

Ácido fólico e fortificação de alimentos

Folic acid and food enrichment

RIALA6/1112

Janete ALABURDA*, Luzia SHUNDO

*Endereço para correspondência: Seção de Química Biológica, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902 São Paulo/SP. E-mail: jalaburd@ial.sp.gov.br.

Recebido: 01/06/2007 – Aceito para publicação: 20/07/2007

RESUMO

Folato é o termo genérico utilizado para os compostos que apresentam atividade vitamínica similar a do ácido pteroilglutâmico e é usado para descrever as formas da vitamina que ocorrem naturalmente nos alimentos, enquanto que o termo ácido fólico representa a forma sintética encontrada em suplemento medicamentoso e em alimento enriquecido. O folato está diretamente relacionado com a prevenção de defeitos do tubo neural, além da prevenção de outras doenças como problemas cardiovasculares, doença de Alzheimer, alguns tipos de cânceres, entre outras. No Brasil, o Ministério da Saúde determinou que a partir de junho de 2004, todas as farinhas de trigo e de milho fabricadas no país ou importadas devem ser enriquecidas com ferro e ácido fólico. A presente revisão faz uma abordagem geral sobre o ácido fólico e folatos, em que é feita a discussão sobre as características físico-químicas, biodisponibilidade, funções bioquímicas, fontes, uso na fortificação de alimentos e metodologia analítica para sua quantificação em alimentos.

Palavras-chave. ácido fólico, folatos, vitaminas, alimentos fortificados.

ABSTRACT

Folates are the generic term used to designate the class of compounds having a chemical structure and nutritional activity similar to that of folic acid (pteroyl-L-glutamic acid), while folic acid is a synthetic fully oxidized folic acid (FA) form added into foodstuffs and pharmaceutical preparations. Folate deficiency is a well-known risk factor for causing neural tube disorders, cardiovascular diseases, Alzheimer disease, some types of cancer, among others diseases. In Brazil, since June 2004 the Agency for Public Health Surveillance (ANVISA) has established the mandatory enrichment of wheat and corn flours with FA and iron. The present review describes some general approaches on folic acid and folates, including physical-chemical characteristics, bioavailability, biochemistry functions, sources, food fortification, and analytical methodology for performing their quantification in food.

Key words. folic acid, folates, vitamins, enriched food.

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, desde que é uma maneira eficaz para corrigir as deficiências de nutrientes essenciais de uma população, devido a sua abrangência, biodisponibilidade e baixo custo¹.

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

Nos últimos anos os folatos, uma vitamina do complexo B denominada vitamina B₉, 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, tais como demência e depressão².

O Ministério da Saúde determinou que a partir de junho de 2004, todas as farinhas de trigo e de milho fabricadas no Brasil ou importadas devem ser enriquecidas com ferro e ácido fólico³.

Ácido fólico e folatos

Os folatos são vitaminas hidrossolúveis naturais que contém a estrutura do ácido pteroilmonoglutâmico (ácido fólico), denominados vitamina B₉. Eles exibem atividade vitamínica similares a do ácido fólico e existem na forma de poliglutamatos⁴. A história da descoberta dos folatos teve início em 1935, quando começou a ser descrita uma série de distúrbios decorrentes da deficiência nutricional de um composto pertencente à família do ácido pteroilglutâmico, cujo protótipo do grupo era o ácido fólico⁵.

Este ácido recebeu este nome em 1941, quando foi isolado a partir das folhas do espinafre. Esta vitamina foi sintetizada na forma cristalina em 1943 por Bob Stokstad e em 1945 por Angier⁶, sendo possível demonstrar que ele é formado por um anel pteridínico e pelos ácidos para-aminobenzóico e glutâmico (Figura 1). Após sua síntese, pode-se verificar que os folatos diferem do ácido fólico em três aspectos: (i) possuem resíduos adicionais de unidades de glutamatos (poliglutamatos), (ii) sofrem redução para di- ou tetra-hidroderivados; e (iii) podem conter unidades carbônicas adicionais, tais como, radicais metil, formil, metileno ligados aos átomos de nitrogênio.

O termo ácido fólico 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 a mesma atividade vitamínica e inclui os folatos naturais e o ácido fólico, o qual é a forma sintética utilizada na fortificação dos alimentos.

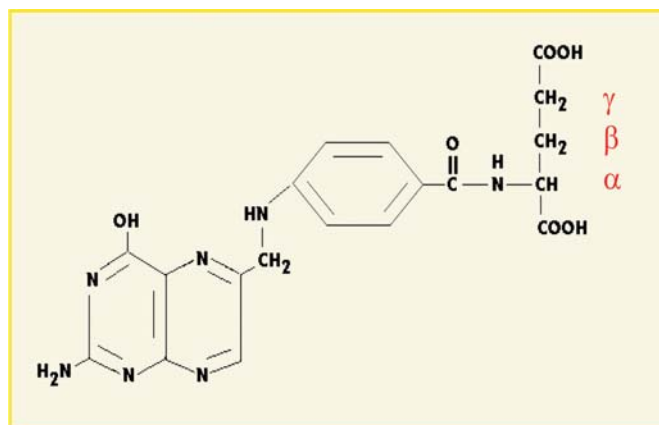


Figura 1. Fórmula estrutural do ácido fólico.

Características químicas e físicas

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também denominado ácido pteroilglutâmico ou vitamina B₉, é uma substância cristalina amarela de peso molecular 441,40 g/mol e fórmula molecular C₁₉H₁₉N₇O₆, sendo composto de três subunidades: pteridina, ácido p-aminobenzóico e ácido glutâmico. Os folatos apresentam estruturas similares à do ácido fólico, porém ocorrem naturalmente nos alimentos na forma reduzida como derivados de poliglutamatos, contendo de 2 a 7 unidades de ácido glutâmico. Além de apresentarem estrutura similar a do ácido fólico, eles também apresentam atividade vitamínica semelhante à deste ácido.

O ácido fólico puro é inodoro e insípido. É levemente solúvel em água em pH neutro (aproximadamente 1% em água fervendo), porém bastante solúvel em solução aquosa ácida e alcalina e insolúvel em solventes orgânicos, tais como etanol, acetona e éter⁷. O ácido fólico não apresenta ponto de fusão, decompondo-se a 250°C, possui rotação quiral [α]_D igual a +23° em solução 0,5 % em hidróxido de sódio 0,1 M. As soluções aquosas de ácido fólico são sensíveis ao calor e se decompõem na presença de luz.

O ácido fólico apresenta mais estabilidade em meio alcalino do que em meio ácido, sendo que as soluções padrão são preferencialmente preparadas em condições alcalinas. Ainda, a sua estabilidade depende do tipo de tampão em que ele é armazenado, sendo que a presença de fosfato no tampão pode diminuir a estabilidade desta vitamina⁷. Salienta-se que tampão fosfato é utilizado na maioria das metodologias para análise deste ácido em alimentos, nas etapas de extração como de separação e quantificação^{8,9,10}.

O ácido fólico absorve radiação eletromagnética na região do ultravioleta porém não apresenta fluorescência, enquanto que os folatos absorvem na região do ultravioleta e apresentam fluorescência. Este ácido possui vários grupos ionizáveis com constantes de dissociação ácida variando dentro de uma ampla faixa de pH, de forma que as medidas de absorvância dependem drasticamente do pH do meio¹¹. Os

comprimentos de onda (λ) de absorção na região eletromagnética do ultravioleta e as respectivas absorptividades em solução tampão fosfato 0,10 M a pH 7 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de absorbância da radiação eletromagnética na região do ultravioleta de alguns folatos: comprimentos de onda máximos e absorptividades.

Composto	λ (nm)	Absortividade ($E\%_{1cm}$)	
		($\mu\text{mol.L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Referência
Ácido fólico	287	27,6	15
	346	7,2	16
5-metiltetraidrofolato	290	31,7	15
	290	30,8	17
5-formiltetraidrofolato	285	37,2	15
10-formilfolato	297	29,1	15
Tetraidrofolato	297	29,1	15

Biodisponibilidade

A biodisponibilidade se refere à porção do folato ingerido que é absorvido e torna-se disponível para os processos metabólicos e para o armazenamento pelo organismo. Estima-se que a biodisponibilidade dos folatos naturais é incompleta em relação à vitamina na sua forma sintética, o ácido fólico. Devido a esta diferença de biodisponibilidade, que pode acarretar erros entre 10-98% em estudos epidemiológicos, recentemente foi introduzido o termo equivalente de folatos na dieta, que é definido como a quantidade de folato natural no alimento mais 1,7 vezes a quantidade de ácido fólico na dieta. Estima-se que a biodisponibilidade do ácido fólico adicionado aos alimentos é maior do que o folato natural dos alimentos por um fator de 1,7¹². Este fator é baseado num estudo realizado com mulheres não gestantes, o qual avaliou que a biodisponibilidade de folatos em alimentos é 50% menor ou igual que a do ácido fólico¹³ e em outra pesquisa que demonstrou que o ácido fólico adicionado nos alimentos apresenta cerca de 85% da biodisponibilidade do composto na forma pura¹⁴.

A biodisponibilidade dos folatos naturais é dependente de vários fatores, tais como: desconjugação intestinal dos poliglutamatos, matriz alimentícia, instabilidade de certos folatos lábeis e presença de certos componentes no alimento que pode aumentar a estabilidade do folato natural durante a digestão.

Os folatos são predominantemente poliglutamatos, os quais necessitam ser hidrolisados para monoglutamatos para serem absorvidos no intestino delgado. Este processo ocorre num pH ótimo entre 6-7, portanto alimentos que alteram o pH intestinal podem acarretar uma incompleta desconjugação do poliglutamato, e conseqüentemente, uma diminuição na sua biodisponibilidade¹².

O equivalente de folato dietético (EFD) foi definido para ajustar as diferenças de biodisponibilidade de ácido fólico que é considerado mais disponível do que os folatos dos alimentos. O μg de EFD é estabelecido como: $1\mu\text{g EFD} = 1\mu\text{g de folato}$

no alimento = $0,6\mu\text{g}$ de ácido fólico no alimento. Portanto, $\mu\text{g EFD} = \mu\text{g folato no alimento} + 1,7 \times \mu\text{g ácido fólico}$ ¹⁸. Para se calcular o equivalente de folato dietético presente no alimento, o método analítico utilizado deve ser capaz de diferenciar o ácido fólico dos folatos naturais presentes.

Funções

Os folatos atuam como coenzimas mediando a transferência de unidades de carbono, podendo agir como aceptores ou doadores de unidades de carbono numa variedade de reações críticas para o metabolismo de ácidos nucléicos e aminoácidos.

Eles exercem um papel vital no metabolismo do DNA através de duas rotas diferentes: (i) síntese de DNA a partir de seus precursores e (ii) síntese de metionina, a qual é necessária para a síntese de S-adenosilmetionina (SAM). O SAM é um doador de grupo metila (unidade de carbono) usada em muitas reações biológicas de metilação, incluindo um número de sítios do DNA e RNA^{19,20}. A metilação do DNA pode ser importante na prevenção de câncer.

As coenzimas também são importantes para o metabolismo de muitos aminoácidos essenciais. Elas participam, juntamente com uma enzima dependente de vitamina B₁₂, da síntese de metionina a partir de homocisteína. Desta forma uma deficiência de folato pode causar uma diminuição na síntese de metionina e uma elevação nos teores de homocisteína, os quais podem ser um fator de risco para doenças cardiovasculares²⁰, bem como, outras doenças crônicas²¹.

O folato está diretamente relacionado com a prevenção de defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN), além da prevenção de outras doenças como problemas cardiovasculares, doença de Alzheimer, alguns tipos de cânceres, entre outras^{22,23}. Vários estudos têm demonstrado que esta vitamina pode ajudar na diminuição dos teores de homocisteína no sangue, reduzindo ataques de coração e doença de Stroke. Em contrapartida, o excesso de ácido fólico pode mascarar os sintomas da deficiência da vitamina B₁₂.

A deficiência de folatos pode ser causada por diferentes situações, como uma dieta pobre de folatos ou uma absorção diminuída, como por exemplo, por alcoolismo. Certas condições como gravidez ou câncer resultam em taxas maiores de divisão e metabolismo celular, implicando um aumento na demanda corpórea de folatos. Alguns medicamentos também podem contribuir para esta deficiência, como trimetoprima, metotrexato, anticonvulsivantes e anticoncepcionais. Uma dieta deficiente de folatos pode ocasionar após quatro meses o desenvolvimento de anemia megaloblástica, além de severa deficiência de potássio⁶.

Fontes de folatos

Os alimentos com maior conteúdo de folatos são as verduras e hortaliças, os cereais e as frutas, cujos valores de folatos variam entre 20 a 160 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Os alimentos de origem animal, de forma geral, apresentam baixos teores desta

vitamina, com exceção de fígado que apresenta altas concentrações (700 a 1400µg/100g)²⁴. Os valores tabelados para esta vitamina apresentam uma variabilidade bastante grande, que está relacionada com o método analítico utilizado e com a baixa estabilidade dos folatos naturais.

Dependendo da dieta adotada pela população, pode-se obter uma ingestão adequada de folatos, como por exemplo na Espanha, onde os teores de ingestão desta vitamina são uns dos maiores entre os países da Europa²⁴. Salienta-se que além da composição da dieta, outro fator importante é o preparo dos alimentos, uma vez que estes compostos são hidrossolúveis e termolábeis.

As recomendações de teores de ingestão diárias estão baseadas na prevenção da anemia megaloblástica e de DFTN, doenças cardiovasculares, entre outras. Em 2000, o Instituto de Medicina dos Estados Unidos estabeleceu a ingestão diária recomendada de ácido fólico de 0,4mg/dia para as mulheres e 0,6mg/dia para as gestantes²⁵, valores similares publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil²⁶. Estes requerimentos de folatos são difíceis de serem alcançados com uma dieta normal equilibrada, pois esta fornece cerca de 0,25mg/dia tomando como base um valor energético total de 2200 Kcal diárias^{27,28}.

Fortificação de alimentos

O enriquecimento dos alimentos tem sido uma estratégia para aumentar os níveis de folatos, tendo a vantagem de alcançar uma ampla parte da população, sem a necessidade de mudanças nos hábitos alimentares²⁹. Alguns estudos têm demonstrado que o enriquecimento dos alimentos pode ser a forma mais eficaz devido ao seu custo, menos que 0,1 % do custo da farinha³⁰, quando comparado com mudanças nas dietas ou administração de suplementos³¹.

Atualmente, mais do que 2 bilhões de pessoas no mundo sofrem pela deficiência de micronutrientes. Nos Estados Unidos, 10 a 20 % da população consomem menos do que 50 % da ingestão diária recomendada de ácido fólico e vitaminas B₆, C e E³². Desta forma, visando à prevenção de doenças causadas pela deficiência de folatos, principalmente defeitos do fechamento do tubo neural, muitos países tem estabelecido a obrigatoriedade da fortificação de certos alimentos com ácido fólico.

O ácido fólico sintético tem uma maior biodisponibilidade que os folatos naturais, os quais apresentam uma biodisponibilidade aproximada de 50%²⁴. Esta menor biodisponibilidade dos folatos naturais está relacionada a vários fatores como: a estrutura química, o tamanho da cadeia poliglutâmica, matriz alimentícia, fatores genéticos da população, entre outros.

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 frequentemente escolhido tem sido a farinha de trigo²⁴.

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 0,35-0,45mg/Kg, no México 2,0mg/Kg e na Costa Rica 1,5mg/Kg²⁴. Em 1998, a fortificação obrigatória de produtos de cereais em grãos teve início nos Estados Unidos com 1,40mg/Kg de produto²⁹ e no mesmo ano no Canadá com teores mínimos de 1,5mg/Kg de farinha de trigo³³, enquanto que no Chile começou em 2002 utilizando-se 2,20mg/Kg de farinha de trigo.

No Brasil a fortificação tornou-se obrigatória a partir de junho de 2004 com a publicação da RDC n. 344, que determinou que as farinhas de trigo e de milho deveriam conter 150µg de ácido fólico para cada 100g de farinha⁹. Na Europa, apesar de reconhecerem os benefícios e a importância dos folatos para a saúde humana, a fortificação não é obrigatória, e em alguns países somente voluntária.

Efeitos adversos de altas doses de ácido fólico podem ocorrer se for ingerida uma quantidade superior a 1mg folato por dia para adultos e de 300 a 800µg/dia para crianças. Estas altas concentrações podem mascarar a detecção da deficiência de vitamina B₁₂². Desta forma, alguns autores sugerem a fortificação conjunta de ácido fólico e vitamina B₁₂.

Depois do início da fortificação obrigatória das farinhas nos Estados Unidos, os níveis médios de folato no soro sanguíneo em mulheres não grávidas mas 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% e no Chile cerca de 70%³⁰, sendo cerca de 44% no México³⁴. 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%²⁷.

Metodologia analítica

Os métodos para análise de ácido fólico podem ser agrupados em métodos biológicos, químicos, bio-específicos (imunoenzimático e radioimunoensaio), microbiológicos e cromatográficos, sendo que os dois últimos são os mais utilizados⁷. O método reconhecido oficialmente para análise de folatos é o ensaio microbiológico que se baseia na relação quantitativa entre o conteúdo de folato e o crescimento do microrganismo³⁵.

Os procedimentos bio-específicos podem apresentar algumas vantagens sobre o ensaio microbiológico e cromatográfico, porém são pouco utilizados. Eles são mais rápidos, de baixo custo, apresentam procedimento simples com pouco preparo de amostras. O radioimunoensaio é adequado para a análise de material biológico, porém apresenta restrita aplicação para alimentos³⁶.

Ensaio microbiológico

O ensaio microbiológico baseia-se na medida de turbidez da solução³⁷. O crescimento do microrganismo depende

da quantidade de folato presente na amostra, sendo que este crescimento é proporcional a turbidez do meio. Este ensaio requer equipamentos de baixo custo, determina a quantidade total de folatos e é muito sensível. Por outro lado, pode ocorrer reação cruzada, isto é, algumas substâncias presentes podem estimular ou inibir o crescimento do microrganismo, além de ser demorado e necessitar de pessoa experiente para o manuseio da amostra e do microrganismo, para garantir a qualidade e reprodutibilidade dos resultados analíticos⁷.

Os microrganismos usados são *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus hirae* e *Pediococcus acidilactici*. *Streptococcus faecalis* (*E. hirae*) (ATCC 8043) foi inicialmente o mais comum, porém como ele não responde para as formas metiladas, normalmente presentes nos alimentos, foi substituído pelo *L. rhamnosus* (*L. casei*) (ATCC 7469). O *Enterococcus hirae* é utilizado para quantificar somente a forma livre do ácido fólico, aplicando-se para a análise desta vitamina em alimentos fortificados sem pré-digestão enzimática³⁸.

Para a análise de folatos totais nos alimentos, normalmente se emprega o ensaio microbiológico com *L. rhamnosus* (*L. casei*) (ATCC 7469) com diferentes processos de digestão enzimática¹⁶. A resposta de *L. rhamnosus* para folatos naturais diminui com o aumento da cadeia poliglutâmica³⁹, sendo que ele responde igualmente de mono a triglutamatos. Atualmente o processo de digestão trienzimático, que consiste do tratamento seqüencial da matriz alimentícia com protease e α -amilase antes da adição da conjugase, está sendo utilizado na etapa de extração⁴⁰. A protease e a α -amilase são utilizadas para digerir a matriz alimentícia e liberar os folatos, enquanto que a conjugase promove a hidrólise dos poliglutamatos para mono ou diglutamatos¹⁶.

A etapa de extração, como para as demais técnicas analíticas, é um dos pontos mais críticos para a exatidão e precisão dos resultados. Condições do pH do meio reacional, diluição das soluções, temperaturas de aquecimento para obtenção de condições assépticas para incubação, seqüência de adição das enzimas durante o processo de digestão, temperatura de incubação, entre outros, são fatores que podem influenciar significativamente os resultados obtidos. A combinação ideal das enzimas e condições reacionais pode variar dependendo da composição da matriz alimentícia⁴¹.

A introdução de microplacas ao invés dos tubos de ensaio para incubação e medida de absorbância em leitora de placas tem apresentado vantagens quando comparado com o procedimento convencional, como diminuição no uso de reagentes, redução do tempo analítico para pipetagem e leitura de turbidez e maior sensibilidade⁷.

Método cromatográfico

O método cromatográfico, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a separação dos diferentes isômeros de folatos e a quantificação individual de cada um. Este método pode ser altamente específico, confiável e requer menos tempo do que o ensaio microbiológico, porém

requer equipamento mais caro e apresenta menor sensibilidade. Utiliza-se a cromatografia em fase reversa com detectores de ultravioleta ou de massas, uma vez que o ácido fólico não apresenta fluorescência natural, e de fluorescência ou de massas para os folatos naturais⁴².

A maioria dos métodos utilizando CLAE que tem sido desenvolvido para a análise de folatos naturais, determinam os folatos na forma de monoglutamatos, porém não se tem um procedimento padronizado para a hidrólise dos poliglutamatos e as diferentes formas de preparo da conjugase diferem em origem, atividade, pH e produtos finais da hidrólise³⁷. No caso do ácido fólico adicionado não é necessária a etapa de hidrólise, uma vez que ele já ocorre na forma de monoglutamato.

Vários métodos utilizando CLAE tem sido desenvolvidos para análise de ácido fólico e outros folatos em alimentos^{8,9,14,40,43-53}.

A extração do ácido fólico a partir da matriz alimentícia é uma etapa bastante crítica para a garantia da qualidade dos resultados experimentais. A extração desta vitamina tem sido feita com solução tampão pH 8-9 seguida por digestão com α -amilase⁸, ou inicialmente com solução de hidróxido de potássio, seguida de ácido tricloroacético e tampão fosfato pH 6,0⁴⁷, ou solução tampão fosfato pH 6,0 e hidrólise com conjugase^{44,51} ou ainda tampão fosfato pH 4,2 e digestão trienzimática⁵². Alguns métodos utilizam solução tampão Hepes/Ches e digestão enzimática, com adição de ascorbato e mercaptoetanol para aumentar a estabilidade dos folatos naturais^{9,14,45}. Pietro et al.⁵³ utilizaram coluna de extração em fase sólida C18 para a etapa de extração de ácido fólico a partir de amostras de bebidas fortificadas.

Após a extração, pode-se fazer uma limpeza dos extratos utilizando extração em fase sólida, sendo que a coluna mais utilizada para esta finalidade é a coluna de extração em fase sólida fortemente aniônica (SAX)^{8,22,44}. Alguns autores utilizam colunas de imunoafinidade^{9,14,45,48}.

A separação do ácido fólico geralmente é realizada em fase reversa utilizando coluna C18 e eluição isocrática com pareamento de íons⁸ ou gradiente usando como fase móvel uma mistura de acetonitrila e ácido acético^{40,47}, ou acetonitrila e tampão fosfato^{9,14,22,44}, ou metanol e acetato de amônio⁵³, ou acetonitrila e tampão fosfato com pareamento de íons⁴⁶. A fase móvel mais utilizada em eluição por gradiente é uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato pH < 3. A detecção normalmente é feita na região eletromagnética do ultravioleta a 280^{8,52} ou 290 nm^{9,22,44}.

Alguns métodos utilizando detector de massas (CLAE-MS) têm sido descritos. Thomas et al.⁵⁴ desenvolveram um método para análise de ácido fólico em sucos cítricos e Pawlosky et al.⁴⁹ usaram esta técnica para a análise de cereais matinais fortificados com ácido fólico e de pães⁵⁰. Apesar do uso desta técnica mais específica, os autores utilizam extração em fase sólida para limpeza dos extratos, antes da análise cromatográfica. Patring et al.³⁸ concluíram que a técnica CLAE-MS apresenta melhor sensibilidade e especificidade do que o detector de UV.

Embora a técnica de CLAE apresente alto potencial para análise de folatos em alimentos, verifica-se algumas limitações, como a rigorosa limpeza da amostra antes da análise. O emprego de colunas de afinidade ou de troca iônica parece promissor, mas ainda deve ser testado e avaliado por comparação com o método microbiológico⁷.

Ensaios de proficiência

Muitos pesquisadores têm reportado boa correlação entre os resultados por CLAE e ensaio microbiológico, em alguns casos foi observado que os valores obtidos por CLAE são inferiores (cerca de 50%) aos do ensaio microbiológico⁵⁵. Estes resultados foram similares aos observados num ensaio interlaboratorial que observou que os resultados provenientes do CLAE são cerca de 30 a 40% menores que do ensaio microbiológico⁵⁶.

Num ensaio interlaboratorial usando materiais de referência de cereal matinal, peixe em pó e farinha de soja verificou-se que os coeficientes de variação para 26 laboratórios variaram de 24 a 35%. Os autores concluem que esta alta variação está relacionada a variedade de métodos utilizados, como ensaio microbiológico, CLAE-UV, CLAE-MS, bem como, diferentes técnicas de extração⁵⁶.

CONCLUSÕES

O ácido fólico (ácido pteroilglutâmico) é uma vitamina do complexo B, denominado vitamina B₉. Muitos estudos têm demonstrado que o uso pré-conceptivo desta vitamina reduz os DFTN, como a espinha bífida e a anencefalia. Recomenda-se uma suplementação diária de ácido fólico de 400µg para mulheres em idade fértil. A fortificação de alimentos com ácido fólico tem sido uma maneira segura e eficiente para se alcançar estes teores desta vitamina pela alimentação.

A oficialização de um método seguro, rápido, preciso e validado é fundamental para o monitoramento de alimentos fortificados, visando a obtenção dos benefícios para a saúde da população.

REFERÊNCIAS

1. Scrimshaw NS. La fortificación de alimentos: una estrategia nutricional indispensable. *An Venez Nutr* 2005, 18(1): 64-8.
2. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. 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. *Am J Clin Nutr* 2005, 82:442-50.
3. Brasil. Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante no anexo desta resolução. Diário Oficial da República federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de dezembro de 2002.
4. Jastrebova J, Witthöff C, Grahn A, Svensson U, Jägerstad M. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chemistry* 2003, 80(4): 579-88.
5. Lima, JA. Folatos em vegetais – influência do tipo de cultivo e do processamento. [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP, 2005. p 84
6. Hoffbrand AV, Weir DG. The history of folic acid. *Br J Haematol* 2001, 113(3): 579-89.
7. Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 2005, 16: 253-66.
8. Osseyi ES, Wehling RL, Albrecht JA. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. *J Chromatogr A* 1998, 826: 235-40.
9. Gujska E, Kuncewicz A. Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in Poland using trienzyme extraction and high-performance liquid chromatography methods. *Eur Food Res Technol* 2005, 221: 208-13.
10. Johansson M, Jastrebova J, Grahn A, Jägerstad M. Separation of dietary folates by gradient reversed-phase HPLC: comparison of alternative and conventional silica-based stationary phases. *Chromatographia* 2005, 62(1/2): 33-40.
11. Poe M. Acidic dissociation constants of folic acid, dihydrofolic acid, and methotrexate. *J of Biol Chem* 1977, 252(11): 3724-8.
12. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004, 63(4): 529-36.
13. Saulberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor RC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987, 46: 1016-28.
14. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997, 66: 1388-97.
15. Finglas PM, 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 Chem* 1999, 64: 245-55.
16. De Vries JW, Rader JL, Keagy PM, Hudson CA. Microbiological assay-tri-enzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: collaborative study. *J AOAC International* 2005, 88(1):5-15.
17. Rader JI, Weaver CM, Angyal G. Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chem* 1998, 62(4): 451-65.

18. Chun J, Martin JA, Chen L, Lee J, Ye L, Eitenmiller RR. A differential assay of folic acid and total folate in foods containing enriched cereal-grain products to calculate μg dietary folate equivalents. *J Food Compos Anal* 2006, 19: 182-7.
19. Muskiet, FAJ. The importance of (early) folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. *Reprod Toxicol* 2005, 20: 403-10.
20. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Méd Lab* 2004, 40(5): 311-20.
21. Sachdev P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. *Rev Bras Psiquiatr* 2004, 26(1): 50-6.
22. Patring JDM, Jastrebova JA, Hjortmo SB, Andlid TA, Jägerstad IM. Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection, *J Agric Food Chem* 2005, 53(7): 2406-11.
23. Lucock, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab* 2000, 71: 121-38.
24. Martinez ABO, Berruezo GR, Cava MJB, Gracia CM, Caston MJP. Estimacion de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico em alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2005, 55(1): 5-14.
25. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and coline. Washington DC: National Academy Press; 2000.
26. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ANVISA. RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.
27. Santos LMP, Pereira MZ. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Cad Saúde Pública* 2007, 23(1): 17-24.
28. Buttriss, J. Strategies designed to increase awareness about folates and health, and to increase folate intake: A review. *Trends Food Sci Technol* 2005, 16: 246-52.
29. CDC, Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades. La prevencion de los defectos del tubo neural com ácido fólico. http://www.cdc.gov/ncbddd/Folicacid/documents/NTDesp_OPS.pdf, consultado em 23/04/07.
30. Maberly GF, Stanley FJ. Mandatory fortification of flour with folic acid: an overdue public health opportunity. *J Australian* 2005, 183(7): 342-3.
31. Romano OS, Waitzman NJ, Scheffler RM, Pi RD. Folic acid fortification of grain: an economic analysis. *Am J Public Health* 1995, 85: 667-76.
32. Liberato SC, Pinheiro-Sant'ana HM. Fortification of industrialized foods with vitamins. *Rev Nutr* 2006, 19(2): 215-31.
33. Nathoo T, Holmes CP, Ostry A. An analysis of the development of Canadian food fortification policies: the case of vitamin B. *Health Promot Int* 2005, 20(4): 375-82.
34. Kondo A, Kamihira O, Gotoh M, Ozawa H, Lee TY, Lin ATL et al. Folic acid prevents neural tube defects: International comparison of awareness among obstetricians/gynecologists and urologists. *J Obstet Gynaecol Res* 2007, 33(1): 63-67.
35. Patring JDM, Jastrebova JA. Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity. *J Chromatogr A* 2007, 1143: 72-82.
36. Arcot J, Shrestha AK, 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* 2002, 13: 245-252.
37. Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G et al. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br J Nutr* 2001, 86: S5-S35.
38. Deutsch, M.J. Vitamin and Other Nutrients: Microbiological Methods. In: *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 16th edition, Maryland, 1997.
39. Goli DM, Vanderslice JT. Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate. *Food Chem* 1992, 43: 57-64.
40. Pandrangi S, LaBorde LF. Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach. *International Journal of Food Science and Technology* 2004, 39: 525-32.
41. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis: optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatments. *J Nutr Sci Vitaminol* 1998, 44: 361-370.
42. Almeida-Muradian LB, Penteadó MVC. Vitamina A. In: Penteadó, MVC. (Ed) *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*, Manole; 2003, cap 132, 487-524.
43. Day BP, Gregory III JF. Determination of folacin derivatives in selected foods by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1981, 29: 374-7.
44. Vahteristo L, Ollilainen V, Koivistoinen PE, Varo P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1996, 44: 477-82.
45. Konings EJM. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *J AOAC Int* 1999, 82(1): 119-127.

46. Breithaupt DE. Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after solid-phase extraction. *Food Chem* 2001, 74: 521-5.
47. Catharino, RR; Godoy, HT. Otimização da determinação de ácido fólico em leites enriquecidos através da análise de superfície de resposta. *Cienc Tecnol Aliment* 2001, 21(3): 326-9.
48. Kariluoto MS, Vahteristo LT, Piironen VI. Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance chromatography (HPLC) in studying folate in rye. *J Sci Food Agric* 2001, 81: 938-42.
49. Pawlosky RJ, Flanagan VP. A quantitative stable-isotope LC-MS method for the determination of folic acid in fortified foods. *J Agric Food Chem* 2001, 49: 1282-6.
50. Pawlosky RJ, Hertrampf E, Flanagan VP, Thomas PM. Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile. *J Food Comp Anal* 2003, 16: 281-6.
51. Johansson M, Witthöff CM, Bruce A, Jägerstad M. Study of wheat breakfast rolls fortified with folic acid. *Eur J Nutr* 2002, 41: 279-86.
52. Johnston KE, Tamura T. Folate content in commercial white and whole wheat sandwich breads. *J Agric Food Chem* 2004, 52: 6338-40.
53. Pietro SP, Grande BC, Falcon SG, Gandara JS. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food Control* 2006, 17: 900-4.
54. Thomas PM, Flanagan VP, Pawlosky RJ. Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in citrus juices using stable isotope dilution-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003, 51: 1293-6.
55. Ginting E, Arcot J. High performance liquid chromatographic determination of naturally occurring folates during preparation. *J Agric Food Chem* 2004, 52: 7752-8.
56. Puwastien P, Pinprapai N, Judprasong K, Tamura T. International inter-laboratory analyses of food folate. *J Food Comp Anal* 2005, 18(5): 387-97.