	6,25	
Nível II (175+87 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	257,12 ± 11,55	259,07 ± 13,30	258,11 ± 14,80	0,38
	CV%**	4,49	5,13	5,73	
Nível III (175+175 µg 100 g <sup>-1</sup> )	M ± DP*	349,79 ± 13,12	342,14 ± 15,35	355,68 ± 13,78	1,95
	CV%**	3,75	4,49	4,82	

\*M ± DP: média de três determinações ± estimativa do desvio padrão. \*\*CV: % coeficiente de variação.

\*\*\*CV: % coeficiente de variação entre os 3 dias.

**TABELA 3.** Repetitividade para ácido fólico encontrados em suco e leite de soja.

<i>Amostra</i>	<i>Nível Adição I</i> $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$	<i>Nível Adição II</i> $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$	<i>Nível Adição III</i> $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$
Suco de soja (CA+CP)*	18,5 + 4,5	18,5 + 9,0	18,5 + 18,0
M ± DP**	22,79 ± 1,84	27,05 ± 2,10	35,96 ± 2,29
CV%***	8,09	7,77	6,36
Leite de soja (CA+CP)*	18,0 + 4,5	18,0 + 9,0	18,0 + 18,0
M ± DP**	22,79 ± 1,84	26,62 ± 2,12	35,79 ± 2,09
CV%***	8,09	7,97	5,83

\*CA+CP: Concentração da amostra + concentração do padrão de ácido fólico.

\*\*M ± DP: média de dez determinações ± estimativa do desvio padrão. \*\*\*CV: % coeficiente de variação.

**TABELA 4.** Precisão intermediária para ácido fólico encontrados em suco e leite de soja.

<i>Suco de soja</i>		<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>CV %</i> <i>(3 dias)***</i>
Nível I (18,5+4,5 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	M ± DP*	22,87 ± 1,80	23,13 ± 2,05	22,77 ± 1,90	0,83
	CV%**	7,85	8,86	8,36	
Nível II (18,5+9,0 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	M ± DP*	27,10 ± 1,93	28,03 ± 2,35	26,80 ± 2,38	2,36
	CV%**	7,12	8,38	8,88	
Nível III (18,5+18,0 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	M ± DP*	35,97 ± 1,99	35,83 ± 2,32	37,27 ± 2,51	2,18
	CV%**	5,52	6,47	6,74	
<i>Leite de soja</i>		<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>CV %</i> <i>(3 dias)***</i>
Nível I (18,0+4,5 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	M ± DP*	22,87 ± 1,80	23,13 ± 2,05	22,77 ± 1,90	0,83
	CV%**	7,85	8,86	8,36	
Nível II (18,0+9,0 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	M ± DP*	27,10 ± 1,93	28,03 ± 2,35	26,80 ± 2,38	2,36
	CV%**	7,12	8,38	8,88	
Nível III (18,0+18,0 $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	M ± DP*	35,97 ± 1,99	35,83 ± 2,32	37,27 ± 2,51	2,18
	CV%**	5,52	6,47	6,74	

\*M ± DP: média de três determinações ± estimativa do desvio padrão. \*\*CV: % coeficiente de variação.

\*\*\*CV: % coeficiente de variação entre os 3 dias.

### 3.1.6. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada mediante testes de recuperação do padrão adicionado de ácido fólico encontrado nas matrizes, apresentados na Tabela 5.

Neste trabalho a recuperação encontrada nas matrizes analisadas variou em média entre 92 e 106 % para todas as matrizes estudadas, verificando assim valores muito próximos aos obtidos por Patring (2007), que alcançou valores de 89 % a 106 %, Rybka (2010) que obteve de 92 % a 107 % de recuperação em cervejas.

**TABELA 5.** Valores de recuperação para o ácido fólico encontrados em bolo, mix, farinha de trigo, fubá de milho, suco e leite de soja em três níveis de adição.

<i>Amostra</i>	<i>Nível 1 Recuperação %</i>	<i>Nível 2 Recuperação %</i>	<i>Nível 3 Recuperação %</i>	<i>Faixa de Recuperação %</i>
Bolo de fubá	97 – 102	93 – 104	95 – 100	93 – 104
Mix	96 – 101	95 – 98	96 – 99	95 – 101
Farinha de Trigo	93 – 97	93 – 94	94 – 96	93 – 97
Fubá de Milho	94 – 97	94 – 96	95 – 103	94 – 103
Suco de soja	95 – 103	92 – 106	96 – 104	92 – 106
Leite de Soja	96 – 103	94 – 96	96 – 104	94 – 104

### 3.1.7. Aplicação da metodologia em amostras

Para a avaliação do teor de ácido fólico no bolo de fubá, mix, farinha de trigo e fubá de milho foi aplicada a metodologia desenvolvida por CLAE. A Tabela 6 apresenta o teor médio de ácido fólico encontrado em uma amostra de cada matriz analisada e o valor de CV % para cada amostra.

O maior valor obtido para o ácido fólico foi para as farinhas fortificadas (mix, trigo e fubá), variando em média de aproximadamente  $145 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  a  $190 \mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ . Para o bolo (alimento indiretamente fortificado) o valor médio obtido nesta amostra foi de  $50 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Já para os alimentos à base de soja o valor médio aproximado foi de  $20 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ .

**TABELA 6.** Teor médio de ácido fólico (AF) em bolo, mix, farinha de trigo, fubá de milho, suco de soja e leite de soja.

<i>Amostras</i>	<i>Faixa de Conc.* <math>\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}</math></i>	<i>AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}</math> <math>M \pm DP^{**}</math></i>	<i>CV %</i>
Bolo de fubá	43,38 – 62,51	$51,42 \pm 5,10$	9,91
Mix	147,67 – 190,62	$170,47 \pm 13,01$	7,63
Farinha de trigo	129,38 – 171,80	$147,91 \pm 13,37$	9,04
Fubá de Milho	163,35 – 224,49	$188,99 \pm 18,78$	9,94
Suco de soja	18,90 – 23,80	$21,02 \pm 1,51$	7,17
Leite de soja	17,95 – 23,60	$20,79 \pm 1,81$	8,73

\*Faixa de concentração: menor e maior concentração.

\*\*M  $\pm$  DP: média das amostras  $\pm$  estimativa do desvio padrão. CV: % coeficiente de variação.

#### **4. Conclusões**

O método desenvolvido usando a cromatografia líquida de alta eficiência associado à detecção de arranjo de diodos (DAD) demonstrou ser adequado para a determinação e quantificação de ácido fólico, por meio dos parâmetros avaliados.

O cromatograma das amostras apresentou o ácido fólico bem separado, com resolução compatível com a cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados obtidos, para o CV % encontrado de no máximo 9,0 % e recuperação encontrada nas análises entre 92 e 106 %, demonstraram que o método desenvolvido foi eficiente, rápido e preciso para a quantificação de ácido fólico nas diversas matrizes estudadas.

#### **5. Agradecimentos**

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos, Laboratório de Análise de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto e a CAPES e CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

## 6. Referências Bibliográficas

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução nº 899, de 25 de Maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Acesso em: 12/10/2009.
- AGOSTINO, T.S. Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos, 1996, 81p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- ALABURDA, J.; ALMEIDA, A.P.; SHUNDO, L., RUVIERI, V.; SABINO, M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21: 336–342, 2008.
- ALPERT, J.E.; MISCHOULON, D.; NIERENBERG, A. A.; FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, 16(7/8): 544-546, 2000.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate: methods of analysis. **Food Science and Technology**, 16: 253-266, 2005.
- BRODY, T. **Folic acid In: MACHLIN, L. J. Handbook of Vitamins**. 2 ed Rev. and Expanded, New York: Marcel Decker, 1991, p 453-490.
- CATHARINO, R.R.; VISENTAINER, J.V.; GODOY, H.T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23(3): 389-395, 2003.
- CRANE, N.T. et al. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal Public Health**, 85(5): 660-666, 1995.
- CZEIZEL, A.E. Ácido fólico. In: Vitaminas na gravidez e na primeira infância. **Anais Nestlé**, 53: 22-9, 1996.
- CZEIZEL, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional 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. **The Lancet**, 350(9092): 1666-1669, 1997.
- DANG, J.; ARCOT J.; SHRESTHA, A. Folate retention in select processed legumes. **Food Chemistry**, 68(3): 295-298, jan 2000.
- DROGUETTI, D.C.; PENTEADO, M.V.C. Ácido fólico. In: PENTEADO, M. V. C. (Ed.) **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri: Manole, 2003, p. 487-524.
- (EC) EUROPEAN COMMISSION; **Official Journal of the European Communities**, L221/8-36, 17/08/2002.
- FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L. WITTHÖFT, C.; SOUTHON, S., FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, 64: 245-255, 1999.

- (FAO) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; **Validation of Analytical Methods for Food Control December**, 1997.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos** 9ed. São Paulo: Atheneu, 1992, 307p.
- (INMETRO) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL; **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, revisão 03, 2010.
- IUPAC. <http://goldbook.iupac.org/R05305.html>. Acesso em Outubro de 2009.
- JACQUES, P.F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A.G.; WILSON, P.W.F.; ROSENBERG, I.H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **New England Journal of Medicine**, 340: 1449-1454, 1999.
- LIMA, J.A. Folatos em Vegetais – Influência do Tipo de Cultivo e do Processamento, 2005, 84p. Tese (Doutora em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2005.
- LIMA, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos – estudo da vida-de-prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24(1): 082-087, jan.-mar. 2004.
- LORENZI, T.F. **Eritócitos** In: Aires, MM. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.63-74.
- LUCOCK, M. Z. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Molecular Genetics of Metabolism**, 71: 121-128, 2000.
- MILLER J. C.; MILLER J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**, Ellis Horwood; New York, 1993.
- MILUNSKY, A.; JICK, H.; JICK, S.S. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. **Journal of the American Medical Association**, 262: 2847-2852, 1989.
- MOAT, S.J.; LANG, D.; McDOWELL, I.F.W. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition Biochemistry**, 15: 64-79, 2004.
- PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, 31(5), 1190-1198, 2008.
- PANE, D.Q. Ácido fólico em chocolates. 2007, 46p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2007.
- PATRING, J. Development and Validation of Chromatographic Methods of Folate Derivatives Produced by Yeasts. 2007, 65p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2007.
- QUIRÓS, A.R.B.; RON, C.C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; LAGE-YUSTY, M.A. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, 1032: 135-139, 2005.
- RADER, J.I.; WEAVER, C.M.; AGYAL, G. Use of microbiological assay with trienzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**, 62(4): 451-465, 1998.

- RAUCH, P.; K.A.S.J.; STREJCEK, F.; CERNA, J. Radioassay of folacin in foodstuffs. **Journal of foods biochemistry**, 13(1): 21-29, 1989.
- RYBKA, A.C.P. Folatos, capacidade antioxidante e trans-2-nonenal em cerveja brasileira Compostos funcionais e de controle de qualidade associados à cerveja, 2010, 160p. Tese (Doutora em Ciência de alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- RODRIGUEZ, L.C.; CAMPANA, A.M.G.; BARRERO, F.A.; LINARES, C.J.; CEBA,M.R. Validation of analytical instrumental method by standard addition methodology. **Journal of AOAC International**, 78(2): 471-476, 1995.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review; Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80: 795-824, feb 2000.
- SHAW, G.M.; SCHAFFER, D.; VELIE, E.M. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. **Epidemiology**, 6: 219-226, 1995.
- THE NATIONAL FINDIET STUDY, In: Männistö, S., Ovaskainen, M. L., Valsta, L. (Eds). **Publications of the National Public Health Institute**, B3/2003. Helsinki, Finland, 2003.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, 74(5): 835-855, 2002.
- VANNUCCHI, H.; JORDÃO JR, A.A. **Vitaminas hidrossolúveis**. In: Dutra-de-Oliveira, JE, Marchini JS . Ciências Nutricionais. São Paulo: Sarvier, 1998, p.191-207.

---

### Artigo 3

## **DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO E FERRO EM BOLO DE FUBÁ, FARINHA DE TRIGO, FUBÁ DE MILHO E MIX**

Elede Martins Elias e Helena T. Godoy \*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

\* [helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)



## RESUMO

Ácido fólico e ferro são nutrientes essenciais que freqüentemente estão deficientes nas dietas da população em geral, e são necessários para o desenvolvimento normal do sistema hematopoiético, e a deficiência desses dois nutrientes pode acarretar problemas à saúde. Como medida preventiva, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou a obrigatoriedade da fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, à partir de junho de 2004. Para cada 100 g de farinha de milho ou trigo deve conter no mínimo 150 µg de ácido fólico, 70% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) e 4,2 mg de ferro, equivalente a 30% da IDR. Portanto, o objetivo deste trabalho foi quantificar o teor de ácido fólico e ferro em bolo de fubá e nos ingredientes que são utilizados em seu preparo tais como a farinha de trigo, o fubá de milho e mix para verificar se a fortificação está sendo feita adequadamente. O método utilizado para a determinação do ácido fólico foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a validação nas matrizes analisadas foi descrita no Artigo 2. Os teores de ácido fólico encontrados variaram de 41,68 a 96,96 µg 100 g<sup>-1</sup> no bolo, 130,64 a 159,66 µg 100 g<sup>-1</sup> na farinha de trigo, 174,34 a 217,32 µg 100 g<sup>-1</sup> no fubá de milho e 156,93 a 181,29 µg 100 g<sup>-1</sup> no mix, estes resultados indicaram, em geral, uma falta de uniformidade nos teores de ácido fólico para as farinhas. Já para o ferro a determinação quantitativa foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com chama e metodologia segundo Boen et al., 2008. Os teores de ferro encontrados oscilaram entre 1,29 a 2,93 mg 100 g<sup>-1</sup> no bolo, 4,02 a 4,62 mg 100 g<sup>-1</sup> na farinha de trigo, 4,15 a 4,31 mg 100 g<sup>-1</sup> no fubá de milho e 4,32 a 4,44 mg 100

g<sup>-1</sup> no mix, demonstrando que estas amostras estavam dentro do recomendado pela legislação. A variação dos CV foi de 3,33 a 8,99 % para o ácido fólico e 1,39 a 4,19 % para o ferro.

Palavras-chave: Ácido fólico, ferro, bolo de fubá, quantificação, CLAE.

## ABSTRACT

Folic acid and iron are essential nutrients that are often deficient in the diets of the general population and are necessary for normal development of the hematopoietic system, and deficiency of these two nutrients can cause health problems. As a precautionary measure, the National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA) regulates the mandatory fortification of flour and corn grain with folic acid and iron, as of June 2004. For every 100 g of corn or wheat flour should contain at least 150 micrograms of folic acid, 70% of the Recommended Daily Intake (RDI) and 4.2 mg of iron, equivalent to 30% of the RDA. and 4.2 mg of iron. Therefore, the aim of this study was to quantify the level of folic acid and iron in maize cake and its ingredients used during the preparation such as wheat flour, corn meal and mix in order to determine if fortification is being done properly. The method for determination of folic acid used was high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis and validation in the matrices was described in Article 2. The levels of folic acid found ranged from 41,68 a 96,96  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  in cake, 130,64 a 159,66  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  in wheat flour, 174,34 a 217,32  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  in corn meal and 156,93 a 181,29  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  in mix, these results indicated that, in general, a lack of uniformity in the levels of folic acid to flour. As for the iron was quantitatively determined by atomic absorption spectrophotometry with flame and methodology according Boen et al., 2008. The levels in the cake, wheat flour, corn meal and mix ranged from 1,29 a 2,93  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in cake, 4,02 a 4,62  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in wheat flour, 4,15 a 4,31  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in corn meal and 4,32 a 4,44  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  in mix,

showing that these samples were therefore according to the recommendations. The variations of CV were 3,33 to 8,99 % for folic acid and 1,39 to 4,19 % for iron.

Keywords: Folic acid, iron, cornmeal cake, quantification, HPLC.

## 1. Introdução

O uso da fortificação de alimentos, incluindo a adição de vitaminas e minerais, tem sido um dos melhores processos para tentar amenizar as carências nutricionais de micronutrientes da população em todo o mundo.

Dentre as vitaminas do complexo B destaca-se, hoje, o ácido fólico, também chamado de vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>9</sub> ou M. O ácido fólico está envolvido em diversas reações metabólicas importantes, atua como coenzima no metabolismo de aminoácidos (glicina) e síntese de purinas e pirimidinas, síntese de ácido nucléico DNA e RNA, sendo fundamental para o bom funcionamento do organismo. Sua carência tem sido associada a males como doenças cardiovasculares, certos tipos de cânceres, mal de Alzheimer e problemas neurológicos (FOKKEMA, MEIJER e DE JONG-VAN DEN BERG, 2005; MUSKIET, 2005).

Estudos também relatam a importância do ácido fólico na prevenção dos defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) que são malformações congênitas resultantes do fechamento incorreto ou incompleto do tubo neural entre a terceira e quarta semana do desenvolvimento embrionário e englobam a anencefalia, encefalocele e espinha bífida (BOYLES et al., 2006). Indicações de redução, em torno de 50 % a 70 % na ocorrência de tais defeitos congênitos após a suplementação periconcepcional deste nutriente têm feito várias organizações de saúde recomendar a sua utilização (CZEIZEL e DUDÁS, 1992; INSTITUTE OF MEDICINE 1998). Entretanto se altos teores de ácido fólico forem introduzidos pode haver um atraso no diagnóstico da deficiência de vitamina B12 e diminuir a absorção de minerais como ferro e zinco (QUINLIVAN e GREGORY, 2003).

Um dos micronutrientes que têm sido bastante estudados é o ferro, desempenhando importantes funções no metabolismo humano, tais como transporte e armazenamento de oxigênio, reações de liberação de energia na cadeia de transporte de elétrons, conversão de ribose e desoxirribose, cofator de algumas reações enzimáticas e outras reações metabólicas essenciais (COOK, BAYNES e SKIKNE, 1992).

A anemia é considerada a principal consequência da deficiência de ferro sendo a patologia de maior prevalência em todo o Mundo, principalmente na população infantil e em mulheres grávidas de países em desenvolvimento (PAIVA, RONDÓ e GUERRA SHINOHARA, 2000). Estima-se que cerca de 4 a 5 bilhões de pessoas (cerca de 66-80 % da população mundial) estejam em risco de desenvolver deficiência de ferro, enquanto 30 % da população mundial (2 bilhões de pessoas) já apresenta esta anemia ferropriva (WHO, 2005).

Em sua fase mais avançada, está associada a sintomas clínicos, como fraqueza, diminuição da capacidade respiratória e tontura. Mesmo na ausência da anemia, a deficiência de ferro pode acarretar distúrbios neurocognitivos (COOK, BAYNES e SKIKNE, 1992). Entretanto o excesso de ingestão de ferro pode causar efeitos adversos sobre a absorção de outros nutrientes inorgânicos, como o cobre e o zinco; promover o risco de câncer e o aparecimento de doenças coronárias (FAIRWEATHER-TAIT et al., 1997; MARTÍNEZ-NAVARRETE et al., 2002).

No Brasil, a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, a partir de junho de 2004. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver

150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro no mínimo (ANVISA, 2002). A medida visou reduzir os altos índices de anemia e outras doenças decorrentes da carência em ácido fólico e ferro.

Os cereais são importantes fontes de vitamina do complexo B e E. Quando a farinha branca é produzida, as vitaminas do grão inteiro são fracionadas em frações do farelo e germe de modo que a farinha branca contém menos de metade do nível de vitaminas presentes nos cereais integrais (HAKANSSON et al., 1987).

Os cereais como a farinha e o fubá foram os primeiros alimentos, no Brasil, a serem enriquecidos com ácido fólico e ferro uma vez que são muito consumidos pela população em geral, podendo suprir grande parte das necessidades diárias da vitamina.

O processo de fortificação nas farinhas deve ser cuidadoso em função da pequena quantidade de ferro e ácido fólico adicionado em um grande volume de farinha. A fortificação é realizada agregando-se geralmente um mix de ferro elementar e ácido fólico à farinha de trigo, utilizando um alimentador / dosador. Este equipamento possibilita a adição de ferro, cujo fluxo deve ser controlado para que a adição ocorra de forma contínua e constante. Portanto, a etapa crítica para a produção de farinhas fortificadas seria provavelmente o ajuste dos fluxos da farinha e da adição da mistura contendo ferro e ácido fólico. Após a adição do mix, a farinha é homogeneizada para que haja uma distribuição uniforme do ferro (GERMANI et al., 2001).

A escolha dos compostos de ferro e de ácido fólico para fortificação das farinhas é de responsabilidade dos moinhos, mas devem garantir a estabilidade

nas farinhas de trigo e fubá dentro dos prazos de validade das mesmas, que os compostos de grau alimentício sejam biodisponíveis e que quantidades adequadas dos micronutrientes sejam adicionadas nos cereais (GERMANI et al., 2001).

Neste contexto, é importante que os produtos fortificados sejam controlados para que os teores de ferro e ácido fólico estejam dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi aplicar o método desenvolvido e validado por CLAE para a determinação dos teores de ácido fólico em alimentos, neste caso o bolo de fubá e seus ingredientes utilizados em seu preparo tais como a farinha de trigo, o fubá de milho e mix e também a determinação dos teores de ferro por absorção atômica nas mesmas matrizes descritas acima.

## **2. Parte Experimental**

### **2.1. Produtos analisados**

As amostras de bolo de fubá, mix (preparado de farinha de trigo com fubá de milho), farinha de trigo e fubá de milho foram adquiridas na cidade de Campinas. O bolo de fubá foi obtido de três diferentes fornecedores. Apenas um fornecedor utilizava o mix em sua preparação e os outros dois utilizavam a farinha de trigo e fubá de milho separadamente. Para o bolo de fubá foram analisados 3 lotes e em cada lote foram analisadas 5 amostras. Já para os ingredientes utilizados no preparo dos bolos (mix, farinha de trigo e fubá de milho) foram

analisados 3 lotes mas em cada lote foi analisada apenas uma amostra, pois de cada lote o fornecedor utilizava os ingredientes preparar as 5 amostras de bolos. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

## **2.2. Determinação de umidade para bolo de fubá e ingredientes**

Foi utilizado o método por secagem em estufa (Nova Ética, 400/3ND, nº série 0766/00) a temperatura de 105 °C, até peso constante. As determinações de umidade foram feitas para expressar as concentrações de ácido fólico em base seca, todas as análises foram feitas em triplicata.

Para o bolo de fubá a umidade variou entre 27 a 31 %, para o mix variou entre 17 a 19 %, para a farinha de trigo variou entre 22 a 29 % e para o fubá de milho variou entre 11 a 15 %.

## **2.3. Determinação do ácido fólico**

### **2.3.1. Reagentes**

O padrão de ácido fólico (lote: F-7876 com 98 % de pureza aproximadamente) foi adquirido da SIGMA (USA). A acetonitrila, grau cromatográfico, fosfato de potássio monobásico, o ácido acético e tricloroacético, grau analítico, foram adquiridos da Merck (Brasil). A água utilizada no preparo do tampão, das amostras e da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). A fase móvel, os solventes orgânicos, as soluções padrões e as amostras foram filtradas em filtros de membrana da Millipore (HAWP e HAWP04700), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

### 2.3.2. Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100 (Agilent), com injetor automático e capacidade de 1 até 100  $\mu\text{L}$ , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível e de fluorescência, dispostos em série e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica. O software HP-Chemstation foi utilizado para administração do sistema de aquisição e tratamento de dados. A coluna utilizada para o processo cromatográfico foi uma Hypersil, ODS-2, 3  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 4.6 mm d.i.

### 2.3.3. Método

A análise foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a extração inicialmente a amostra foi homogeneizada e pesado 1,0 g. Foram adicionados 3,0 mL de KOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Logo após foi adicionado 1,5 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 2.6 com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Finalmente foi adicionado mais 0,5 mL de ácido tricloroacético de forma cuidadosa (sem agitação brusca) e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida todas as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 125000 x g, após isto foram filtradas em papel de filtro Watmamm (0,45  $\mu\text{m}$ ).

Para a amostra de farinha de trigo houve modificação na extração com adição de um modificador orgânico para melhores resultados. Iniciou-se portanto a extração com 1,0 mL de acetonitrila, 2,5 mL de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , e 1,0 mL de tampão fosfato de potássio monobásico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2.6, após isto, procedeu-se da mesma forma conforme descrito anteriormente.

Todas as amostras, as soluções padrões e a fase móvel foram filtradas em membrana  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  (Millipore HAWP e HAWP04700). Os extratos purificados foram injetados, volume de  $100 \text{ }\mu\text{L}$ , e imediatamente analisados utilizando CLAE.

A fase móvel utilizada para a separação do ácido fólico foi uma solução de ácido acético glacial 2,0 %, com pH ajustado para 2,7 com KOH, a uma vazão de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ .

O ácido fólico (AF) foi separado em sistema de eluição por gradiente, iniciando com 90 % de solução aquosa de ácido acético e 10 % de acetonitrila (v/v), chegando em 5 minutos a 80 % de solução ácido acético e 20 % de acetonitrila (v/v), e então a concentração de acetonitrila foi mantida nessas condições até o final da corrida, em 10 minutos. Após isto um período de limpeza foi feito com 100 % de acetonitrila até 15 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 5 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD). O ácido fólico foi detectado na região do ultravioleta com 290 nm.

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. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação foi feita por

padronização externa e a curva de calibração foi construída para a forma da vitamina encontrada no alimento analisado, sendo cada ponto representado pela média de três determinações com mínimo de 5 pontos. A validação do método está descrita no Artigo 2.

## **2.4. Determinação do ferro**

### **2.4.1. Reagentes**

Os reagentes de grau analítico como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio bem como o ácido clorídrico comercial (preparação do banho de limpeza para frascos utilizados para determinação de ferro) foram adquiridos da Merck ou Synth (Brasil).

### **2.4.2. Equipamento**

Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo Analyst 3110, com uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco foi utilizado para determinação de ferro (248,3 nm), fabricado pela Perkin Elmer.

### **2.4.3. Limpeza das vidrarias**

Todas as vidrarias foram lavadas em banho de detergente e enxaguadas com água até total eliminação de espumas. Foram colocadas todas as vidrarias em banho de ácido (clorídrico comercial) 10 % (v/v), mantidas no banho por, pelo

menos, 12 horas e após isto foram enxaguadas com água deionizada. As vidrarias foram secas ao ar livre.

#### **2.4.4. Mineralização das amostras**

Foram pesadas em papéis vegetais, cerca de 0,6000 g de cada uma das matrizes avaliadas. As amostras foram transferidas para tubos de digestão e 2 mL de ácido nítrico concentrado foi adicionado. Preparou-se, também, dois tubos “brancos” (sem as amostras).

Após isto, colocaram-se pequenos funis na entrada de cada tubo de digestão e levados para o bloco digestor para iniciar o aquecimento. A temperatura foi ajustada para 100 °C. Os funis permitiram que o ácido nítrico ficasse em refluxo e o aquecimento foi mantido por 2 horas. Os tubos foram retirados do aquecimento e resfriados em água corrente. Após o resfriamento foi adicionado, 1 mL de peróxido de hidrogênio em cada tubo (inclusive nos brancos) e levados novamente para o bloco digestor e, desta vez, a temperatura foi ajustada para 110 °C, por 30 minutos. A temperatura foi aumentada para 130 °C e deixada por mais 1 hora. Então os tubos foram retirados do bloco digestor e deixados em repouso até total resfriamento.

Adicionou-se uma pequena quantidade de água deionizada (5 mL) aos tubos de digestão e estes foram colocados em um banho de ultra-som por alguns segundos. O conteúdo dos tubos foi transferido para balões volumétricos de 25 mL e completado o volume.

As determinações de ferro foram feitas, em triplicata, utilizando-se a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Analytical Methods Committee, 1987).

#### **2.4.5. Determinação quantitativa do ferro**

A determinação quantitativa de ferro foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com chama em aparelho marca Perkin Elmer, modelo 3110. O líquido foi aspirado com a ajuda de um nebulizador pneumático e misturado ar (oxidante) e acetileno (combustível), 10 e 3 L<sup>-1</sup> de fluxo médio, respectivamente.

Uma lâmpada de deutério foi utilizada para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco para determinação de ferro (248,3 nm) de acordo com a metodologia proposta e validada de acordo Boen et al, 2008. Os resultados das análises realizadas em triplicata foram expressos em mg 100 g<sup>-1</sup>.

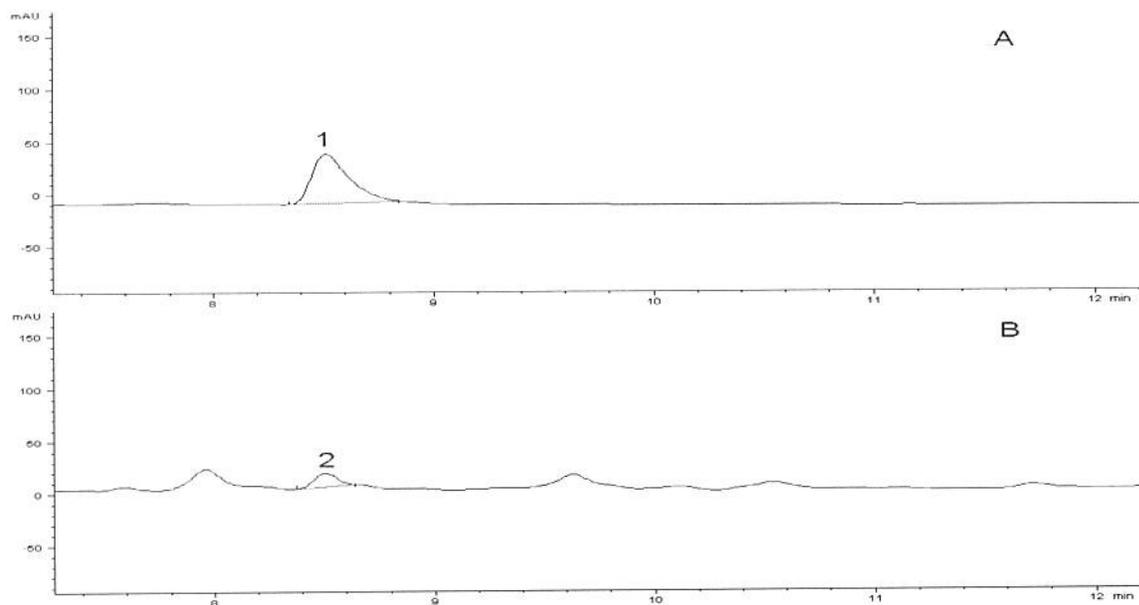
#### **2.5. Análise Estatística dos Resultados**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey, ao nível de 95 % de confiança, utilizando-se o software *Statistica*, versão 7.0.

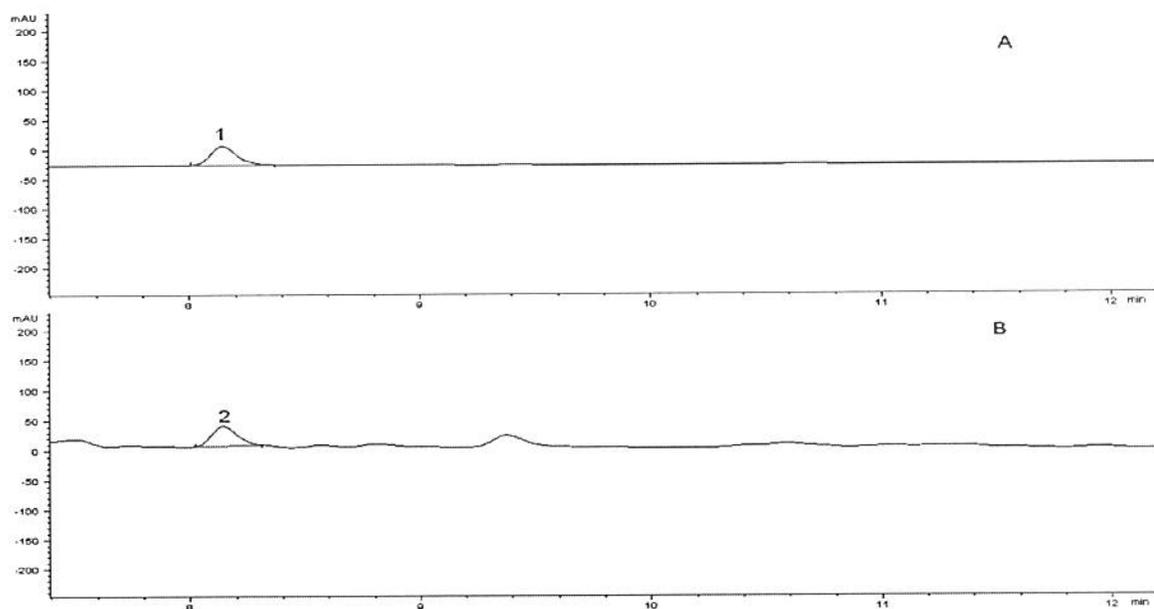
### **3. Resultados e Discussão**

Nas Figuras 1, 2, 3, 4 podem ser visualizados os perfis cromatográficos do padrão de ácido fólico (A1) de amostra de bolo, mix, fubá de milho e farinha de

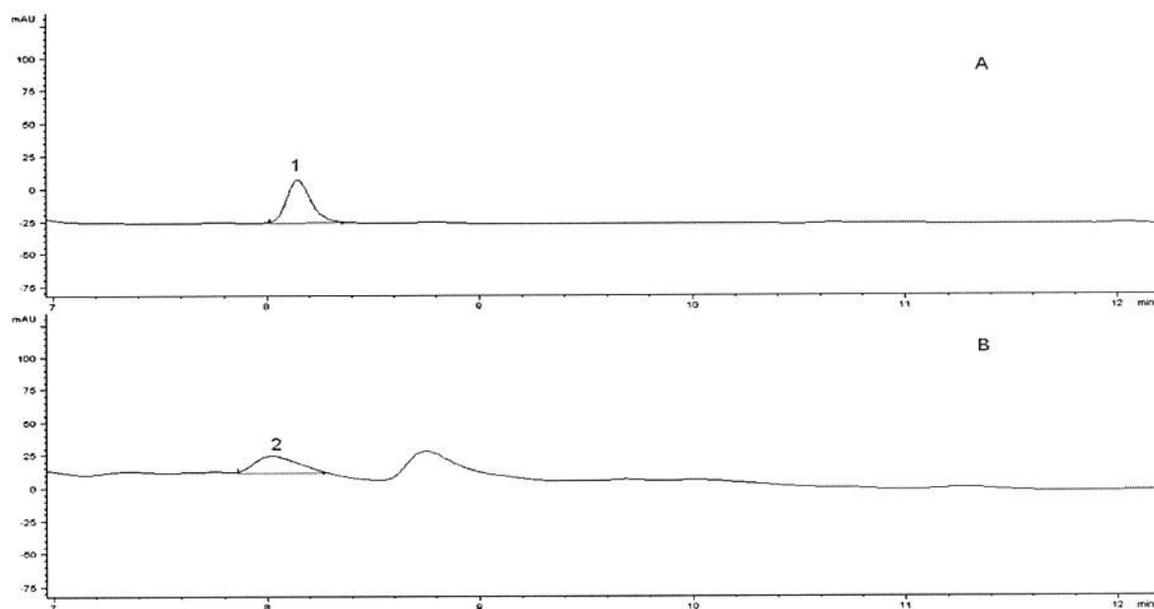
trigo (B2). Os tempos de retenção encontrados nas matrizes analisadas foram 8,52 min para o bolo, 8,13 min para o mix, 8,05 min para a fubá de milho e 8,38 min para a farinha de trigo.



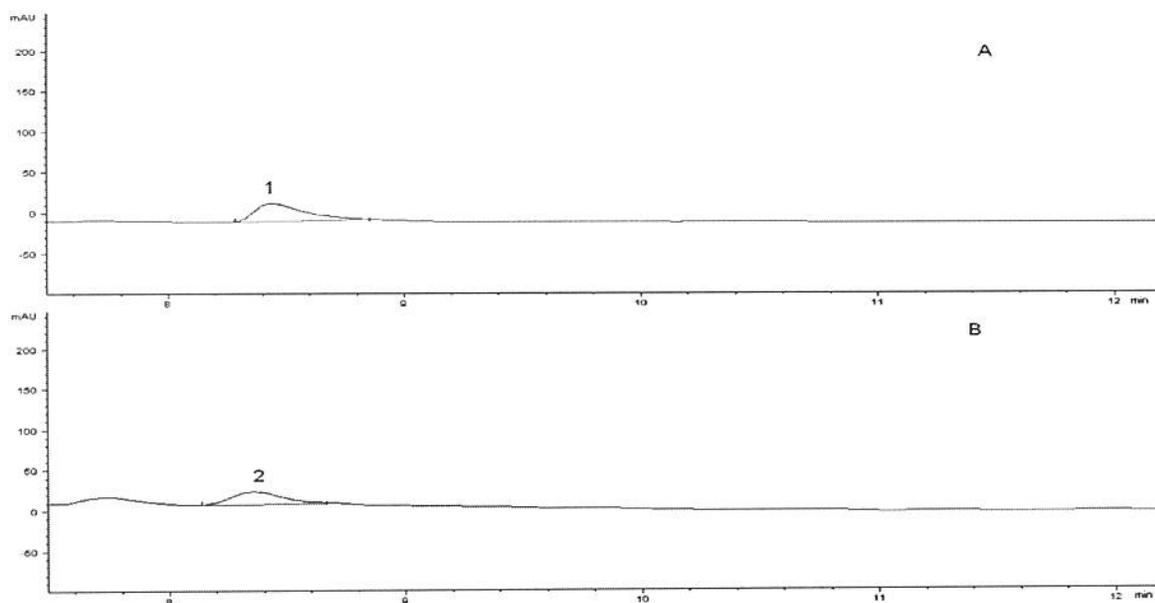
**Figura 1:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de bolo (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,53 min) e 2 (8,52 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 2:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de mix (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,14 min) e 2 (8,13 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 3:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de Fubá (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,15 min) e 2 (8,05 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 4:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de Trigo (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,42 min) e 2 (8,38 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.

Para a avaliação do teor de ácido fólico e ferro o bolo de fubá, mix, farinha de trigo e fubá de milho foram analisados amostras de 3 diferentes fornecedores demonstrados nas Tabelas 1 e 2. Os fornecedores A e B utilizaram no preparo do bolo a farinha de trigo e o fubá de milho e o fornecedor C utilizou o mix (farinha de trigo e fubá de milho). Os bolos foram adquiridos na cidade de Campinas.

**TABELA 1.** Teor de ácido fólico (AF) em bolo, mix, farinha de trigo e fubá de milho.

<i>Amostra</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>Lote</i>	<i>Faixa de Conc. μg 100 g<sup>-1</sup></i>	<i>AF μg 100 g<sup>-1</sup> M ± DP</i>	<i>CV %</i>
<b>Bolo de fubá*</b>	A	1	39,87 - 49,82	45,25 ± 3,18 <sup>a</sup>	7,02
		2	36,45 - 51,50	43,48 ± 3,91 <sup>a</sup>	8,99
		3	37,77 - 49,61	41,68 ± 2,22 <sup>a</sup>	5,33
	B	1	44,50 - 62,51	54,52 ± 1,89 <sup>a</sup>	3,47
		2	43,38 - 52,37	47,51 ± 1,91 <sup>a</sup>	4,02
		3	45,58 - 58,65	52,24 ± 1,74 <sup>a</sup>	3,33
	C	1	90,25 - 106,75	96,96 ± 5,18 <sup>a</sup>	5,34
		2	76,39 - 93,08	82,81 ± 5,33 <sup>a</sup>	6,44
		3	80,72 - 96,07	89,30 ± 5,22 <sup>a</sup>	5,84
<b>Mix**</b>	C	1	173,81 - 190,62	181,29 ± 8,56 <sup>a</sup>	4,72
		2	147,67 - 167,75	156,93 ± 10,13 <sup>a</sup>	6,46
		3	165,77 - 185,99	173,17 ± 11,15 <sup>a</sup>	6,44
<b>Farinha de trigo**</b>	A	1	129,38 - 152,39	139,37 ± 11,80 <sup>a</sup>	8,47
		2	144,92 - 183,29	159,66 ± 10,52 <sup>a</sup>	6,59
		3	135,42 - 157,64	144,70 ± 11,55 <sup>a</sup>	7,99
	B	1	135,44 - 160,14	147,19 ± 12,40 <sup>a</sup>	8,42
		2	123,33 - 139,97	130,64 ± 8,50 <sup>a</sup>	6,51
		3	146,20 - 165,57	155,01 ± 9,80 <sup>a</sup>	6,32
<b>Fubá de milho**</b>	A	1	199,90 - 215,55	207,92 ± 7,83 <sup>a</sup>	3,77
		2	202,30 - 232,05	217,32 ± 14,87 <sup>a</sup>	6,84
		3	185,63 - 213,27	198,72 ± 13,88 <sup>a</sup>	6,98
	B	1	195,35 - 230,32	208,14 ± 14,21 <sup>a</sup>	6,83
		2	163,35 - 182,35	175,34 ± 10,43 <sup>a</sup>	5,95
		3	169,90 - 199,00	183,49 ± 14,99 <sup>a</sup>	8,17

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre lotes, mesmo fornecedor (p>0,05).

\*Faixa de concentração: menor e maior concentração (n=15)

\*\*Faixa de concentração: menor e maior concentração (n=3)

\*M ± DP: média das amostras (n=15) ± estimativa do desvio padrão. \*CV: % coeficiente de variação.

\*\*M ± DP: média das amostras (n=3) ± estimativa do desvio padrão. \*\*CV: % coeficiente de variação.

**TABELA 2.** Teor de ferro (Fe) em bolo, mix, farinha de trigo e fubá de milho.

Amostra	Fornecedor	Lote	Faixa de Conc. mg 100 g <sup>-1</sup>	Fe mg 100 g <sup>-1</sup>	CV %
				M ± DP	
Bolo de fubá*	A	1	1,26 - 1,33	1,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,23
		2	1,33 - 1,43	1,37 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,22
		3	1,30 - 1,40	1,34 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,90
	B	1	1,65 - 1,83	1,76 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,19
		2	1,63 - 1,73	1,67 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,19
		3	1,60 - 1,75	1,69 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,32
	C	1	2,82 - 2,94	2,89 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,53
		2	2,83 - 2,96	2,85 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,52
		3	2,86 - 3,03	2,93 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,01
Mix**	C	1	4,31 - 4,46	4,41 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,88
		2	4,22 - 4,39	4,32 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,97
		3	4,37 - 4,50	4,44 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,39
Farinha de trigo**	A	1	3,89 - 4,16	4,02 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,35
		2	4,31 - 4,45	4,37 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,63
		3	4,18 - 4,43	4,28 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,01
	B	1	4,43 - 4,80	4,62 ± 0,19 <sup>a</sup>	4,08
		2	4,11 - 4,25	4,16 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,79
		3	4,07 - 4,33	4,22 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,07
Fubá de milho**	A	1	4,16 - 4,35	4,27 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,26
		2	4,15 - 4,49	4,30 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,05
		3	4,12 - 4,27	4,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,89
	B	1	4,05 - 4,21	4,15 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,20
		2	4,23 - 4,39	4,31 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,90
		3	4,18 - 4,35	4,25 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,08

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre lotes, mesmo fornecedor (p>0,05).

\*Faixa de concentração: menor e maior concentração (n=15)

\*\*Faixa de concentração: menor e maior concentração (n=3)

\*M ± DP: média das amostras (n=15) ± estimativa do desvio padrão. \*CV: % coeficiente de variação.

\*\*M ± DP: média das amostras (n=3) ± estimativa do desvio padrão. \*\*CV: % coeficiente de variação.

A tabela 3 apresenta o teor médio de ácido fólico e ferro, bem como as faixas de concentrações. Entre os três fornecedores analisados no bolo de fubá, dois fornecedores de farinha de trigo e dois fornecedores de fubá de milho. Cabe ressaltar que o mix não aparece nesta tabela, pois foi utilizado por um único fornecedor. Também está demonstrada a análise estatística dos resultados.

**TABELA 3.** Teor médio de ácido fólico (AF) e ferro (Fe) entre fornecedores em bolo, farinha de trigo e fubá de milho.

<i>Amostra</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}</math></i>	<i>Fe <math>\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}</math></i>
		<i>M</i>	<i>M</i>
Bolo de fubá*	A	43,47 <sup>b</sup>	1,33 <sup>c</sup>
	B	51,42 <sup>b</sup>	1,71 <sup>b</sup>
	C	89,69 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>
Farinha de trigo**	A	147,91 <sup>a</sup>	4,22 <sup>a</sup>
	B	144,28 <sup>a</sup>	4,33 <sup>a</sup>
Fubá de Milho**	A	207,99 <sup>a</sup>	4,26 <sup>a</sup>
	B	188,99 <sup>a</sup>	4,24 <sup>a</sup>

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre fornecedores ( $p > 0,05$ ).

\*M: média das amostras ( $n=45$ )  $\pm$  estimativa do desvio padrão.

\*\*M: média das amostras ( $n=9$ )  $\pm$  estimativa do desvio padrão.

Para as amostras de bolo de fubá analisadas verificou-se que a concentração de ácido fólico variou, em média, de 41,68 a 96,96  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Para esse tipo de alimento, não existe legislação específica quanto ao teor de ácido fólico desejado no produto final.

Para a farinha de trigo o teor de ácido fólico variou de 130,64 a 159,66  $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ , para o fubá de milho variou de 174,34 a 217,32  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e para o mix variou de 156,93 a 181,29  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Constatou-se que a concentração da vitamina, para a farinha de trigo, oscilou entre valores abaixo e acima de 150  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Já para o fubá de milho e mix houve variação apenas acima do esperado. Os resultados obtidos demonstram não haver uma uniformidade nos teores de ácido fólico para as farinhas. Estes dados podem contribuir negativamente sobre a confiabilidade do programa de fortificação. As variações podem ser explicadas por

problemas por parte dos moinhos durante a adição ou homogeneização da vitamina na matéria-prima.

Boen et al. (2008) encontraram valores em média de 73 a 233  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  para farinha de trigo e 96 a 558  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  para fubá, confirmando que os teores de ácido fólico variaram muito para as amostras.

Nas análises de ferro constatou-se que o teor do mineral para os bolos de fubá variou, em média, 1,29 a 2,93  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Isto pode ser explicado considerando que, no bolo, estas farinhas são adicionadas (diluídas) em uma massa onde estão colocados os outros ingredientes para a obtenção do produto final.

Para a farinha de trigo, fubá de milho e mix o teor médio do ferro oscilou entre 4,02 a 4,62  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , 4,15 a 4,31  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , 4,32 a 4,44  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. As análises do mineral nas farinhas fortificadas, em geral, demonstraram estar bem próximo ao esperado (4,2  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

Boen et al. (2008) obtiveram teores de ferro para a farinha de trigo em média de 4,6 a 7,4  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  e para o fubá de 4,0 a 8,9  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , indicando valores acima do esperado (4,2  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Segundo Kira et al. (2006) das 85 amostras analisadas de farinha de trigo apenas 34,1 % encontravam-se dentro do intervalo de tolerância de 3,4 e 5,0  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  de ferro, sendo que 51,8 % das amostras apresentaram resultados superiores e 14,1 % abaixo do limite mínimo estabelecido.

O consumo bolos prontos é de 0,697  $\text{kg/pessoa/ano}$ , de acordo com dados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2002-2003, IBGE, 2007), o que equivale

a 1,9 g/pessoa/dia. Dessa forma, a ingestão de bolos de fubá confeccionados com farinhas fortificadas, fornece menos de 1 % das recomendações nutricionais de ácido fólico, que é de 240 µg/dia para adultos e de ferro que é de 14 mg/dia o recomendado para adultos (ANVISA, 2005). Por outro lado se considerarmos que a ingestão de uma pessoa seja em média 100 g de por um pedaço de bolo e o teor médio de ácido fólico encontrado no bolo de 55 µg 100 g<sup>-1</sup> forneceria em média 22 % das recomendações para adultos e para o ferro considerando o teor médio de 2,0 mg 100 g<sup>-1</sup> forneceria em média 15 % das recomendações para adultos.

Expressando a precisão em termos de coeficientes de variação (CV), a FDA e a ANVISA recomendam que os resultados não excedam 15 % de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20 % do CV). A variação dos CV foi de 3,33 a 8,99 % para o ácido fólico e 1,39 a 4,19 % para o ferro, estando assim, dentro do recomendado.

Pelas análises estatísticas, ANOVA e teste de Tukey, os resultados não indicaram haver diferença significativa nos valores obtidos para as concentrações de ácido fólico e ferro entre os lotes das amostras de bolos de fubá, mix, farinha de trigo e fubá de milho com 95% de confiança. Para o ácido fólico o bolo de fubá se destacou com diferença significativa somente para o fornecedor C, obtendo a maior concentração de ácido fólico. Já para o ferro os três fornecedores de bolo de fubá analisados diferiram entre si.

#### 4. Conclusões

Para as amostras de bolo analisadas o teor de ácido fólico encontrado variou, em média, de 41,68 a 96,96  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e para o ferro variou, em média, 1,29 a 2,93  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Cabe ressaltar que para esse tipo de alimento, não existe legislação específica quanto ao teor de ácido fólico e ferro desejado no produto final.

Para a farinha de trigo, houve grande oscilação no teor da vitamina. Curiosamente para o fubá de milho e mix houve variação apenas acima do esperado dos 150  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ . As análises do mineral nas farinhas fortificadas, em geral, demonstraram estar bem próximo ao esperado de 4,2  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ .

Esses dados são de grande importância para a avaliação dos impactos da campanha de enriquecimento dessas matrizes.

Este estudo confirma claramente o que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem relatando, sobre o problema da quantidade de micronutrientes em lotes analisados de farinhas de trigo, fubá e flocos de milho (principais matéria-prima de pães e bolos) de várias indústrias no Brasil, afirmando que alguns lotes estão com uma quantidade além da necessária e outros apenas com traços ou ausência destes micronutrientes.

Sendo assim, é de grande importância que seja traçada uma estratégia para o acompanhamento durante a adição e homogeneização de micronutrientes por parte de órgãos fiscalizadores para que o programa de fortificação atinja seus propósitos.

## **5. Agradecimentos**

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos, Laboratório de Análise de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto e a CAPES e CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

## 6. Referências Bibliográficas

- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (Royal Society of Chemistry). **Analyst**, 112, 199-204, 1987.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico**. Diário oficial da união, Brasília, 18 de dezembro de 2002. Disponível em <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> acesso em 09/2009.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Diário oficial da união, Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> acesso em 09/2009.
- BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA-FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. A. Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 19(1): 53-59, 2008.
- BOYLES, A.B.; BILLUPS, A.V.; DEAK, K.L.; SIEGEL, D.G.; MEHLTRETTER, L.; SLIFER, S.H.; et al. Neural Tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. **Environ Health Perspect**, 114(10):1547-52, 2006.
- COOK, J.D.; BAYNES, R.D.; SKIKNE, B.S. Iron deficiency and the measurement of iron status. **Nutrition Research Reviews**, 5: 189-202, 1992.
- CZEIZEL, 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.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; JOHNSON, I.T.; WHARF, S.G.; LUND, E.K. Iron-getting the balance right. **Nutrition and Food Science**, 6: 212-4, 1997.
- FOKKEMA, M.R., MEIJER, W.M., DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W. Benefits and concerns regarding folic acid fortification. **Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde**, 30(3): 218-223, 2005.
- GERMANI, R.; ASCHERI, J.L.R.; SILVA, F.T.; TORREZAN, R.; SILVA, K.L.; NETTO, A.G.; NUTTI, M.R. Embrapa. Agroindústria de alimentos. **Manual de fortificação de farinhas de trigo**. 2001. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ; 56p. Disponível em <<http://www.ctaa.embrapa.br/produtos/pdf/doc46-2001.pdf>> acesso em 11/2009.
- HÅKANSSON, B.; JÄGERSTAD, M.; ÖSTE, R.; ÅKESSON, B.; JONSSON, L. The effects of various thermal processes on protein quality, vitamins and selenium content in whole-grain wheat and white flour. **Journal of Cereal Science**, 6: 269-282, 1987.
- INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington, USA: National academic Press, 1998.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2002-2003. **População. Indicadores sociais**. [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Consulta em 01/2010.

- KIRA, C.S. et al. Avaliação dos teores de ferro em farinhas de trigo fortificadas, São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 65(3): 181-185, 2006.
- MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; CAMACHO, M.M.; MARTÍNEZ- LAHUERTA, J.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. Iron deficiency and iron fortified foods – a review. **Food Research International**, 35: 225-31, 2002.
- MUSKIET, F.A.J. The importance of early folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 20(3): 403-410, 2005.
- PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C; GUERRA SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação de estudo nutricional de ferro. **Revista Saúde Pública**, 34: 421-426, 2000.
- QUINLIVAN, E.P.; GREGORY, J.F. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. **American Journal of Clinical Nutrition**, 77: 221-225, 2003.
- WHO. World Health Organization. **Micronutrient deficiencies: Battling iron deficiency anemia**. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/nut/ida.htm>  
Acesso em: 09 Set. 2009.

## Artigo 4

# DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO E FERRO EM LEITE E SUCO DE SOJA

Elede Martins Elias e Helena T. Godoy \*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

\* [helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)



**RESUMO**

Certos micronutrientes como vitaminas e minerais tem sido utilizados na adição de alimentos visando garantir a ingestão adequada. Nos últimos anos o ácido fólico, uma vitamina do complexo B, tem despertado um grande interesse devido a sua ligação na prevenção dos defeitos do tubo neural e possível prevenção de doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e problemas neuro-psiquiátricos. Dentre os minerais destaca-se o ferro, pois sua deficiência incluindo sua forma mais severa, a anemia, é considerada a doença mais prevalente em todo mundo. A fortificação contínua tem sido uma das principais estratégias empregadas para minimizar estes problemas, devido a sua abrangência, biodisponibilidade e baixo custo. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, segundo a Resolução RDC nº 344, tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, à partir de junho de 2004. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver no mínimo 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro. Atualmente, há uma grande variedade de produtos alimentícios já enriquecidos com ácido fólico e ferro. O objetivo desse trabalho foi determinar o teor de ácido fólico e ferro adicionados em leite e suco de soja e comparar com o declarado em seus respectivos rótulos. Foi utilizado um método em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrito no Artigo 2. O teor de ácido fólico encontrados no suco e leite de soja variou de 17,54 a 26,27 µg 100 mL<sup>-1</sup> e 18,08 a 23,63 µg 100 mL<sup>-1</sup> respectivamente, demonstrando que os valores encontrados estão em geral superiores, máximo de 44%, ao declarado pelas marcas em seus rótulos. Para o ferro a determinação quantitativa foi realizada por

espectrofotometria de absorção atômica com chama e metodologia segundo Boen et al., 2008. O teor do mineral oscilou entre 0,88 a 1,28 mg 100 mL<sup>-1</sup> para o suco e 0,38 a 1,91 mg 100 mL<sup>-1</sup> para o leite, observando-se assim, uma grande variação no teor de ferro encontrados estando em desacordo com o declarado nos rótulos. Os valores de CV não excederam a 8,90 % para o ácido fólico e 7,49 % para o ferro, estando assim, dentro do recomendado pela ANVISA (não exceder a 15 %).

Palavras-chave: Ácido fólico, ferro, suco e leite de soja, quantificação, CLAE.

**ABSTRACT**

Certain micronutrients such as vitamins and minerals have been used in the addition of food in order to ensure adequate intake. In recent years, folic acid, a B complex vitamin, has aroused great interest due to its link in the prevention of neural tube defects and possible prevention of cardiovascular disease, some cancers and neuro-psychiatric problems. Among the minerals the iron is distinguished, because its deficiency includes the most severe form of anemia, and is considered the illness most prevalent worldwide. A continuous fortification has been one of the main strategies used to minimize this problem, because of its comprehensiveness, bioavailability and low cost. In Brazil, the National Agency for Sanitary Vigilance according to Resolution RDC 344, the fortification is mandatory for wheat flour and corn flour with folic acid and iron, as of June 2004. For every 100 g of corn flour or wheat should be at least 150 µg of folic acid and 4.2 mg of iron. Currently, there is a wide variety of food already fortified with folic acid and iron. The objective of this study was to determine the levels of folic acid and iron added in milk soy and juice soy and compare them with the declared in their respective labels. Thus was used a method in high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in Article 2. The levels of folic acid found in the soy juice and soy milk ranged from 17.54 to 26.27 mg 100 mL<sup>-1</sup> and 18.08 to 23.63 mg 100 mL<sup>-1</sup> respectively, showing that the values in general above, maximum 44%, the declared by the marks on their labels. For the iron was quantitatively determined by atomic absorption spectrophotometry with flame and methodology according Boen et al., 2008. The levels of the mineral ranged from

0.88 to 1.28 mg 100 mL<sup>-1</sup> for soy juice and 0.38 to 1.91 mg 100 mL<sup>-1</sup> for soy milk observing thus a wide variation in levels of iron being found in disagreement of the declared labels. The CV values did not exceed 8.90 % for folic acid and 7.49 % for iron and are therefore within the recommended ANVISA (not to exceed 15%).

Keywords: Folic acid, iron, juice and soy milk, quantification, HPLC.

## 1. Introdução

Segundo o Codex Alimentarius, enriquecimento ou fortificação de alimentos é a “adição de um ou mais nutrientes essenciais a um alimento, com o propósito de prevenir ou corrigir a deficiência em um ou mais nutrientes em uma população” (CODEX, 1987).

Certos micronutrientes como vitaminas e minerais tem sido utilizados na adição de alimentos visando garantir a ingestão adequada por parte da população.

O ácido fólico, vitamina do complexo B denominada vitamina B<sub>9</sub>, é requisito para o crescimento normal, na fase reprodutiva (gestação e lactação) e na formação de anticorpos. Atua como coenzima no metabolismo de aminoácidos (glicina) e síntese de purinas e pirimidinas, síntese de ácido nucléico DNA e RNA e é vital para a divisão celular e síntese protéica (CZEIZEL, 1996).

O ácido fólico tem um papel fundamental no processo da multiplicação celular, sendo, portanto, imprescindível durante a gravidez. As gestantes são propensas a desenvolver deficiência de folato provavelmente devido ao aumento da demanda desse nutriente para o crescimento fetal e tecidos maternos (VÍTOLO, 2003).

Alguns estudos têm indicado que, para além da prevenção de defeitos do tubo neural, o ácido fólico pode interferir no metabolismo da homocisteína contribuindo para a prevenção da doença cardiovascular, efeito protetor em relação ao câncer e prevenção de problemas neuro-psiquiátricos, tais como demência e depressão (BAILEY, RAMPERSUAD e KAUWELL, 2003).

O ferro é um mineral de grande importância no estudo das carências nutricionais, pois a anemia e a deficiência de ferro afetam mais de 3,5 bilhões de indivíduos no mundo em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, para cada pessoa com anemia, exista, ao menos, mais uma com deficiência de ferro. Assim, em uma população com 50 % de crianças com anemia, 100 %, de fato, são deficientes em ferro (QUEIROZ e TORRES, 2000; SANTOS et al., 2002).

Crianças e gestantes representam um grupo com grande vulnerabilidade a esta carência, em virtude do aumento das necessidades de ferro, induzidas pela rápida expansão da massa celular vermelha e pelo crescimento acentuado dos tecidos (PAIVA, RONDÓ e GUERRA-SHINOHARA, 2000).

No Brasil, não existe um estudo nacional sobre a prevalência de anemia ferropriva (QUEIROZ e TORRES, 2000). Estudos populacionais, comparando a prevalência de anemia em áreas urbanas com a de áreas rurais, indicam que essas últimas detêm percentuais bem mais elevados, demonstrando que a anemia ferropriva está presente em aproximadamente, 50 % das crianças das áreas rurais do Brasil (MONTEIRO, SZARFARC e MONDINI 2000; OSÓRIO, 2002).

Desta forma, a fortificação de alimentos, ou seja, a adição de vitaminas e minerais a alimentos de grande uso, visando garantir a ingestão diária recomendada, é um procedimento eficaz na prevenção da deficiência de vários micronutrientes, como as do ferro e ácido fólico (BROGNOLI, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, segundo a Resolução RDC nº 344 de dezembro de 2002, tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, à partir de junho de 2004. Para cada 100g de

---

farinha de milho ou trigo deve haver no mínimo 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2002)

A escolha do produto alimentício para fortificação depende dos hábitos alimentares da população, dos aspectos logísticos do processo de fortificação e a relação química entre o micronutriente e o produto a ser fortificado (SANTOS e PEREIRA, 2007).

O enriquecimento de alimentos é uma forma barata, prática e efetiva utilizada pela indústria de alimentos, seja para atender as recomendações regulamentadas, seja como estratégia de marketing para impulsionar a venda dos produtos (LUCOCK, 2000).

O mercado mundial de bebidas tem desenvolvido águas, sucos, iogurtes, isotônicos, refrigerantes, energéticos e fortificados com ácido fólico, a fim de evitar a carência desta vitamina e as possíveis doenças a ela relacionadas (PRIETO et al., 2006). De acordo com dados dos fabricantes, com base na ACNielsen, companhia que oferece informações de mercado para diversos produtos, o mercado de suco à base de soja é o setor que mais cresce desde 2002. Em 2004 teve um aumento em valor de 30 % e em 2005 mais de 66 %.

O leite e suco de soja podem ser considerados um alimento adequado para a fortificação pelo crescente seguimento do mercado industrial e por ser consumido por grande parte da população, principalmente por ser muito bem adaptado a população.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi determinar os teores de ácido fólico e ferro adicionados em leite e suco de soja e comparar com o declarado em seus respectivos rótulos.

## **2. Parte Experimental**

### **2.1. Produtos analisados**

As amostras de suco e leite de soja foram adquiridas na cidade de Campinas. O suco de soja foi obtido de apenas uma marca (disponível comercialmente), três diferentes lotes (3 amostras de cada lote). O leite de soja foi obtido de duas marcas (disponíveis comercialmente), três diferentes lotes (3 amostras de cada lote).

### **2.2. Determinação do ácido fólico**

#### **2.2.1. Reagentes**

O padrão de ácido fólico (lote: F-7876, com 98 % de pureza aproximadamente) foi adquirido da SIGMA (USA). A acetonitrila, grau cromatográfico, fosfato de potássio monobásico, o ácido acético e tricloroacético, grau analítico, foram adquiridos da Merck (Brasil). A água utilizada no preparo do tampão, das amostras e da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). A fase móvel, os solventes orgânicos, as soluções padrões e as amostras foram filtradas em filtros de membrana da Millipore (HAWP e HAWP04700), com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

#### **2.2.2. Equipamento**

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100 (Agilent), com injetor automático e capacidade de 1 até 100  $\mu\text{L}$ , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos 128

---

(DAD) UV-visível e de fluorescência, dispostos em série e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica. O software HP-Chemstation foi utilizado para administração do sistema de aquisição e tratamento de dados. A coluna utilizada para o processo cromatográfico foi uma Hypersil, ODS-2, 3  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 4.6 mm d.i.

### 2.2.3. Método

A análise foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a extração inicialmente a amostra foi homogeneizada e retirado 1,0 mL. Foram adicionados 3,0 mL de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Logo após foi adicionado 1,5 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 2.6 com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Finalmente foi adicionado mais 0,5 mL de ácido tricloroacético de forma cuidadosa (sem agitação brusca) e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida todas as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 125000 x g, após isto foram filtradas em papel de filtro Watmamm (0,45  $\mu\text{m}$ ).

Todas as amostras, as soluções padrões e a fase móvel foram filtradas em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore HAWP e HAWP04700). Os extratos purificados foram injetados, volume de 100  $\mu\text{L}$ , e imediatamente analisados utilizando CLAE.

A fase móvel utilizada para a separação do ácido fólico foi uma solução de ácido acético glacial 2,0 %, com pH ajustado para 2,7 com KOH, a uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

O ácido fólico (AF) foi separado em sistema de eluição por gradiente, iniciando com 90 % de solução aquosa de ácido acético e 10 % de acetonitrila (v/v), chegando em 5 minutos a 80 % de solução ácido acético e 20 % de acetonitrila (v/v), e então a concentração de acetonitrila foi mantida nessas condições até o final da corrida, em 10 minutos. Após isto um período de limpeza foi feito com 100 % de acetonitrila até 15 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 5 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD). O ácido fólico foi detectado na região do ultravioleta com 290 nm.

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. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação foi feita por padronização externa e a curva de calibração foi construída para a forma da vitamina encontrada no alimento analisado, sendo cada ponto representado pela média de três determinações com mínimo de 5 pontos. A validação do método está descrita no Artigo 2.

## **2.3. Determinação do ferro**

### **2.3.1. Reagentes**

Os reagentes de grau analítico como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio bem como o ácido clorídrico comerciais (preparação do banho de limpeza para

frascos utilizados para determinação de ferro) foram adquiridos da Merck ou Synth (Brasil).

### **2.3.2. Equipamento**

Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo Analyst 3110, com uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco foi utilizado para determinação de ferro (248,3 nm), fabricado pela Perkin Elmer.

### **2.3.3. Limpeza das vidrarias**

Todas as vidrarias foram lavadas em banho de detergente e enxaguadas com água até total eliminação de espumas. Foram colocadas todas as vidrarias em banho de ácido (clorídrico comercial) 10 % (v/v), mantidas no banho por, pelo menos, 12 horas e após isto foram enxaguadas com água deionizada. As vidrarias foram secas ao ar livre.

### **2.3.4. Mineralização das amostras**

Pesou-se em papéis vegetais, cerca de 0,6000 g de cada uma das matrizes avaliadas. As amostras foram transferidas para tubos de digestão. Adicionou-se aos tubos 2 mL de ácido nítrico concentrado. Preparou-se, também, dois tubos “brancos” (sem as amostras).

Após isto, colocou-se pequenos funis na entrada de cada tubo de digestão e levados para o bloco digestor e iniciou-se o aquecimento. A temperatura foi ajustada para 100 °C. Os funis permitiram que o ácido nítrico ficasse em refluxo e o aquecimento foi mantido por 2 horas. Os tubos foram retirados do aquecimento e resfriados em água corrente. Após o resfriamento foi adicionado, 1 mL de peróxido de hidrogênio em cada tubo (inclusive nos brancos) e levados novamente para o bloco digestor e, desta vez, a temperatura foi ajustada para 110 °C, por 30 minutos. A temperatura foi aumentada para 130 °C e deixada por mais 1 hora. Então os tubos foram retirados do bloco digestor e deixados em repouso até total resfriamento.

Adicionou-se uma pequena quantidade de água deionizada (5 mL) aos tubos de digestão e estes foram colocados em um banho de ultra-som por alguns segundos. O conteúdo dos tubos foi transferido para balões volumétricos de 25 mL e completado o volume.

As determinações de ferro foram feitas, em triplicata, utilizando-se a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Analytical Methods Committee, 1987).

### **2.3.5. Determinação quantitativa do ferro**

A determinação quantitativa de ferro foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com chama em aparelho marca Perkin Elmer, modelo 3110. O líquido foi aspirado com a ajuda de um nebulizador pneumático e misturada ar (oxidante) e acetileno (combustível), 10 e 3 L<sup>-1</sup> de fluxo médio, respectivamente.

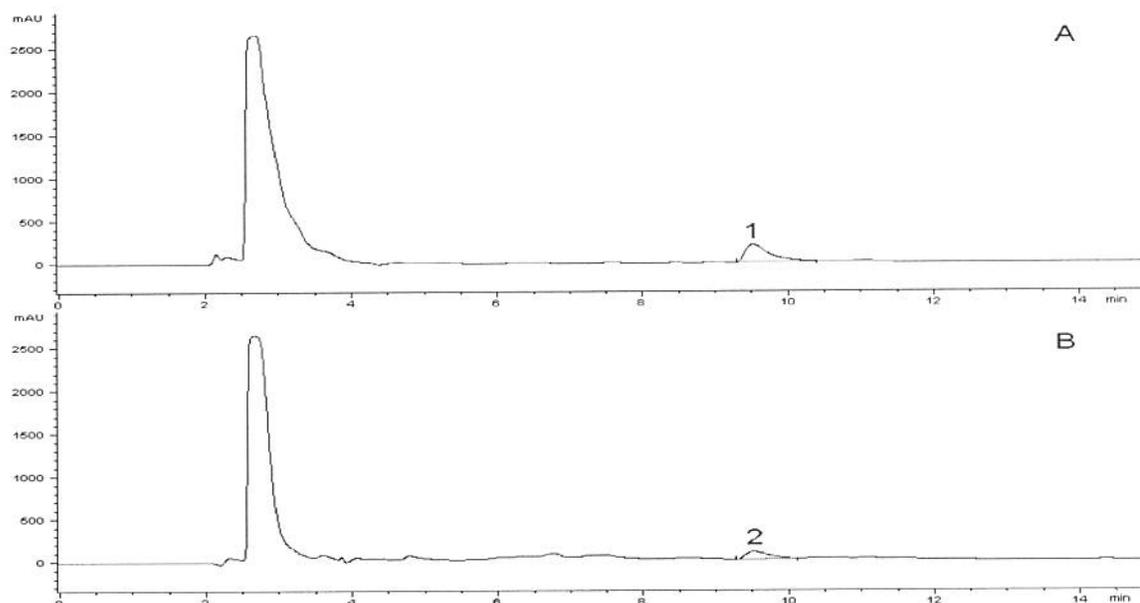
Uma lâmpada de deutério foi utilizada para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco para determinação de ferro (248,3 nm) de acordo com a metodologia proposta e validada de acordo com Boen et al, 2008. Os resultados das análises realizadas em triplicata foram expressos em mg 100 g<sup>-1</sup>.

#### **2.4. Análise Estatística Dos Resultados**

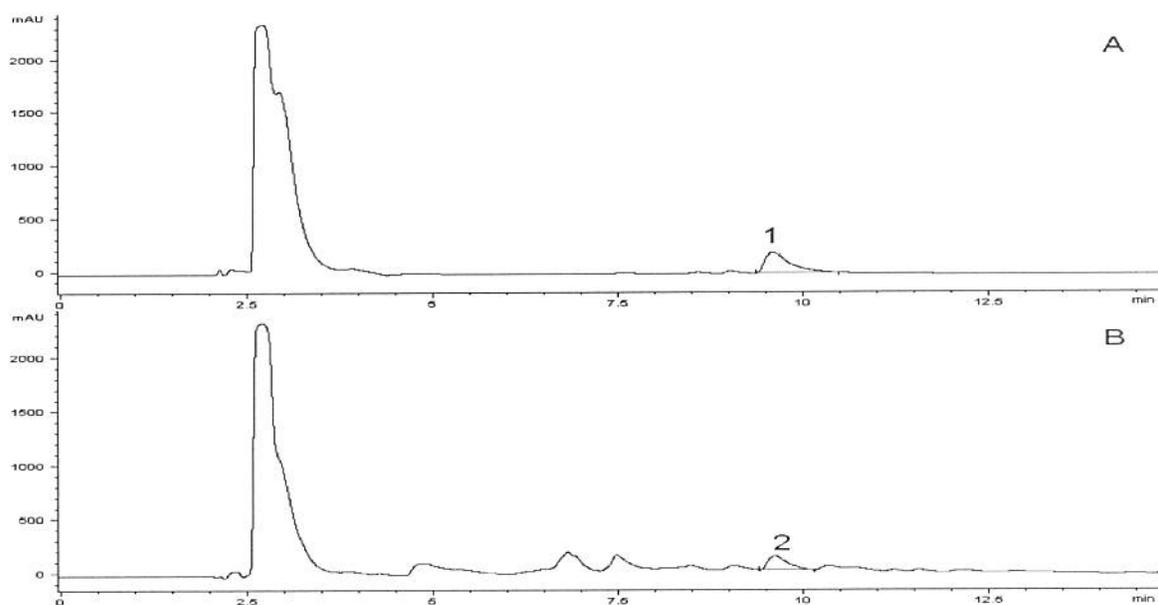
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança, utilizando-se o software *Statistica*, versão 7.0.

### **3. Resultados e Discussão**

Nas Figuras 1 e 2 podem ser visualizados os perfis cromatográficos do padrão de ácido fólico (A1) de amostra de suco e leite de soja (B2). O pico do ácido fólico aparece isolado, os tempos de retenção encontrados foram 9,52 min para o suco de soja e 9,58 min para o leite de soja em DAD a 290 nm.



**Figura 1:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e suco de soja (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (9,52 min) e 2 (9,52 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 2:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e leite de soja (B). Os picos identificados são do ácido fólico: 1 (9,58 min) e 2 (9,58 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.

Para a avaliação do teor de ácido fólico e ferro nos sucos foram analisadas amostras de uma marca e os leites analisados de duas diferentes marcas, as que possuíam a vitamina na formulação. Os valores de ácido fólico para leite e suco de soja estão apresentados na Tabela 1 e para os valores de ferro na Tabela 2. Nas tabelas 1 e 2 também estão demonstradas as análises estatísticas para cada lote das amostras analisadas. A seguir, a Tabela 3 apresenta teor médio de ácido fólico e ferro para suco e leite de soja, e a análise estatística das amostras entre os sucos e entre os leites (original e light).

**TABELA 1.** Teor de ácido fólico (AF) em suco e leite de soja.

<i>Amostra</i>	<i>Marca</i>	<i>Lote</i>	<i>Faixa de Conc. AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}</math></i>	<i>AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}</math> M <math>\pm</math> DP</i>	<i>CV%</i>
<b>Sucos</b>					
<b>Pêssego</b>	A	1	17,17 - 20,11	18,47 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>	8,11
		2	17,66 - 20,11	18,96 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup>	6,51
		3	18,15 - 20,60	19,13 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	6,78
<b>Goiaba</b>	A	1	17,17 - 19,80	18,49 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	7,12
		2	18,64 - 21,58	19,87 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	7,69
		3	17,30 - 20,00	19,03 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>	7,90
<b>Uva</b>	A	1	20,60 - 23,80	21,99 $\pm$ 1,64 <sup>a</sup>	7,45
		2	24,52 - 28,00	26,27 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	6,62
		3	22,07 - 25,80	24,19 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>	7,92
<b>Maçã</b>	A	1	16,40 - 19,40	18,03 $\pm$ 1,52 <sup>a</sup>	8,42
		2	17,20 - 18,64	17,85 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	4,09
		3	18,20 - 20,10	18,97 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	5,28
<b>Laranja</b>	A	1	18,90 - 21,40	19,97 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup>	8,11
		2	21,70 - 23,80	22,47 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>	5,16
		3	19,90 - 21,80	20,63 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	4,95
<b>Maracujá</b>	A	1	19,62 - 23,05	21,29 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	8,07
		2	18,30 - 20,11	19,37 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	4,90
		3	20,11 - 24,03	22,21 $\pm$ 1,98 <sup>a</sup>	8,90
<b>Abacaxi</b>	A	1	17,90 - 21,34	19,63 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	8,76
		2	18,60 - 21,08	19,78 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	6,29
		3	19,44 - 22,90	21,29 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	8,18
<b>Pêra</b>	A	1	16,68 - 19,50	18,03 $\pm$ 1,42 <sup>a</sup>	7,86
		2	16,70 - 19,40	18,33 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	7,84
		3	16,68 - 18,30	17,54 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	4,66
<b>Morango</b>	A	1	23,30 - 25,80	24,50 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	5,11
		2	22,60 - 24,81	23,64 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	4,71
		3	19,90 - 22,70	20,97 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	7,22
<b>Leites</b>					
<b>Original</b>	A	1	18,10 - 20,30	19,13 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	5,78
		2	17,20 - 20,00	18,27 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	8,29
		3	20,20 - 22,00	21,07 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	4,28
<b>Original</b>	B	1	22,30 - 24,70	23,63 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	5,17
		2	20,30 - 23,80	21,93 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	8,03
		3	19,80 - 22,20	20,83 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup>	5,92
<b>Light</b>	A	1	16,90 - 19,40	18,08 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	6,94
		2	17,80 - 19,30	18,50 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	4,08
		3	18,10 - 20,40	19,17 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>	6,05
<b>Light</b>	B	1	19,40 - 22,50	20,67 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>	7,87
		2	17,95 - 20,00	19,17 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	5,66
		3	21,90 - 23,60	22,53 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	4,12

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre lotes ( $p > 0,05$ ).

\*Faixa de concentração: menor e maior concentração ( $n=9$ )

\*\*M  $\pm$  DP: média das amostras ( $n=9$ )  $\pm$  estimativa do desvio padrão. CV: % coeficiente de variação.

TABELA 2. Teor de ferro (Fe) em suco e leite de soja.

<i>Amostra</i> <i>Suco e leite de soja</i>	<i>Marca</i>	<i>Lote</i>	<i>Faixa de Conc.</i> <i>Fe mg 100 mL<sup>-1</sup></i>	<i>Fe mg 100 mL<sup>-1</sup></i> <i>M ± DP</i>	<i>CV%</i>
<b>Sucos</b>					
Pêssego	A	1	0,85 - 0,90	0,88 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,07
		2	0,96 - 1,11	1,04 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,41
		3	1,10 - 1,17	1,11 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,76
Goiaba	A	1	0,96 - 1,01	0,99 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,67
		2	0,98 - 1,07	1,03 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,39
		3	1,10 - 1,13	1,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,52
Uva	A	1	0,98 - 1,01	1,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,41
		2	0,88 - 0,91	0,90 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,74
		3	0,97 - 1,00	0,99 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,72
Maçã	A	1	1,20 - 1,23	1,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,23
		2	1,05 - 1,08	1,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,45
		3	1,15 - 1,18	1,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,31
Laranja	A	1	1,41 - 1,42	1,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,68
		2	1,09 - 1,10	1,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,48
		3	1,01 - 1,02	1,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,57
Maracujá	A	1	1,14 - 1,19	1,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,44
		2	1,25 - 1,31	1,28 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,30
		3	1,14 - 1,20	1,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,93
Abacaxi	A	1	1,08 - 1,16	1,12 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,31
		2	1,05 - 1,11	1,09 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,20
		3	1,02 - 1,03	1,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,56
Pêra	A	1	0,93 - 0,98	0,95 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,55
		2	1,07 - 1,17	1,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,13
		3	1,09 - 1,10	1,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,59
Morango	A	1	0,94 - 1,01	0,97 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,47
		2	1,09 - 1,18	1,14 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,95
		3	1,19 - 1,28	1,24 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,63
<b>Leites</b>					
Original	A	1	0,38 - 0,38	0,38 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,38
		2	0,47 - 0,54	0,51 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,49
		3	0,42 - 0,46	0,44 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,55
Original	B	1	1,44 - 1,68	1,56 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,58
		2	1,42 - 1,76	1,59 ± 0,17 <sup>a</sup>	10,43
		3	1,69 - 1,79	1,74 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,90
Light	A	1	0,56 - 0,59	0,57 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,34
		2	0,47 - 0,52	0,50 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,48
		3	0,48 - 0,49	0,49 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,79
Light	B	1	1,84 - 1,99	1,91 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,01
		2	1,75 - 1,90	1,83 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,29
		3	1,86 - 1,87	1,86 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,17

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre lotes ( $p > 0,05$ ).

\*Faixa de concentração: menor e maior concentração ( $n=9$ )

\*\*M ± DP: média das amostras ( $n=9$ ) ± estimativa do desvio padrão. CV: % coeficiente de variação.

**TABELA 3.** Teor médio de ácido fólico (AF) e ferro (Fe) em suco e leite de soja.

<i>Amostra</i>	<i>Marca</i>	<i>AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}</math></i> <i>M*</i>	<i>Fe <math>\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}</math></i> <i>M*</i>
<b>Sucos</b>			
Pêra	A	17,97 <sup>d</sup>	1,01 <sup>a</sup>
Maçã	A	18,28 <sup>d</sup>	1,05 <sup>a</sup>
Pêssego	A	18,86 <sup>cd</sup>	0,96 <sup>a</sup>
Goiaba	A	19,13 <sup>cd</sup>	1,15 <sup>a</sup>
Laranja	A	21,02 <sup>bc</sup>	1,17 <sup>a</sup>
Maracujá	A	20,96 <sup>bc</sup>	1,21 <sup>a</sup>
Morango	A	23,03 <sup>ab</sup>	1,08 <sup>a</sup>
Abacaxi	A	20,23 <sup>cd</sup>	1,05 <sup>a</sup>
Uva	A	24,16 <sup>a</sup>	1,12 <sup>a</sup>
<b>Leites</b>			
Original	A	19,49 <sup>bc</sup>	0,44 <sup>b</sup>
Original	B	22,13 <sup>a</sup>	1,63 <sup>a</sup>
Light	A	18,58 <sup>c</sup>	0,52 <sup>b</sup>
Light	B	20,79 <sup>ab</sup>	1,87 <sup>a</sup>

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre sucos ( $p > 0,05$ ).

\*M: média das amostras ( $n=9$ )  $\pm$  estimativa do desvio padrão.

As marcas analisadas declaram em seu rótulo, para o suco e leite de soja prontos para beber, a concentração de  $36 \mu\text{g } 200 \text{ mL}^{-1}$  (ou  $18 \mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) para ácido fólico. De todas as amostras analisadas, de acordo com a Tabela 1, apenas 1 lote de 2 tipos de suco, maçã e pêra, encontravam-se um pouco abaixo do valor esperado (em torno de 5 %) de acordo com o declarado pelo fabricante no rótulo, as demais encontravam-se próximo ao valor e apenas duas, uva e morango, estavam acima do valor declarado (máximo de 44 %). Já para o leite, tanto original quanto o light, foi possível observar que a marca A estava dentro do valor

esperado, mas a marca B manteve-se acima do declarado no rótulo (máximo de 25 a 30 %) para os leites light e o original respectivamente.

Para as amostras de suco a concentração de ácido fólico variou de 17,54 a 26,27  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  e nas amostras de leite variou de 18,08 a 23,63  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  evidenciando a preocupação da indústria em adicionar a vitamina em quantidades maiores ao declarado a fim de garantir o teor declarado até o final de vida de prateleira do produto.

Prieto et al. (2006), avaliaram o teor de ácido fólico em 11 diferentes marcas de bebidas enriquecidas, dentre leites, sucos, iogurtes e isotônicos. Neste estudo, os autores compararam o teor de ácido fólico encontrado com o declarado no rótulo dos produtos. Em 6 marcas de leite analisadas, apenas uma apresentou valor discordante com o rótulo que declarava 0,32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto os autores encontraram 0,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em sucos, das 3 marcas analisadas, apenas uma apresentou concentração ligeiramente superior ao declarado, que foi 0,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contra 0,66  $\mu\text{g mL}^{-1}$  informado na embalagem.

Lima, Catharino e Godoy (2004), também avaliaram o teor de ácido fólico em bebida láctea achocolatada sendo que em duas marcas foram encontrados valores inferiores ao declarado: 49,2  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  e 48,5  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ , sendo que o rótulo de ambas o fabricante declarava haver 300  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ .

Os sucos e leites de soja já vêm prontos para beber, em embalagens de 200 ml, das amostras analisadas somente duas estavam um pouco abaixo da concentração de ácido fólico declarada no rótulo. Considerando que o produto contenha exatamente 18  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  esta quantidade corresponde a 30 % das necessidades diárias de crianças, 15 % de adultos, 10 % de gestantes. Entretanto

os resultados obtidos para amostras com valores superiores aos declarados no rótulo (média de 21  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), indicam que esta quantidade corresponde em média a 35 % das necessidades diárias de crianças, 17,5 % de adultos e 11,5 % de gestantes.

O rótulo dos sucos e leites de soja prontos para beber das marcas analisadas, declaram a concentração de 2,10 mg 200  $\text{mL}^{-1}$  (ou 1,05 mg 100  $\text{mL}^{-1}$ ) para o ferro. Nas análises de ferro constatou-se que o teor do mineral variou de 0,88 a 1,28 mg 100  $\text{mL}^{-1}$  para os sucos, de 0,38 a 0,57 mg 100  $\text{mL}^{-1}$  para leites da marca A e de 1,56 a 1,91 mg 100  $\text{mL}^{-1}$  para leites da marca B. Observou-se grande variação no teor de ferro entre leites da marca A para a marca B, as amostras da marca A apresentaram valores muito inferiores (36 a 54%) ao declarado em seu rótulo ao contrário da marca B que demonstrou estar com valores acima do esperado (48 a 81%). Já para as amostras de suco, em geral, demonstraram estar com teores de ferro muito próximos em relação ao declarado no rótulo. Considerando que o produto contenha exatamente 1,05 mg 100  $\text{mL}^{-1}$  esta quantidade corresponde a 36 % das necessidades diárias de crianças, 15 % de adultos e 8 % de gestantes. Entretanto os resultados obtidos para o leite da marca A (média de 0,45 mg 100  $\text{mL}^{-1}$ ), indicam que esta quantidade corresponde apenas a 15 % das necessidades diárias de crianças, 6,5 % de adultos e 3,5 % de gestantes. E para os leites da marca B (média de 1,75 mg 100  $\text{mL}^{-1}$ ) corresponde a 60 % das necessidades diárias de crianças, 25 % de adultos e 13 % de gestantes.

Conclui-se, portanto que os dois fornecedores para as amostras leite estão em desacordo com o declarado em seus rótulos demonstrando haver uma falha

---

na quantidade de adição do mineral ou em sua homogeneização (quando inferior ao esperado).

Por meio das análises estatísticas, ANOVA e teste de Tukey, observou-se que não houve diferença significativa entre os lotes das amostras analisadas tanto para o ácido fólico quanto para o ferro (Tabelas 1 e 2). Considerando-se os sucos de uma mesma marca pode-se observar que houve diferença significativa somente para o ácido fólico (Tabela 3). Para os diferentes tipos de leite, original e light, houve diferença significativa entre as marcas A e B (Tabela 3).

#### **4. Conclusões**

Os resultados encontrados para as amostras de suco demonstraram que a concentração de ácido fólico variou de 17,54 a 26,27  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  e nas amostras de leite variou de 18,08 a 23,63  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ .

Neste estudo as amostras analisadas para o ácido fólico oscilaram entre valores próximos e superiores (máximo de 44%) ao declarado pelas marcas em seus rótulos.

Nas análises de ferro constatou-se que o teor variou de 0,88 a 1,28  $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  para os sucos, de 0,38 a 0,57  $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  para leites da marca A e de 1,56 a 1,91  $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  para leites da marca B. As amostras da marca A apresentaram valores muito inferiores (36 a 54%) ao declarado em seu rótulo para o mineral ao contrário da marca B que demonstrou estar com valores acima do esperado (48 a 81%). Já as amostras de suco, em geral, demonstraram estar com teor de ferro muito próximo em relação ao declarado no rótulo.

O leite e suco de soja podem ser considerados alimento alternativo para a fortificação de ácido fólico e ferro pelo crescente seguimento do mercado industrial e por ser consumido por grande parte da população. Entretanto o teor de ácido fólico e ferro adicionados no leite e suco de soja se estivessem de acordo com o declarado pelos fabricantes das marcas, representariam apenas 30% das necessidades diárias das crianças e 15% dos adultos.

Os dados encontrados neste trabalho mostram à importância de se avaliar uma melhor padronização nas quantidades adicionadas da vitamina e do mineral garantindo que o produto final contenha quantidades próximas às declaradas pelo fabricante no rótulo dos alimentos consumidos.

## **5. Agradecimentos**

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos, Laboratório de Análise de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto e a CAPES e CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

## 7. Referências Bibliográficas

- ACNIELSEN Disponível em: <http://br.nielsen.com/news/pr20060530.shtml> Acesso em 23/11/09.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (Royal Society of Chemistry). **Analyst**, 112, 199-204, 1987.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico**. Diário oficial da união, Brasília, 18 de dezembro de 2002. Disponível em <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) > acesso em 09/2009.
- BAILEY, L.B.; RAMPERSUAD, G.C.; KAUWELL, G.P. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. **Journal of Nutrition**, 133: 1961S-8S, 2003.
- BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA-FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. A. Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 19(1): 53-59, 2008.
- BROGNOLI, A.F. et al. Gestação: Anemia ferropriva, deficiência de folato versus fortificação alimentar. **Cadernos da escola da saúde e nutrição**, 1: 1-7, 2008.
- CODEX ALIMENTARIUS. **General principles for the addition of essential nutrient to foods**. CAG/GL 09-1987. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/299/CXG\\_009e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/299/CXG_009e.pdf). Acesso em 16/10/2009.
- CZEIZEL, A.E. Ácido fólico. In: Vitaminas na gravidez e na primeira infância. **Anais Nestlé**; 53: 22-9, 1996.
- LIMA, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. HPLC Methodology For Folic Acid Determination In Enriched Wheat Flour And Bread. **Tecnica Molitoria International**, 55(3A): 151-158, 2004.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Molecular Genetics and Metabolism**, 71: 121-138, 2000.
- MONTEIRO, C.A.; SZARFARC, S.C.; MONDINI, I. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista Saúde Pública**, 34(6): 62-72, 2000.
- OMS-Organização Mundial da Saúde. **Global Database on child growth and nutrition**. Genebra, 1997.
- OSÓRIO, M.M. Fatores determinantes da anemia em crianças. **Jornal de Pediatria**, 78: 269-78, 2002.
- PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista Saúde Pública**, 34: 421-426, 2000.
- PRIETO, S. P.; GRANDE, B. C.; FALCÓN, S. G.; GÁNDARA, J. S. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. **Food Control**, 17: 900-904, 2006.
- QUEIROZ, S.S.; TORRES, M.A.A. Anemia ferropriva na infância. **Jornal de Pediatria**, 76: 298-304, 2000.

- SANTOS, C.D., SANTOS, L.M.P., FIGUEIROA, J.N.; MARROQUIM, P.M.G.; OLIVEIRA, M.A.A. Anemia em escolares da primeira série do ensino fundamental da rede pública de Maceió, Al, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 18: 1757-1763, 2002.
- SANTOS, L.P.M.; PEREIRA, M.Z. Efeitos da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cadernos de Saúde pública**, 23(11): 17-24, 2007.
- VÍTOLO, M.R. **Nutrição: da gestação à adolescência**. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores; 2003.

## Artigo 5

# EFEITO DO PROCESSO DE ASSAMENTO NO TEOR DE ÁCIDO FÓLICO E FERRO EM BOLO DE FUBÁ

Elede Martins Elias e Helena T. Godoy \*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP, Brasil.

\* [helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)



## RESUMO

O enriquecimento de alimentos vem ganhando cada vez mais espaço, tendo em vista uma forma de prevenir doenças e ainda agregar valor aos produtos, sendo assim, destaca-se o ácido fólico e ferro como os micronutrientes mais utilizados para tal fim. Visto que o ácido fólico pertence a uma classe de vitaminas, e estas são altamente sensíveis a parâmetros tais como temperatura, oxigênio, luz, etc., suas estabilidades são altamente afetadas pelas condições de processamento, armazenamento ou cozimento. A farinha de trigo e milho foram os alimentos escolhidos pelo Ministério da Saúde para adição do ferro e ácido fólico devido sua grande abrangência na população em termos de consumo. Para cada 100 g de farinha de milho ou trigo deve conter no mínimo 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro. Este trabalho teve como objetivo de quantificar o teor de ácido fólico e ferro em bolos de fubá e seus ingredientes como farinha de trigo, fubá de milho e mix e avaliar a perda de ácido fólico e do ferro após o assamento do bolo de fubá. Para tal foi utilizado um método em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com fase móvel composta de solução de ácido acético 2 % e acetonitrila em corrida por gradiente, coluna C18 e detecção com arranjo de diodos a 290 nm. A validação do método para o ácido fólico nas matrizes analisadas está descrita no Artigo 2. Os teores de ácido fólico encontrados nos bolos de fubás variaram de 41,68 a 96,96 µg 100 g<sup>-1</sup>. Esses valores correspondem, em média, a apenas 40% do esperado para as farinhas enriquecidas (150 µg 100 g<sup>-1</sup>). Nas análises de ferro constatou-se que o teor do mineral para os bolos de fubá variou, em média, 1,29 a 2,93 mg 100 g<sup>-1</sup> que correspondem de 30 a 70 % do valor estipulado para as farinhas. A

variação do CV foi de no máximo 8,99 % para o ácido fólico e 4,19 % para o ferro. As perdas para o ácido fólico após o assamento do bolo oscilaram entre 16,0 a 26,0 % demonstrando haver degradação da vitamina, entretanto nas análises de ferro constatou-se que as perdas foram praticamente insignificantes no processo (0,13 a 1,30 %).

Palavras-chave: Estabilidade, ácido fólico, ferro, CLAE.

## ABSTRACT

The enrichment of foods is gaining more space in order to prevent forms of disease and also add value to products, so one highlights the folic acid and iron as micronutrients most commonly used for this purpose. Since folic acid is classified as vitamin, their are highly sensitive to parameters such as temperature, oxygen, light, etc., their stabilities are highly affected by the conditions of processing, storage or cooking. The wheat and corn were the foods chosen by the Ministry of Health for the addition of iron and folic acid because of its wide coverage in the population in terms of consumption. For every 100 g of corn flour or wheat should contain at least 150 micrograms of folic acid and 4.2 mg of iron. This study aimed to quantify the amount of folic acid and iron in corn cakes and their ingredients like wheat flour, corn meal and mix, thus evaluating the loss of folic acid and iron after baking the cornmeal cake. For such, a method has been used through high performance liquid chromatography (HPLC) with mobile phase containing acetic acid and 2 % acetonitrile gradient in the race, C18 column and detection with a diode array at 290 mn. Validation of the method for folic acid in the matrix tested is described in Article 2. The levels of folic acid found in cornmeal cakes ranged from 41.68 to 96.96 mg 100 g<sup>-1</sup>. These values correspond, on average, only 40% of that expected for enriched flour. In the analysis of iron was found that the mineral content in cornmeal cakes ranged on average from 1.29 to 2.93 mg 100 g<sup>-1</sup> corresponding 30 to 70% of the value set for the meal. The variation of CV was no more than 8.99 % for folic acid and 4.19 % for iron. The loss of folic acid after baking the cake ranged from 16.0 to 26.0 % showing no degradation of the vitamin,

however the analysis of iron it was found that losses showed to be insignificant post process (0.13 to 1.30 %).

Keywords: Stability, folic acid, iron, HPLC.

## 1. Introdução

A nutrição inadequada é um problema mundial tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, com sérias implicações econômicas e à saúde. A fortificação contínua tem sido uma das principais estratégias empregadas para minimizar este problema, sendo uma maneira eficaz para corrigir as deficiências de nutrientes essenciais de uma população, devido a sua abrangência, biodisponibilidade e baixo custo (SCRIMSHAW, 2005).

A falta de vitaminas pode causar sérias doenças aos seres humanos, apesar de que somente quantidades reduzidas são necessárias para garantir uma boa saúde sendo os alimentos a principal fonte de vitaminas para o ser humano (ALABURDA e SHUNDO, 2007).

O ácido fólico, uma vitamina do complexo B denominada vitamina B<sub>9</sub>, é requisito para o crescimento normal, na fase reprodutiva (gestação e lactação) e na formação de anticorpos. Atua como coenzima no metabolismo de aminoácidos (glicina) e síntese de purinas e pirimidinas, síntese de ácido nucléico DNA e RNA e é vital para a divisão celular e síntese protéica. Portanto tem despertado um grande interesse devido a sua ligação na prevenção dos defeitos do tubo neural e possível prevenção de doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e problemas neuropsiquiátricos, tais como demência e depressão (PFEIFFER et al., 2005).

O ferro é um elemento essencial da hemoglobina, o carregador de oxigênio dos glóbulos vermelhos do sangue (hemácias) (HEMMINKI et al., 1995). Também

é encontrado na mioglobina, que leva oxigênio para os músculos, e faz parte de muitas enzimas e compostos do sistema imunológico (GOODENOUGH, 1994).

A anemia por carência de ferro é o distúrbio nutricional mais comum em todo o mundo, prejudica o desenvolvimento motor, cognitivo, a linguagem e é responsável pelo atraso no desenvolvimento mental de crianças; debilita o sistema imunológico, favorece infecções, doenças e em gestantes está associada a condições como o parto pré-maturo (TORREJÓN et al., 2004; LEAL e OSÓRIO, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o número de pessoas anêmicas em todo o mundo aproxime-se de dois bilhões e que a maioria dos casos de anemia seja causada por deficiência de ferro (WHO, 2005). No Brasil, atinge aproximadamente 50 % das crianças com até 5 anos de idade, 20 % dos adolescentes e até 30 % das gestantes (ANVISA, 2000).

Em virtude dos problemas ocasionados pela falta de vitaminas e minerais e sua importância à saúde pública, muitos programas têm sido desenvolvidos para reduzir a prevalência de distúrbios causados por deficiência de ácido fólico e ferro (BROGNOLI, 2008).

No Brasil, a Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, a partir de junho de 2004. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver no mínimo 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro. A medida visou reduzir os altos índices de anemia e outras doenças decorrentes da carência em ácido fólico e ferro considerando que estes alimentos são largamente consumidos pela população brasileira (ANVISA, 2002).

A fortificação visa melhorar o estado nutricional de grupos populacionais em um longo prazo. Um aspecto essencial da fortificação de alimentos é a eleição do veículo alimentar. Para que um alimento possa ser um veículo potencial de fortificação, deve ser de baixo custo, de alto consumo pela população-alvo e ter um consumo padrão constante com baixo risco de excesso (FAO, 1996; NESTEL et al., 2004). Também deve ser considerada a concentração do micronutriente no alimento (DARY e MORA, 2002).

Os maiores desafios para o ácido fólico são em relação a sua estabilidade, por pertencer a uma classe de vitaminas, são altamente sensíveis a parâmetros tais como temperatura, oxigênio, luz, etc., suas estabilidades são altamente afetadas pelas condições de processamento, armazenamento ou cozimento dos alimentos (GREGORY, 1989; ARCOT, SHRESTHA e GUSANOV, 2002; VORA et al., 2004). Para o ferro além de evitar a indesejável cor e as mudanças de sabor, o desafio principal é proteger o ferro de potenciais inibidores da absorção do ferro presentes em alimentos geralmente fortificados (HURRELL, 2002). Pré-requisitos para a suplementação eficaz incluem um fornecimento eficiente e consistente, entrega e consumo de um suplemento de ferro de alta biodisponibilidade, sendo o pH um fator de grande importância neste caso (GIBSON, 1997).

O objetivo deste trabalho foi analisar os teores de ácido fólico e ferro em bolos de fubá e seus ingredientes como farinha de trigo, mix e fubá de milho e avaliar as perdas no bolo de fubá após seu assamento.

## **2. Parte Experimental**

### **2.1. Produtos analisados**

As amostras de bolo de fubá, mix (preparado de farinha de trigo com fubá de milho), farinha de trigo e fubá de milho foram adquiridas na cidade de Campinas. O bolo de fubá foi obtido de três diferentes fornecedores. Apenas um fornecedor utilizava o mix em sua preparação e os outros dois utilizavam a farinha de trigo e fubá de milho separadamente. Para o bolo de fubá foram analisados 3 lotes e em cada lote foram analisadas 5 amostras. Já para os ingredientes utilizados no preparo dos bolos (mix, farinha de trigo e fubá de milho) foram analisados 3 lotes mas em cada lote foi analisada apenas uma amostra, pois de cada lote o fornecedor utilizava os ingredientes preparar as 5 amostras de bolos. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

### **2.2. Determinação de umidade para bolo de fubá e ingredientes**

Foi utilizado o método por secagem em estufa (Nova Ética, 400/3ND, nº série 0766/00) a temperatura de 105 °C, até peso constante. As determinações de umidade foram feitas para expressar as concentrações de ácido fólico em base seca, todas as análises foram feitas em triplicata.

Para o bolo de fubá a umidade variou entre 27 a 31 %, para o mix variou entre 17 a 19 %, para a farinha de trigo variou entre 22 a 29 % e para o fubá de milho variou entre 11 a 15 %.

## **2.3. Determinação do ácido fólico**

### **2.3.1. Reagentes**

O padrão de ácido fólico (lote: F-7876, com 98 % de pureza aproximadamente) foi adquirido da SIGMA (USA). A acetonitrila, grau cromatográfico, fosfato de potássio monobásico, o ácido acético e tricloroacético, grau analítico, foram adquiridos da Merck (Brasil). A água utilizada no preparo do tampão, das amostras e da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). A fase móvel, os solventes orgânicos, as soluções padrões e as amostras foram filtradas em filtros de membrana da Millipore (HAWP e HAWP04700), com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

### **2.3.2. Equipamento**

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100 (Agilent), com injetor automático e capacidade de 1 até 100  $\mu\text{L}$ , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível e de fluorescência, dispostos em série e compartimento controlador de temperatura para coluna analítica. O software HP-Chemstation foi utilizado para administração do sistema de aquisição e tratamento de dados. A coluna utilizada para o processo cromatográfico foi uma Hypersil, ODS-2, 3  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 4.6 mm d.i.

### 2.3.3. Método

A análise foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a extração inicialmente a amostra foi homogeneizada e pesado 1,0 g. Foram adicionados 3,0 mL de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Logo após foi adicionado 1,5 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 2.6 com agitação no vortex por 1 minuto e deixado em repouso por mais 1 minuto. Finalmente foi adicionado mais 0,5 mL de ácido tricloroacético de forma cuidadosa (sem agitação brusca) e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida todas as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 125000 x g, após isto foram filtradas em papel de filtro Watmamm (0,45 µm).

Para a amostra de farinha de trigo houve modificação na extração com adição de um modificador orgânico para melhores resultados. Iniciou-se portanto a extração com 1,0 mL de acetonitrila, 2,5 mL de KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e 1,0 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 2.6, após isto, procedeu-se da mesma forma conforme descrito anteriormente.

Todas as amostras, as soluções padrões e a fase móvel foram filtradas em membrana 0,45 µm (Millipore HAWP e HAWP04700). Os extratos purificados foram injetados, volume de 100 µL, e imediatamente analisados utilizando CLAE.

A fase móvel utilizada para a separação do ácido fólico foi uma solução de ácido acético glacial 2,0 %, com pH ajustado para 2,7 com KOH, a uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

O ácido fólico (AF) foi separado em sistema de eluição por gradiente, iniciando com 90 % de solução aquosa de ácido acético e 10 % de acetonitrila (v/v), chegando em 5 minutos a 80 % de solução ácido acético e 20 % de acetonitrila (v/v), e então a concentração de acetonitrila foi mantida nessas condições até o final da corrida, em 10 minutos. Após isto um período de limpeza foi feito com 100 % de acetonitrila até 15 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada por 5 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD). O ácido fólico foi detectado na região do ultravioleta com 290 nm.

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. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação foi feita por padronização externa e a curva de calibração foi construída para a forma da vitamina encontrada no alimento analisado, sendo cada ponto representado pela média de três determinações com mínimo de 5 pontos. A validação do método está descrita no Artigo 2.

## **2.4. Determinação do ferro**

### **2.4.1. Reagentes**

Os reagentes de grau analítico como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio bem como o ácido clorídrico comercial (preparação do banho de limpeza para

frascos utilizados para determinação de ferro) foram adquiridos da Merck ou Synth (Brasil).

#### **2.4.2. Equipamento**

Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo Analyst 3110, com uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco foi utilizado para determinação de ferro (248,3 nm), fabricado pela Perkin Elmer.

#### **2.4.3. Limpeza das vidrarias**

Todas as vidrarias foram lavadas em banho de detergente e enxaguadas com água até total eliminação de espumas. Foram colocadas todas as vidrarias em banho de ácido (clorídrico comercial) 10 % (v/v), mantidas no banho por, pelo menos, 12 horas e após isto foram enxaguadas com água deionizada. As vidrarias foram secas ao ar livre.

#### **2.4.4. Mineralização das amostras**

Pesou-se em papéis vegetais, cerca de 0,6000 g de cada uma das matrizes avaliadas. As amostras foram transferidas para tubos de digestão. Adicionou-se aos tubos 2 mL de ácido nítrico concentrado. Preparou-se, também, dois tubos "brancos" (sem as amostras).

Após isto, colocou-se pequenos funis na entrada de cada tubo de digestão e levados para o bloco digestor e iniciou-se o aquecimento. A temperatura foi ajustada para 100 °C. Os funis permitiram que o ácido nítrico ficasse em refluxo e o aquecimento foi mantido por 2 horas. Os tubos foram retirados do aquecimento

e resfriados em água corrente. Após o resfriamento foi adicionado, 1 mL de peróxido de hidrogênio em cada tubo (inclusive nos brancos) e levados novamente para o bloco digestor e, desta vez, a temperatura foi ajustada para 110 °C, por 30 minutos. A temperatura foi aumentada para 130 °C e deixada por mais 1 hora. Então os tubos foram retirados do bloco digestor e deixados em repouso até total resfriamento.

Adicionou-se uma pequena quantidade de água deionizada (5 mL) aos tubos de digestão e estes foram colocados em um banho de ultra-som por alguns segundos. O conteúdo dos tubos foi transferido para balões volumétricos de 25 mL e completado o volume.

As determinações de ferro foram feitas, em triplicata, utilizando-se a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Analytical Methods Committee, 1987).

#### **2.4.5. Determinação quantitativa do ferro**

A determinação quantitativa de ferro foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com chama em aparelho marca Perkin Elmer, modelo 3110. O líquido foi aspirado com a ajuda de um nebulizador pneumático e misturada ar (oxidante) e acetileno (combustível), 10 e 3 L<sup>-1</sup> de fluxo médio, respectivamente.

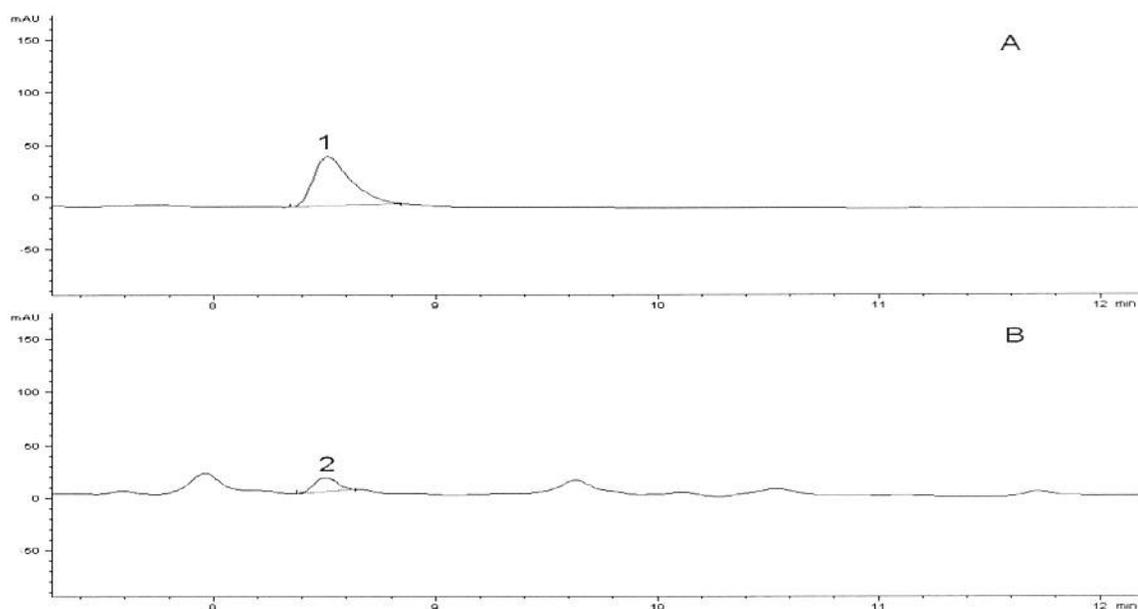
Uma lâmpada de deutério foi utilizada para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco para determinação de ferro (248,3 nm) de acordo com a metodologia proposta e validada de acordo Boen et al, 2008. Os resultados das análises realizadas em triplicata foram expressos em mg 100 g<sup>-1</sup>.

## 2.5. Análise Estatística dos Resultados

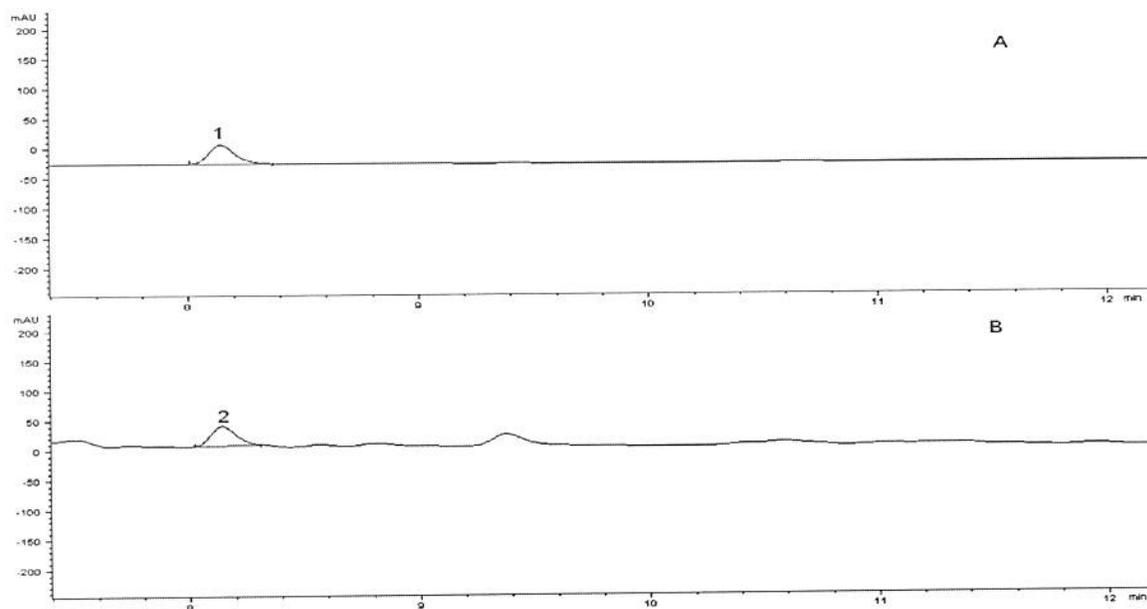
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey, ao nível de 95 % de confiança, utilizando-se o software *Statistica*, versão 7.0.

## 3. Resultados e Discussão

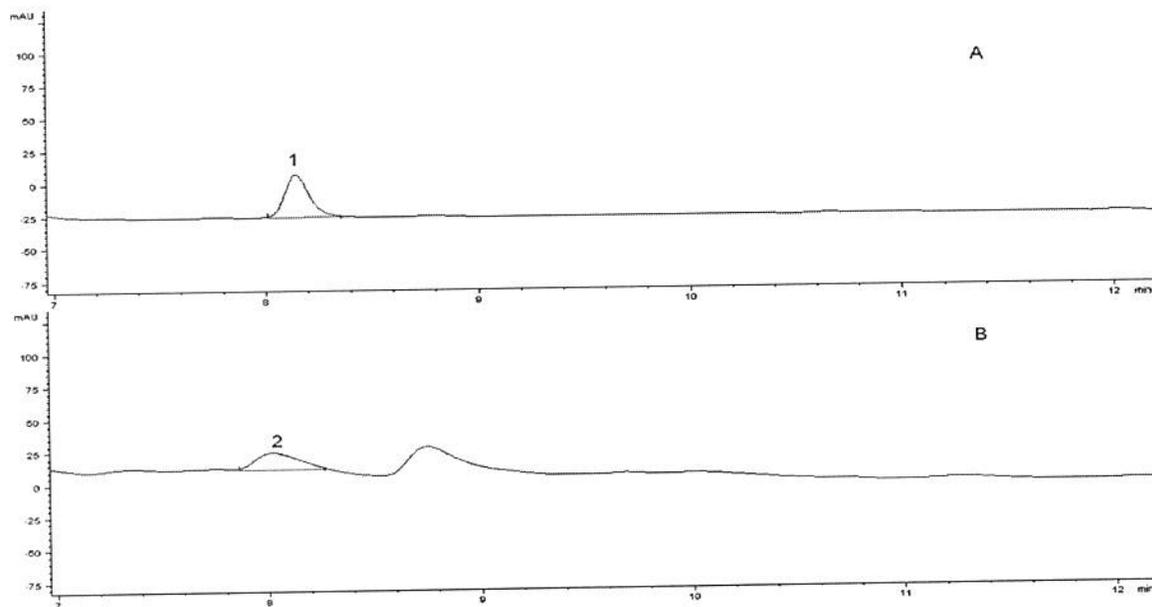
Nas Figuras 1, 2, 3, 4 podem ser visualizados os perfis cromatográficos para (A1) o padrão de ácido fólico e para (B2) as amostras de bolo, mix, fubá de milho e farinha de trigo respectivamente. Os tempos de retenção encontrados nas matrizes analisadas foram 8,52 min para o bolo, 8,13 min para o mix, 8,05 min para a fubá de milho e 8,38 min para a farinha de trigo.



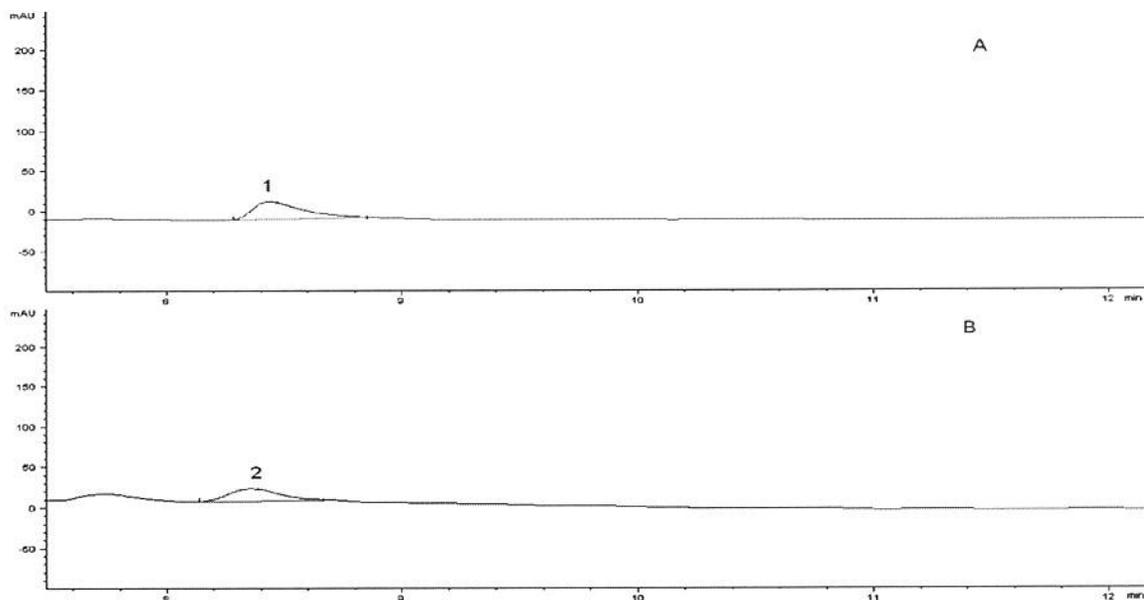
**Figura 1:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de bolo (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,53 min) e 2 (8,52 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 2:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de mix (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,14 min) e 2 (8,13 min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 3:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de fubá (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,15 min) e 2 (8,05min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.



**Figura 4:** Perfil cromatográfico obtido através do método validado para o padrão de ácido fólico (A) e amostra de trigo (B). Os picos identificados são do ácido fólico 1 (8,42 min) e 2 (8,38min). Coluna Thermo Hypersil, ODS-2, 3  $\mu$ m, 100X4,6 mm di. Eluição por gradiente: 90 % de solução aquosa de ácido acético (2 %) em 0 min, mudando para 80 % de solução de ácido acético e 20 % de acetonitrila, até 5 min e mantendo-se nesta proporção até 10 min. Limpeza da coluna: 100 % de acetonitrila de 10 a 15 min. Re-equilíbrio: de 15 a 20 min. Vazão: 0,5 mL min<sup>-1</sup>. DAD: 290 nm.

Para a avaliação do teor de ácido fólico e ferro no bolo de fubá, mix, farinha de trigo e fubá de milho foram analisadas amostras de 3 diferentes fornecedores (A, B e C) e três lotes (1, 2 e 3), demonstrados na Tabela 1 e 2. Os fornecedores A e B utilizaram no preparo do bolo a farinha de trigo e o fubá de milho e o fornecedor C utilizou o mix (preparado farinha de trigo e fubá de milho).

A avaliação da perda foi feita no produto pronto para consumo, ou seja, o bolo de fubá que foi submetido à assamento (temperatura de 200 ° C). O valor esperado demonstrado nas tabelas 1 e 2 para ácido fólico e ferro é resultante do valor que deveria estar presentes nas amostras de farinha de trigo, fubá de milho e mix segundo o que preconiza a legislação (150  $\mu$ g 100 g<sup>-1</sup>), utilizados pelos fabricantes. Estas farinhas fortificadas foram adicionadas na massa crua

juntamente com o restante dos outros ingredientes para a fabricação do bolo de fubá, ou seja, refere-se ao teor de ácido fólico e ferro que deveria conter na massa total antes do processo de assamento considerando que não houvesse degradação de ácido fólico e ferro após o processamento. O valor encontrado refere-se ao teor de ácido fólico e ferro que realmente estava presente nos ingredientes e posteriormente nas amostras do bolo analisadas.

**TABELA 1.** Teor médio de ácido fólico (AF) em bolo, mix, farinha de trigo e fubá de milho e % de perdas em bolos prontos para consumo.

<i>Amostra</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>Lote</i>	<i>Valor esperado AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}</math></i>	<i>Valor encontrado AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}</math></i>	<i>% PERDA</i>
Bolo de fubá*	A	1	53,84	45,25 <sup>a</sup>	15,95
		2	54,76	43,48 <sup>a</sup>	20,60
		3	56,00	41,68 <sup>a</sup>	25,57
	B	1	65,28	54,52 <sup>a</sup>	16,97
		2	62,79	47,51 <sup>a</sup>	24,33
		3	66,91	52,24 <sup>a</sup>	21,92
	C	1	115,86	96,96 <sup>a</sup>	16,30
		2	107,97	82,81 <sup>a</sup>	23,30
		3	112,75	89,30 <sup>a</sup>	20,80
Mix**	C	1	150	181,29 <sup>a</sup>	—
		2	150	156,93 <sup>a</sup>	—
		3	150	173,17 <sup>a</sup>	—
Farinha de trigo**	A	1	150	139,37 <sup>a</sup>	—
		2	150	159,66 <sup>a</sup>	—
		3	150	144,70 <sup>a</sup>	—
	B	1	150	147,19 <sup>a</sup>	—
		2	150	130,64 <sup>a</sup>	—
		3	150	155,01 <sup>a</sup>	—
Fubá de milho**	A	1	150	207,92 <sup>a</sup>	—
		2	150	217,32 <sup>a</sup>	—
		3	150	198,72 <sup>a</sup>	—
	B	1	150	208,14 <sup>a</sup>	—
		2	150	175,34 <sup>a</sup>	—
		3	150	183,49 <sup>a</sup>	—

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre lotes, mesmo fornecedor ( $p > 0,05$ ).

\* média das amostras (n=15).

\*\* média das amostras (n=3).

**TABELA 2.** Teor médio de ferro (Fe) em bolo, mix, farinha de trigo e fubá de milho e % de perdas em bolos prontos para consumo.

<i>Amostra</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>Lote</i>	<i>Valor esperado Fe mg 100 g<sup>-1</sup></i>	<i>Valor encontrado Fe mg 100 g<sup>-1</sup></i>	<i>% PERDA</i>
Bolo de fubá*	A	1	1,31	1,29 <sup>a</sup>	1,30
		2	1,37	1,37 <sup>a</sup>	0,43
		3	1,35	1,34 <sup>a</sup>	0,69
	B	1	1,77	1,76 <sup>a</sup>	0,44
		2	1,69	1,67 <sup>a</sup>	0,79
		3	1,69	1,69 <sup>a</sup>	0,13
	C	1	2,92	2,89 <sup>a</sup>	0,93
		2	2,86	2,85 <sup>a</sup>	0,28
		3	2,94	2,93 <sup>a</sup>	0,20
Mix**	C	1	4,20	4,41 <sup>a</sup>	—
		2	4,20	4,32 <sup>a</sup>	—
		3	4,20	4,44 <sup>a</sup>	—
Farinha de trigo**	A	1	4,20	4,02 <sup>a</sup>	—
		2	4,20	4,37 <sup>a</sup>	—
		3	4,20	4,28 <sup>a</sup>	—
	B	1	4,20	4,62 <sup>a</sup>	—
		2	4,20	4,16 <sup>a</sup>	—
		3	4,20	4,22 <sup>a</sup>	—
Fubá de milho**	A	1	4,20	4,27 <sup>a</sup>	—
		2	4,20	4,30 <sup>a</sup>	—
		3	4,20	4,21 <sup>a</sup>	—
	B	1	4,20	4,15 <sup>a</sup>	—
		2	4,20	4,31 <sup>a</sup>	—
		3	4,20	4,25 <sup>a</sup>	—

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre lotes, mesmo fornecedor(p>0,05).

\* valor esperado e encontrado: média das amostras (n=15).

\*\* valor esperado e encontrado: média das amostras (n=3).

A Tabela 3 mostra o teor médio de ácido fólico e ferro, respectivamente, entre os três fornecedores analisados no bolo de fubá, dois fornecedores de farinha de trigo e dois fornecedores de fubá de milho. Cabe ressaltar que o mix não aparece nesta tabela, pois foi utilizado por um único fornecedor. Também está demonstrada a análise estatística dos resultados.

**TABELA 3.** Teor médio de ácido fólico (AF) e ferro (Fe) entre fornecedores em bolo, farinha de trigo e fubá de milho.

<i>Amostra</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>AF <math>\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}</math></i>	<i>Fe <math>\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}</math></i>
		<i>M</i>	<i>M</i>
Bolo de fubá*	A	43,47 <sup>b</sup>	1,33 <sup>c</sup>
	B	51,42 <sup>b</sup>	1,71 <sup>b</sup>
	C	89,69 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>
Farinha de trigo**	A	147,91 <sup>a</sup>	4,22 <sup>a</sup>
	B	144,28 <sup>a</sup>	4,33 <sup>a</sup>
Fubá de Milho**	A	207,99 <sup>a</sup>	4,26 <sup>a</sup>
	B	188,99 <sup>a</sup>	4,24 <sup>a</sup>

Valores assinalados com a mesma letra não apresenta diferença significativa entre fornecedores ( $p > 0,05$ ).

\*M: média das amostras ( $n=45$ )  $\pm$  estimativa do desvio padrão.

\*\*M: média das amostras ( $n=9$ )  $\pm$  estimativa do desvio padrão.

Observou-se que o teor de ácido fólico para as farinhas de trigo, em dois lotes dos fornecedores A e B, estavam um pouco abaixo do esperado do limite de  $150 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  (não excedendo 13 %). Já para as amostras de fubá de milho a concentração da vitamina estava entre 17 a 45 % acima do valor esperado e o mix também apresentou um acréscimo de até 21 % do esperado de  $150 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Para o ferro, verificou-se que para as farinhas de trigo as quantidades obtidas experimentalmente estavam bem próximas ao esperado de  $4,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ , somente 2 lotes do fornecedor A e um lote do fornecedor B estavam um pouco abaixo (não excedendo 4 %), para as amostras de fubá de milho o teor estava acima, exceto um lote do fornecedor B que estava próximo ao esperado.

Sadighi et al. (2008) avaliaram farinhas fortificadas com ferro no Irã e encontrou um valor médio de  $5,28 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . No Brasil, o teor de ácido fólico em farinhas de trigo variou de 73 a  $233 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ , e nas mesmas amostras, a

concentração de ferro variou de 4,6 a 7,4 mg 100 g<sup>-1</sup>, em média, de oito marcas diferentes, avaliados por Boen et al. (2008).

Para os bolos de fubá foram avaliados amostras de 3 diferentes fornecedores verificou-se que a concentração de ácido fólico variou, em média, de 41,68 a 96,96 µg 100 g<sup>-1</sup>. Neste trabalho as perdas de ácido fólico oscilaram entre 15,95 a 25,57 % demonstrando haver degradação da vitamina.

Comparando-se essa porcentagem de diminuição da vitamina aos dados obtidos por Lima et al. (2004) e Gujska e Majewska (2005) para pães, verificou-se que o preparo dos bolos gerou perdas muito similares aos 19 e 26 %, mencionados pelos pesquisadores, respectivamente.

Nas análises de ferro constatou-se que o teor do mineral para os bolos de fubá variou, em média, 1,29 a 2,93 mg 100 g<sup>-1</sup>. As perdas de ferro oscilaram entre 0,13 a 1,30 % demonstrando ser praticamente insignificantes no processo.

As análises estatísticas, por meio da ANOVA e teste de Tukey, não indicaram haver diferença significativa, com 95% de confiança, entre os lotes nas amostras de bolos de fubá, mix, farinha de trigo e fubá de milho tanto para o ácido fólico quanto para o ferro (Tabela 1 e 2). Para o ácido fólico somente o bolo de fubá se destacou com diferença significativa para no fornecedor C, já para o ferro as análises para o bolo de fubá demonstraram haver diferença significativa entre os 3 fornecedores (Tabela 3).

#### **4. Conclusões**

As perdas foram maiores para a vitamina que para o mineral, demonstrando que após assamento dos bolos houve degradação do ácido fólico indicando a instabilidade da vitamina. Em relação ao ferro as perdas foram insignificantes indicando sua estabilidade neste tipo de processamento.

Essas perdas, em média 20%, devem ser contabilizadas para estudos de fortificação em alimentos que sofrem processamento.

Esses dados podem ser úteis no melhor planejamento do enriquecimento das farinhas com a vitamina e ainda fornecer base para o cálculo da concentração esperada de ácido fólico em um alimento indiretamente fortificado e/ou que passe por processamento.

#### **5. Agradecimentos**

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos, Laboratório de Análise de Alimentos pelo desenvolvimento do projeto e a CAPES e CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

## 6. Referências Bibliográficas

- ALABURDA, J. e SHUNDO, L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(2): 95-102, 2007.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (Royal Society of Chemistry). **Analyst**, 112: 199-204, 1987.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 15, de 21 de fevereiro de 2000. **Regulamento técnico para a fortificação de ferro em farinhas de trigo e milho**. Diário oficial da união, Brasília, 25 de fevereiro de 2000. Disponível em <www.anvisa.gov.br > acesso em 10/2009.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico**. Diário oficial da união, Brasília, 18 de dezembro de 2002. Disponível em <www.anvisa.gov.br > acesso em 09/2009.
- ARCOT, J., SHRESTHA, A.K., GUSANOV, U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. **Food Control**, 13: 245-252, 2002.
- BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA-FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. A. Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 19(1): 53-59, 2008.
- BROGNOLI, A.F. et al. Gestação: Anemia ferropriva, deficiência de folato versus fortifica o alimentar. **Cadernos da Escola da Saúde e Nutri o**, 1: 1-7, 2008.
- DARY, O.; MORA, J.O. Food fortification to reduce vitamin A deficiency: International Vitamin A Consultative Group Recommendations. **Journal of Nutrition**, 132: 2927S-2933S, 2002.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Food Fortification: technology and quality control**. Report of an FAO Technical Meeting, Rome, 20-23; 1995. FAO Food and Nutrition Paper. Rome: FAO; 1996.
- GIBSON, R.S. Technological approaches to combating iron deficiency. **European Journal of Clinical Nutrition**, 51(4), S25-S27, 1997.
- GOODENOUGH, S. Iron deficiency – a concern for infants of the 1990s. **Nutrition and Food Science**, 6: 24-5, 1994.
- GREGORY, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. **Advanced Food and Nutritional Research**, 33: 1-101, 1989.
- GUJSKA, E.; MAJEWSKA, K. Effect of Baking Process on Added Folic Acid and Endogenous Folates Stability in Wheat and Rye Breads. **Plant Foods for Human Nutrition**, 60: 37-42, 2005.
- HEMMINKI, E.; NEMET, K.; HORV TH, M.; MALIN, M.; SCHULER, D.; HOLLAN, S. Impact of iron fortification of milk formulas on infants growth and health. **Nutrition Research**, 15(4): 491-503, 1995.
- HURRELL, R.F. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. **Nutrition Reviews**, 60: S7-15, 2002.

- LEAL, L.P. e OSÓRIO, M.M. Validação e reprodutibilidade de sinais clínicos no diagnóstico de anemia em crianças. **Cadernos de Saúde Pública**, 21(2): 565-72, 2005.
- LIMA, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. HPLC Methodology For Folic Acid Determination In Enriched Wheat Flour And Bread. **Tecnica Molitoria International**, 55(3A): 151-158, 2004.
- NESTEL, P.; NALUBOLA, R.; SIVAKANESHAN, R.; WICKRAMASINGHE, A.R.; ATUKORALA, S.; WICKRAMANAYAKE, T. The use of iron-fortified wheat flour to reduce anemia among the estate population in Sri Lanka. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 74(1): 35-51, 2004.
- PFEIFFER, C.M.; CAUDILL, S.P.; GUNTER, E.W.; OSTERLOH, J.; SAMPSON, E.J. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition examination Survey 1999-2000. **American Journal of Clinical Nutrition**, 82: 442-50, 2005.
- SADIGHI, J.; SHEIKHOESLAM, R.; MOHAMMAD, K.; POURARAM, H.; ABDOLLAHI, Z.; SAMADPOUR, K.; KOLAHDOOZ, F.; NAGHAVI, M. Flour fortification with iron: a mid-term evaluation. **Public Health**, 122: 313-321, 2008.
- SCRIMSHAW, N.S. La fortificación de alimentos: una estrategia nutricional indispensable. **Anales Venezolanos de Nutrición**, 18(1): 64-8, 2005.
- TORREJÓN, C.S.; CASTILLO-DURÁN, C.; HERTRAMPF, E.D.; RUZ, M. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the complementary national food program. **Nutrition**, 20: 177-80, 2004.
- VORA, A., RIGA, A., DOLLIMORE, D., ALEXANDER, K. Thermal stability of folic acid in the solid-state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 75(3): 709-717, 2004.
- WHO. World Health Organization. **Micronutrient deficiencies: Battling iron deficiency anemia**. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/nut/ida.htm>  
Acesso em: 09 Set. 2009.

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS

O método desenvolvido e validado para ácido fólico nas matrizes estudadas neste trabalho foi adequado, simples e rápido, sendo assim, importante ferramenta para avaliação da fortificação alimentar.

Nos alimentos analisados observou-se que nas amostras de bolo a concentração de ácido fólico e ferro foram em média de 41,68 a 96,96  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  e 1,29 a 2,93  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  respectivamente. Dessa forma, a ingestão de bolos confeccionados com farinhas fortificadas, considerando que cada pessoa consuma em torno de 2,0 g/dia (IBGE, 2007), fornece uma quantidade inferior a 1 % das recomendações nutricionais de ácido fólico, que é de 240  $\mu\text{g/dia}$  para adultos (ANVISA, 2005) e de ferro que é de 14 mg/dia para adultos (ANVISA, 2005). Por outro lado se considerarmos que a ingestão de uma pessoa seja em média 100 g de por um pedaço de bolo e o teor médio de ácido fólico encontrado no bolo de 55  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  forneceria em média 22 % das recomendações para adultos e para o ferro considerando o teor médio de 2,0  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  forneceria em média 15 % das recomendações para adultos.

Para os sucos e leites de soja, prontos para beber, das amostras analisadas somente duas estavam um pouco abaixo da concentração de ácido fólico declarada no rótulo. Para o ferro dois fornecedores das amostras de leite estavam em desacordo com o declarado em seus rótulos demonstrando haver uma falha na quantidade de adição do mineral ou também em sua homogeneização (quando valor inferior ao esperado).

Quanto ao estudo do efeito do processo de assamento as perdas foram maiores para a vitamina que para o mineral, demonstrando que após assamento dos bolos houve degradação do ácido fólico (entre 15,95 a 25,57 %) e muito pouco se perdeu em relação ao ferro.

Considerando que a fortificação de alimentos é uma estratégia importante no combate às carências nutricionais, o desenvolvimento de metodologias simples, rápidas e confiáveis para a determinação e quantificação do ácido fólico e ferro em alimentos fortificados poderá ser útil em:

- Melhor planejamento de fortificação em alimentos e ainda fornecer base para o cálculo da concentração esperada de ácido fólico e ferro em um alimento indiretamente fortificado;
- Incentivar estudos avaliando o impacto da fortificação em alimentos;
- Ajudar a implementar novas estratégias para que níveis adequados de ácido fólico e ferro atinjam a população a fim de solucionar o problema de carências nutricionais.