



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos
Pós-graduação em Ciência de Alimentos



ÁCIDO FÓLICO EM ACHOCOLATADOS

Daniela de Queiroz Pane

Engenheira de Alimentos

Prof^ª. Dra. Helena Teixeira Godoy

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a
obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P192a Pane, Daniela de Queiroz
Ácido fólico em achocolatados / Daniela de Queiroz Pane --
Campinas, SP: [s.n], 2007.

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

1. Ácido fólico. 2. Achocolatados. 3. Cromatografia líquida de
alta eficiência (CLAE). 4. Validação. I. Godoy, Helena Teixeira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Folic acid in powder chocolate

Palavras-chave em inglês (Keywords): Folic acid, Chocolate – Powders, High Performance
Liquid Chromatography (HPLC), Validation

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Juliana Azevedo Lima-Pallone

Marcelo Alexandre Prado

Regina Prado Zanes Furlani

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Orientadora)

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima-Pallone
(Membro)

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
(Membro)

Profa. Dra. Regina Prado Zanes Furlani
(Membro)

Agradeço...

A Deus, por me guiar todas as vezes que estava sem direção.

Dedico...

Aos meus pais Ione e Edgar pela oportunidade da vida, pelo apoio e pela compreensão em muitas das minhas ausências.

Ofereço...

Ao meu marido Flávio Augusto Franco, que chegou a tempo de acompanhar tudo de perto, proporcionar os melhores dias de minha vida e fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia.

Reflexões

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida
e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas
que passam por suas vidas.
O futuro mais brilhante é baseado num passado
intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e
as decepções do passado.
A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram
uma eternidade...

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À minha querida avó **lassy**, por todos os momentos de minha infância, além do carinho e paciência desde os meus primeiros dias de vida.

À prof^a **Helena Godoy** por sua paciência em me orientar, pela busca constante do aprimoramento deste trabalho enquanto este ainda era apenas um sonho e, principalmente, pela sua amizade.

À prof^a **Maria Aparecida Mauro**, a grande responsável pelo começo de tudo.

Às amigas **Cíntia, Michelle, Giovanna, Natália e Lísia** por tornarem esses dois anos mais prazerosos e cheios de aventuras.

À **Elizete**, por me ensinar a conversar com o HPLC, principalmente em períodos de crise.

À **Ciça, Cláudia, Roger, Scherer e Carol**, pela divisão da alegria no laboratório.

A todos os **amigos** que estão distantes mas sempre presentes - vocês ajudaram na realização deste trabalho sem nem mesmo estarem cientes disso.

Aos membros da **banca examinadora**, pelas observações e sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório **Gislaine, Cristina e Dirceu**, por todo apoio e ajuda prestados.

Aos funcionários da **secretaria do Depto. de Ciência de Alimentos** e da **secretaria de Pós-Graduação** por todo auxílio.

À **CAPES** pelo financiamento concedido para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada,

Daniela de Queiroz Pane

ÍNDICE

Resumo geral	viii
General summary	ix
Introdução geral	01
Referências bibliográficas	02

CAPÍTULO I

FOLATOS, ÁCIDO FÓLICO E ALIMENTOS ENRIQUECIDOS: UMA REVISÃO

03

Resumo	03
Abstract	03
Introdução	05
Mecanismo de absorção	07
Biodisponibilidade	08
Carência e ingestão recomendada	09
Segurança	11
Fontes de folatos	12
Estabilidade	13
Enriquecimento de alimentos	14
Achocolatados	16
Referências bibliográficas	16

CAPÍTULO II

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM ACHOCOLATADOS ENRIQUECIDOS

19

Resumo	19
Abstract	20
Introdução	22
Materiais e métodos	23

Produtos avaliados	23
Reagentes	23
Equipamento	23
Determinação do ácido fólico	24
Validação do método	26
Recuperação dos padrões	26
Repetibilidade	26
Limites de detecção e quantificação	26
Resultados e discussão	27
Validação da metodologia	27
Conclusões	31
Referências Bibliográficas	31

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM ACHOCOLATADOS ENRIQUECIDOS	33
Resumo	33
Abstract	34
Introdução	35
Materiais e métodos	36
Produtos avaliados	36
Reagentes	36
Equipamento	36
Determinação do ácido fólico	36
Análise estatística	37
Resultados e discussão	38
Conclusões	44
Referências bibliográficas	44
Conclusões Gerais	46

RESUMO GERAL

As vitaminas são classificadas de acordo com suas características físico-químicas em hidrossolúveis e lipossolúveis. O grupo de vitaminas classificadas como hidrossolúveis é representado pelas vitaminas do complexo B e vitamina C. Entre as vitaminas do complexo B destaca-se, hoje, o ácido fólico (AF), também chamado de vitamina B₉, B₁₂ ou M, o qual tem sua estabilidade afetada, assim como a maioria das vitaminas, quando o alimento é submetido a diferentes formas de processamento, armazenamento ou cozimento. A carência em ácido fólico está relacionada a diversos problemas, tais como falhas na formação do tubo neural em fetos e anemia. Deste modo, o enriquecimento de alimentos com esta vitamina vem ganhando cada vez mais espaço, tendo em vista uma forma de prevenir doenças decorrentes de sua carência e ainda agregar valor aos produtos. Sendo assim, torna-se necessário um método rápido, simples e eficiente para detectar e quantificar o ácido fólico existente em produtos enriquecidos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de ácido fólico em achocolatados enriquecidos. Para tanto utilizou-se uma coluna C₁₈ como fase estacionária e solução acidificada com ácido acético/acetonitrila como fase móvel, em uma corrida de 11 minutos, com detecção realizada a 290 nm. A metodologia empregada apresentou taxas de recuperação de 103 e 108%, além de boa repetibilidade. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 0,25 e 0,50 µg/g. A análise dos dados demonstrou que algumas amostras apresentaram quantidades representativas da vitamina, mesmo sem esta informação ser declarada em seu rótulo. Para os achocolatados em pó o teor de AF variou de 50,2 a 305,0 µg/100g, e para os líquidos, desde não detectável até 94,0 µg/100g. Das três amostras com informação nutricional quanto ao ácido fólico, duas demonstraram conformidade com a tal, a outra apresentou quantidades da vitamina abaixo do informado. A análise entre os lotes de uma mesma amostra demonstrou problemas, uma vez que os lotes apresentaram diferenças significativas entre si.

GENERAL SUMMARY

The vitamins may be divided into a water-soluble group and a fat-soluble group. The group of water-soluble vitamins is represented by vitamins of the B group and vitamin C. Between vitamins of the B group is distinguished, today, the folic acid (FA), also known as vitamin B₉ or M, which has its affected stability, as well as the majority of vitamins, when the food is submitted to the different forms of processing, storage or baking. The lack of folic acid is related to diverse problems, such as congenital malformations as spina bifida and other neural tube defects. In this way, the food enrichment with this vitamin comes gaining each time more space, in view of one way to prevent illnesses decurrent of its lack and still to add value to the products. Being thus, a fast, simple and efficient method becomes necessary to detect and to quantify the folic acid present in enriched products. The main of this work was to develop and to validate a method for high performance liquid chromatography (HPLC) for folic acid determination in enriched powder and liquid chocolate drink. For in such a way a C18 column was used as stationary phase and water solution acidified with acetic acid/acetonitrile as mobile phase, in a chromatographic race of 11 minutes, with the detection in UV carried through the 290 nm. The quantification was made by external standardization. The employed methodology presented a recovery of 103 to 108%, beyond good repeatability. The limits of detection and quantification had been, respectively, 0,25 and 0,50 µg/g. The analysis of the data demonstrated that some samples had presented representative amounts of the vitamin. For powder chocolate the level of FA varied from 50,2 to 305,0 µg/100g, and in the chocolate drink, since not detectable to 94,0 µg/100g. Of the three samples with nutritional information how much to the folic acid, two had demonstrated conformity with the such, to another one it presented amounts of the vitamin below of the informed one. The analysis enters the lots of one same sample demonstrated problems, a time that the lots had presented significant differences between itself.

INTRODUÇÃO GERAL

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 mantermos os processos vitais, razão pela qual também podem ser chamadas de micronutrientes. Não sendo sintetizadas pelo homem é necessário obtê-las da dieta a fim de se evitar doenças decorrentes de sua falta. A probabilidade de que o alto consumo de certas vitaminas pode oferecer proteção contra o câncer tem recebido especial interesse há duas décadas, quando começou a existir um consenso entre os cientistas de que a dieta pode ter influência substancial no desenvolvimento de câncer em humanos (POPPEL, 1997).

A descoberta dos folatos data da década de 30, quando este foi reconhecido como um fator presente em preparações com leveduras, capaz de curar a anemia megaloblástica que ocorria entre mulheres hindus na Índia, principalmente durante a gravidez. Em 1941 foi descrito um composto necessário à nutrição da bactéria *Lactobacillus casei*, o qual foi chamado de fator “L. casei” (MITCHELL *et al.*, 1941).

Neste mesmo ano isolou-se um composto cristalino da folha do espinafre, o qual foi chamado de ácido fólico, uma vez que “folium” quer dizer “folha” (LUCOCK, 2000). A partir daí vários pesquisadores contribuíram para o isolamento e elucidação de sua estrutura, na forma como é hoje conhecida.

Os folatos participam de dois processos biológicos importantes: o ciclo de metilação, que consiste na transferência de carbonos e a biossíntese do DNA, fundamental para a manutenção das células. A deficiência em folatos pode ocasionar acúmulo de homocisteína no plasma sanguíneo, a qual está associada a doenças cardiovasculares, além de falhas na formação do tubo neural de fetos, dentre outras moléstias (GREGORY, 1989; HAWKES & VILLOTA, 1989; AUSTIN *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2004).

O enriquecimento de alimentos é uma forma barata, prática e efetiva utilizada pela indústria de alimentos voluntariamente ou frente às exigências

governamentais para garantir a ingestão diária da quantidade recomendada de ácido fólico (LUCOCK, 2000).

No Brasil, a Resolução RDC nº 324, 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 2002. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver 150µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2005).

Sendo os achocolatados largamente consumidos pela população brasileira, torna-se necessário um modo de avaliar as quantidades declaradas nos rótulos destes produtos enriquecidos, como forma de verificar se a ingestão diária recomendada tem sido atingida.

Assim, o objetivo deste trabalho foi adaptar ou desenvolver e aplicar um método para análise de achocolatados enriquecidos com ácido fólico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. L., JENSEN, K. R., CARLQUIST, J. F., BAIR, T. L., HORNE, B. D., MUHLESTEIN, J. B. Effect of folic acid fortification of food on homocysteine-related mortality. **The Am. J. of Med.**, v. 116, p. 158 – 164, 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fortificação de farinhas. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 16/11/2006.
- AUSTIN, R. C., KONING, A. B. L., WERSTUCK, G. H., ZHOU, J. Hypermocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. **Clin. Biochem.**, v. 36, p. 431 – 441, 2003.
- GREGORY III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research analytical procedures, methods of folates synthesis, stability and bioavailability of dietary folate. **Ad. In Food and Nutr. Res.**, v. 33, p. 1-101, 1989.
- HAWKES, J. G., VILLOTA, R. Folates in food: reactivity, stability during processing and nutritional implications. **Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.**, v. 28, n. 6, p. 439-539, 1989.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Mol. Gen. Met.**, v. 71, p. 121-138, 2000.
- POPPEL, G. V., VAN DEN BERG, H. Vitamins and cancer. **Cancer Letters**, v. 114, p. 195 – 202, 1977.

FOLATOS, ÁCIDO FÓLICO E ALIMENTOS ENRIQUECIDOS: UMA REVISÃO

Pane, D. Q.¹ e Godoy, H. T.¹

**1. Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp
dqpane@yahoo.com.br**

RESUMO

Este trabalho apresenta uma revisão sobre o ácido fólico, uma importante vitamina do complexo B. Os folatos, compostos com estrutura química e atividade biológica semelhante a do ácido fólico estão envolvidos em diversas reações metabólicas importantes, sendo fundamental para o bom funcionamento do organismo. Sua carência tem sido associada a males como doenças cardiovasculares, falhas na formação do tubo neural em fetos, mal de Alzheimer e problemas neurológicos. Na tentativa de se evitar estas e outras moléstias decorrentes da carência desta vitamina, tem-se utilizado o enriquecimento de alimentos. Alguns países já adotaram a obrigatoriedade da adição desta vitamina em alimentos como cereais matinais, pães, farinhas, leite e seus derivados. Um grande desafio está no levantamento da ingestão desta vitamina pelos vários segmentos da população mundial, já que a base para esses estudos depende, diretamente, do conhecimento do teor dos folatos nos mais diferentes tipos de alimentos. Para tal, vários estudos sobre diferentes metodologias de análise estão sendo publicados na literatura, no sentido de assegurar a obtenção de dados confiáveis sobre a presença, forma e quantidade dos folatos presentes.

ABSTRACT

This work presents a revision on the folic acid, an important vitamin of the B water-group vitamin. The folates, composites with chemical structure and similar biological activity of the folic acid, are involved in diverse important metabolic reactions, being basic for the good functioning of the human organism. Its lack has

been associated males as cardiovascular illnesses, congenital malformations of the neural pipe, Alzheimer's disease, and other problems. In the attempt of if preventing these and other decurrent diseases of the lack of this, vitamin has used the food enrichment. Some countries already had adopted the obligatoriness of the addition of this vitamin in foods as breakfast cereals, breads, flours, milk and its derivatives. A great challenge is in the survey of the ingestion of this vitamin for the some segments of the world-wide population, since the base for these studies depends, directly, of the knowledge of the levels of the folates in the most different types of foods. For such, some studies on different methodologies of analysis are being published in literature, in the direction to assure the attainment of trustworthy data on the presence, form and amount of the folates levels.

INTRODUÇÃO

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, do complexo B, também chamada de vitamina B_C, B₉ ou M. É formado por um anel de pteridina, uma molécula de ácido para-aminobenzóico e uma de L-glutamato, conforme **Figura 1**.

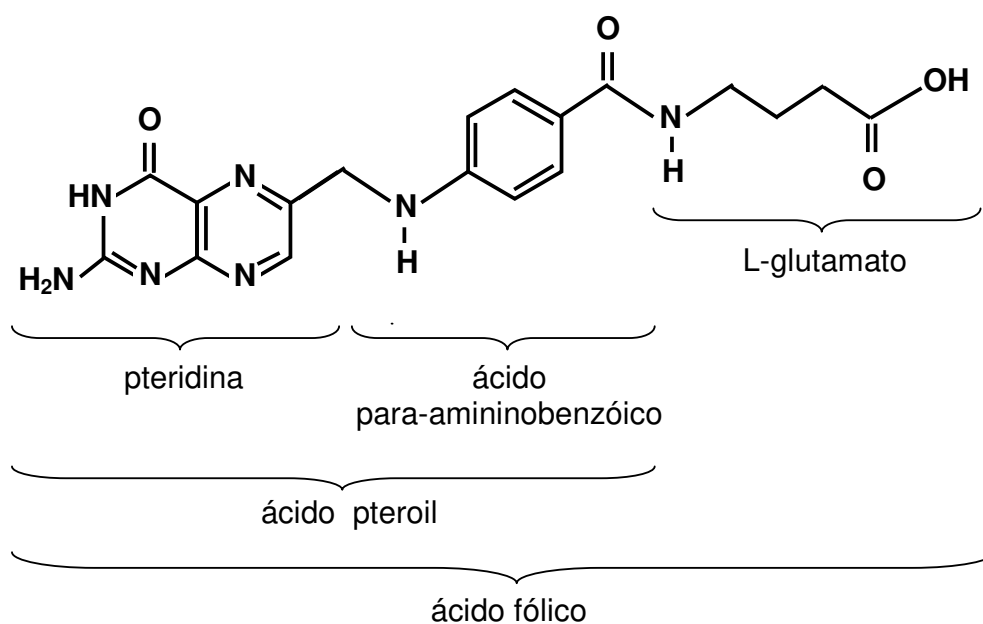


FIGURA 1 – Estrutura química do ácido fólico.

Aos compostos com estrutura e atividade semelhantes ao ácido fólico dá-se o nome de folatos. Estes são naturalmente encontrados em alimentos, em geral na forma reduzida, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico. Sendo assim, o termo folatos é utilizado para designar todos os membros da mesma família de compostos semelhantes quimicamente, nos quais o ácido pteroilglutâmico se liga a uma ou mais unidades de L-glutamato (GREGORY III, 1998).

Sendo o ácido fólico a estrutura básica dos folatos, estes encontram-se sob diferentes formas na natureza, conforme mostra a **Figura 2**.

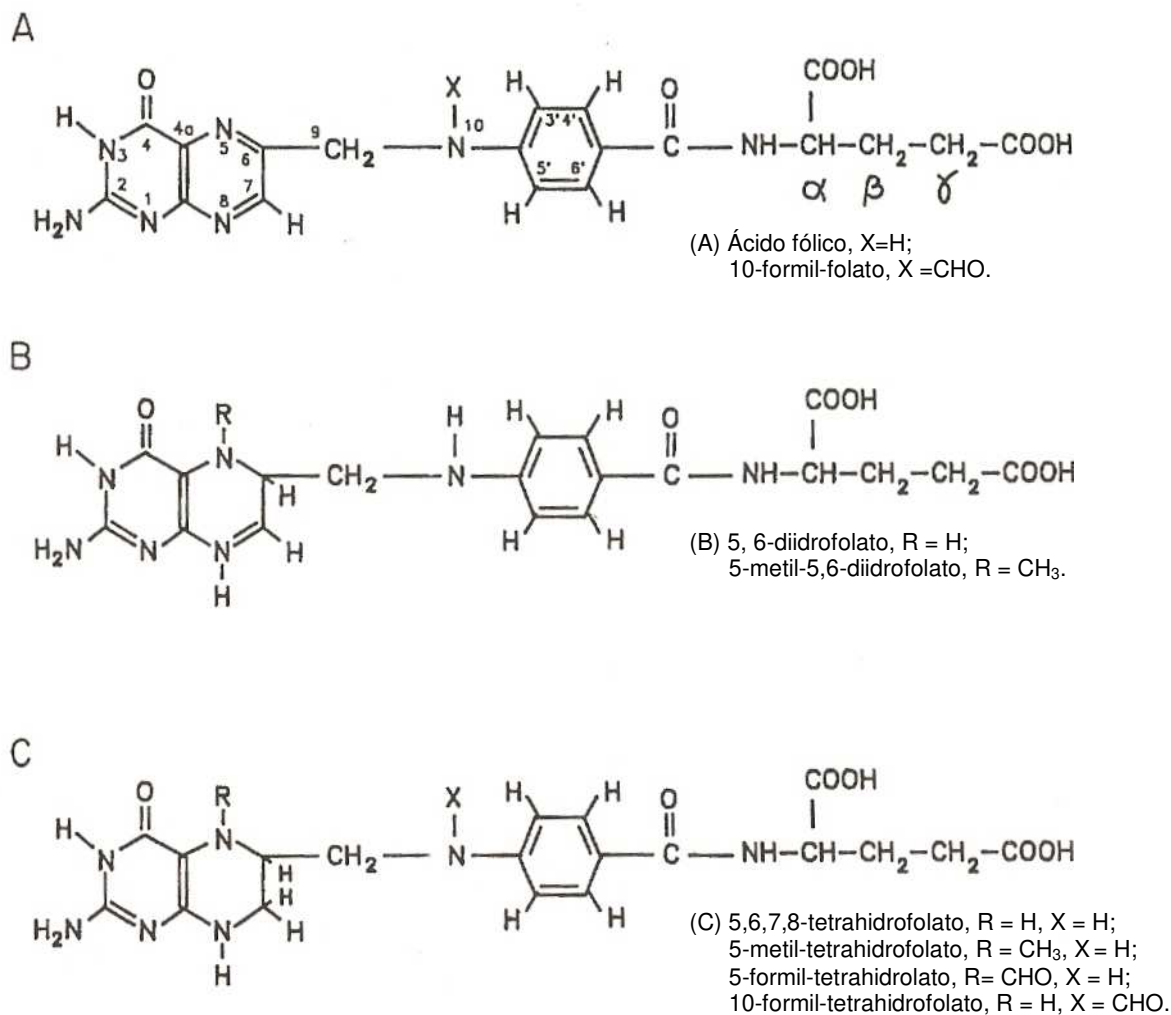


FIGURA 2 – Estruturas dos folatos (Fonte: GREGORY III, 1989).

A reatividade e a solubilidade dos folatos os torna susceptíveis a grandes perdas durante o processamento, armazenamento e cozimento dos alimentos. Sua estabilidade química é afetada principalmente pelo pH, calor, exposição ao oxigênio e intensidade da luz. Além disso, por ser uma vitamina hidrossolúvel, ocorrem perdas devido principalmente à lixiviação em alimentos cozidos (LIMA, 2005).

Mecanismo de absorção

O ácido fólico é geralmente bem absorvido pelo organismo. Entretanto, o processo de conversão para a forma de coenzima metabolicamente ativa é relativamente complexo. Inicialmente, o ácido fólico é desconjugado nas células da parede intestinal para a forma de monoglutamato. No fígado, este composto é reduzido à diidrofolato e então à tetraidrofolato através de um complexo enzimático que depende da presença de niacina para realizar a conversão. O tetraidrofolato, juntamente com a serina origina 5,10-metileno-tetraidrofolato e glicina. Em seguida, outro complexo enzimático transforma o 5,10-metileno-tetraidrofolato em 5-metil-tetraidrofolato, forma utilizada na re-metilação da homocisteína. Após a formação da forma ativa da coenzima esta é secretada juntamente com a bile no intestino delgado, sendo então reabsorvido e distribuído às células do organismo (GREGORY, 1998).

A **Figura 3** mostra o mecanismo de absorção da vitamina no organismo.

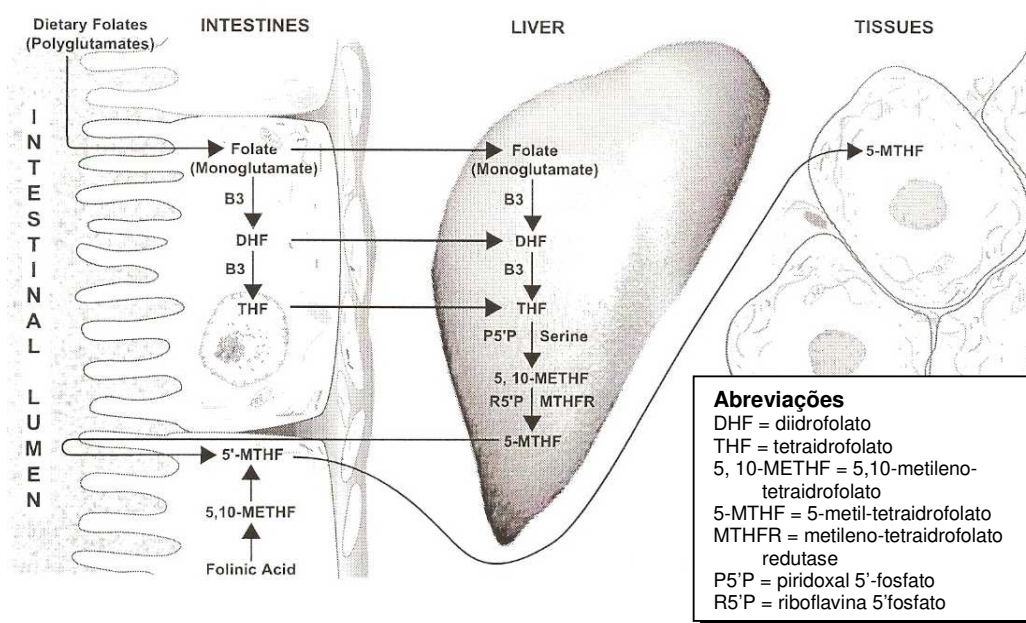


FIGURA 3 – Absorção e ativação do ácido fólico (Fonte: GREGORY, 1998).

Nas células, os folatos atuam como coenzima nas reações de transferência de carbono em dois principais ciclos: biossíntese do DNA e ciclo de metilação, conforme mostra a **Figura 4**.

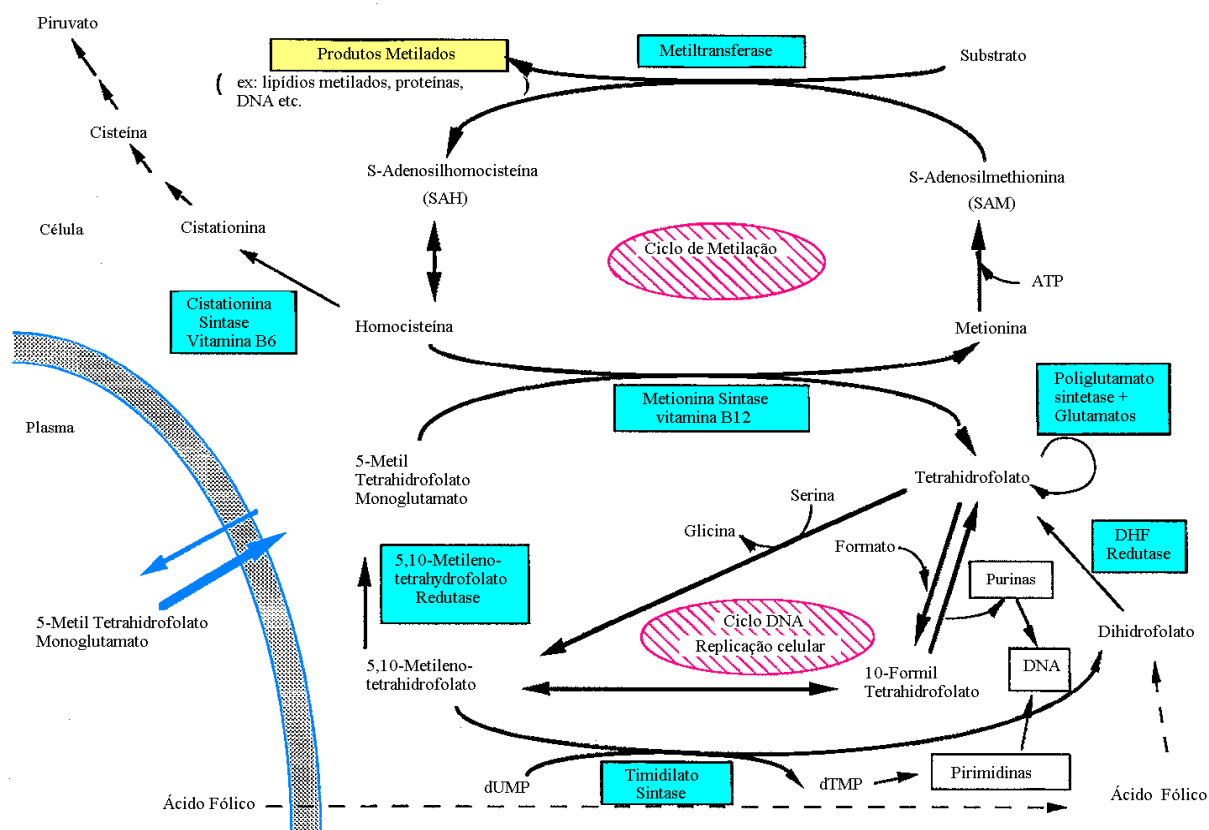


FIGURA 4 – Vias metabólicas dos folatos (Fonte: SCOOT *et. al.*, 2000).

Biodisponibilidade

Pode ser definida como sendo a porção ingerida a qual é absorvida no intestino delgado e que pode ser utilizada nos processos metabólicos e de armazenamento do organismo (GREGORY, 1997).

Diversos fatores afetam a biodisponibilidade, dentre os quais podem-se destacar: a estrutura química do folato, as ligações da cadeia glutâmica (quanto maior a cadeia, menos biodisponível), a matriz do alimento, efeitos modificadores

(determinados compostos, ingeridos juntamente com a vitamina, podem atrapalhar a absorção da mesma), além de fatores genéticos (MARTÍNEZ, *et al.*, 2005).

Dos folatos presentes em alimentos, o 5-metiltetraidrofolato é o mais abundante, além de apresentar uma biodisponibilidade relativa de 38%, contra 24% do ácido pteroilglutâmico. Tal fato demonstra que os folatos possuem maior biodisponibilidade quando estão em sua forma reduzida (WRIGHT *et al.*, 2005; GREGORY, 1997).

Carência e ingestão recomendada

Entre as deficiências nutricionais, a deficiência em folatos é considerada uma das mais comuns. Podem contribuir para tanto: consumo diário abaixo do recomendado, problemas no metabolismo dos folatos, doenças hepáticas, má absorção, demanda aumentada em gestantes, lactentes, idosos, pacientes com câncer, interferência de certas drogas tais como a sulfasalazina, cimetidina e antiácidos, uso de álcool, anticonvulsivantes, drogas anti-tuberculose, contraceptivos orais e perdas de folatos por hemodiálise (HALSTED, 1989).

A deficiência em folatos pode reduzir a capacidade da célula em sintetizar o DNA e, conseqüentemente, reduzir a taxa de divisão celular. Esta redução de capacidade torna-se mais evidente em células que sofrem divisão mais rapidamente, como as da medula óssea. Deste modo, a anemia é uma das principais formas de se detectar a deficiência em folatos (SCOTT *et al.*, 2000).

Além disso, a redução da biossíntese do DNA tem sido observada em casos de câncer colo-retal (GIOVANNUCCI *et al.*, 1993; GLYNN, 1994).

Devido à redução no ciclo de metilação, a deficiência em folatos pode ainda ocasionar neuropatias em virtude da dificuldade de síntese da mielina, além de acúmulo de homocisteína no plasma sanguíneo, estando esta associada a doenças cardiovasculares (GREGORY, 1989; HAWKES & VILLOTA, 1989; AUSTIN *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2004). Elevados níveis de homocisteína estão ainda relacionados ao possível desenvolvimento de diabetes e artrite reumatóide (MILLER & KELLY, 1997).

Níveis baixos de ácido fólico e vitamina B₁₂, aliados a altos níveis de homocisteína também estão associados ao mal de Alzheimer (CLARKE *et al.*, 1998).

A ingestão de ácido fólico durante os primeiros 28 dias de gestação reduzem o risco do bebê apresentar falhas no seu desenvolvimento, principalmente durante a formação do tubo neural (espinha bífida). Também reduz a possibilidade de anencefalia, um severo sub-desenvolvimento do cérebro e encefalocele, que ocorre quando os tecidos cerebrais projetam-se para fora da pele através de uma abertura anormal do crânio (PRIETO *et al.*, 2006). A suplementação com ácido fólico diminui este risco de 50 a 75% (SICHERI *et al.*, 2000).

As necessidades diárias recomendadas para ingestão de folatos estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Necessidades diárias recomendadas para a ingestão de folatos.

Categoria	Idade (anos)	Folato (µg)
Lactentes	0-6 (meses)	65
	7-12 (meses)	80
Crianças	1 – 3	150
	4 – 8	200
Homens	9 - 13	300
	14 – 18	400
	19 – 30	400
	31 – 50	400
	51 – 70	400
	> 70	400
Mulheres	9 - 13	300
	14 – 18	400
	19 – 30	400
	31 – 50	400
	51 – 70	400
	> 70	400
Gestantes	< 18	600
	19 - 30	600
	31 – 50	600
Lactação	< 18	500
	19 - 30	500
	31 – 50	500

Fonte: Institute of Medicine (1998).

Segurança

Estudos quanto à toxicidade do ácido fólico são necessários a fim de se estipular a quantidade utilizada no enriquecimento de alimentos, uma vez que alguns estudos demonstram efeitos adversos no uso excessivo da vitamina. (WRIGHT *et al.*, 2001).

SONG *et al.* (2000) verificou que a suplementação com ácido fólico 4 vezes maior do que a necessidade basal de ratos, protege de forma significativa o surgimento de tumores intestinais e colo-retais, se administrado antes do tumor ser estabelecido. Caso seja administrado depois, parece ter o efeito contrário. Assim, o tempo certo de administração da vitamina e a quantidade utilizada para o enriquecimento podem ser críticas (WRIGHT *et al.*, 2001).

Outro ponto a ser considerado quanto à segurança do ácido fólico é sua potencial capacidade de mascarar a deficiência em vitamina B₁₂, principalmente em idosos. (FLOOD *et al.*, 2001). Uma alta ingestão de ácido fólico corrige anemia megaloblástica decorrente da falta deste e de vitamina B₁₂, mas as seqüelas neurológicas associadas à falta de vitamina B₁₂ podem não ser aparentes e progredir sem ser detectada. Sendo assim, recomenda-se que a vitamina B₁₂ seja incluída em suplementos e alimentos que contenham ácido fólico (ALLEN *et al.*, 1990; FLOOD *et al.*, 2001; WRIGHT *et al.*, 2001).

Fontes de folatos

Os folatos estão naturalmente presentes em alimentos como vegetais de folha verde-escuro, levedura, fígado, rim e frutas, sob suas diferentes formas (LUCOCK, 2000; SCOTT *et al.*, 2000; GREGORY, 1989; BRODY, 1991).

Entretanto, os teores de folatos encontrados na literatura são bastante diferentes e contraditórios, conforme mostra a **Tabela 2**, em virtude dos diferentes métodos de análise empregados, da variedade e diferentes características do alimento devido a condições de solo e clima de cada região, além da falta de controle das perdas durante o processamento (CATHARINO e GODOY, 2000).

Tabela 2. Teor de folatos em alimentos.

Alimento	Folatos (µg/g)		
	BRODY (1991)	FRANCO (1992)	MARKS (1975)
Leite de vaca fresco	0,05 – 0,12	0,08	-
Fígado cozido	10,7	-	-
Fígado cru	1,41	1,20	0,30 – 1,50
Banana	0,28	-	-
Ovo	1,40	0,80	0,04
Repolho cru	0,30	-	-
Repolho cozido	0,16	-	-
Queijo	0,20	0,16	-
Vegetais verdes	-	-	-
Brócolis cru	1,69	-	-
Brócolis cozido	0,65	-	-
Atum enlatado	0,15	-	-
Batata	-	-	0 – 0,018
Tomate	0,06	-	-
Suco de laranja	1,40	0,40	-

Fonte: Catharino & Godoy (2000)

Estabilidade

O ácido fólico é caracterizado como um composto cristalino, de cor amarela, levemente solúvel em água na forma ácida, mas bastante solúvel quando presente como um sal, sensível ao oxigênio, luz e a presença de metais (CARVALHO, 1996; BRODY, 1991).

Pela reatividade química e solubilidade dos folatos, estes são susceptíveis a potenciais perdas durante o processamento e estocagem de alimentos (SCOTT *et al.*, 2000; FORSSÉN *et al.*, 2000). A caracterização completa da estabilidade dos folatos é dificultada em virtude das diferentes formas presentes em um mesmo alimento.

Por ser uma forma barata de ser produzida sinteticamente pelas indústrias e apresentar alta 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).

A **Tabela 3** compara a estabilidade do ácido fólico em relação a outras vitaminas.

Tabela 3. Estabilidade relativa das vitaminas.

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

I – Instável E – Estável Fonte: Carvallho (1996)

Enriquecimento de alimentos

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, 1991).

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).

Como medida preventiva frente à deficiência em ácido fólico, países como a Austrália, USA, Reino Unido e vários países europeus introduziram a fortificação com esta vitamina em alimentos comumente consumidos pela população.

O mercado mundial de bebidas tem desenvolvido águas, sucos, iogurtes, isotônicos, refrigerantes, energéticos e leites fortificados com ácido fólico, a fim de

evitar a carência desta vitamina e as possíveis doenças a ela relacionadas (PRIETO *et al.*, 2006).

A FDA publicou, em março de 1996, uma regulamentação determinando que todos os cereais e produtos de origem cereal tais como arroz, farinhas, cereais matinais, macarrão, dentre outros, deveriam sofrer uma adição média de 140 µg de ácido fólico a cada 100g de produto (FDA, 1996). Tal regulamentação tornou-se efetiva em janeiro de 1998.

No Brasil, a Resolução RDC nº 324, 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 2002. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver 150µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2005).

Os produtos lácteos, devido a sua grande importância na alimentação, foram os primeiros alimentos a serem enriquecidos com o ácido fólico, mesmo apresentando naturalmente pequenas quantidades da vitamina, conforme mostra a **Tabela 4**.

Tabela 4. Teor de folatos em leites e derivados (µg/100g) em diferentes países.

Produto/ País	Suécia	Finlândia	Inglaterra	Alemanha	Dinamarca	USA	França	Nova Zelândia
Leite integral	6	6	6	7	9	5	7	5
Leite 3% gord	7	-	-	-	-	5	5	5
Leite 1,5% gord	7	4	-	-	4	-	5	-
Creme de leite	4	7	4	4	6	4	4	6
Leite em pó	-	51	-	21	21	-	-	-
logurte	15	8	18	13	17	7-12	3	12

(Fonte: Forssén *et al.*, 2000)

Um estudo 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)

Achocolatados

Os achocolatados, tanto em pó quanto prontos para beber, são largamente consumidos pela população mundial. Dados de 2005 demonstraram que o consumo está distribuído em toda pirâmide populacional, sendo as classes B, C e D responsáveis pelas maiores quantidades consumidas: 31%, 38% e 22% respectivamente (IPSOS, 2005). Deste modo, podem ser considerados fontes importantes, dentre os produtos fortificados, visto a faixa etária da população que o produto atinge e a regularidade com a qual são consumidos. Entretanto, não há dados na literatura sobre o teor de AF nesse tipo de produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R., STABLER, S., SAVAGE, D., LINDENBAUM, J. Diagnosis of cobalamin deficiency: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. **Am. J. Hematol.**, v. 34, p. 90 – 98, 1990.
- ANDERSON, J. L., JENSEN, K. R., CARLQUIST, J. F., BAIR, T. L., HORNE, B. D., MUHLESTEIN, J. B. Effect of folic acid fortification of food on homocysteine-related mortality. **The Am. J. Of Med.**, v. 116, p. 158 – 164, 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fortificação de farinhas. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 16/11/2006.
- AUSTIN, R. C., KONING, A. B. L., WERSTUCK, G. H., ZHOU, J. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. **Clin. Biochem.**, v. 36, p. 431 – 441, 2003.
- BRODY, T. Folic Acid In: Machlin, L. J. **Handbook of vitamins**. 2 ed. New York: Marcel Decker, 1991.
- CARVALHO, P. R. N. **Estudos de vida de prateleira de alimentos enriquecidos. Segundo Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 05-08, 1996.
- CATHARINO, R. R., GODOY, H. T. **Desenvolvimento, validação, e aplicação de metodologia para a análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 126p., 2000.
- CLARKE, R., SMITH, D., JOBST, K. A., REFSUM, H., SUTTON, L., ULEAND, P. M. Folate, vitamin B₁₂ and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. **Arch. Of Neurol.**, v. 48, p. 1449 – 1455, 1998.
- CODEX ALIMENTARIUS. General principles for the addition of essential nutrients to foods. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/299/CXG_009e.pdf. Acesso em 16/11/2006.

- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- FDA. Food standards: amendment of standards of identify for enriched grain products to require adittion of folic acid. **Federal Register**, 61: 8781 – 8791, 1996.
- FLOOD, M. V., WEBB, L. K., SMITH, W., MITCHELL, P., BANTICK, M. J., MACINTYRE, R., SINDHUSAKE, D., RUBIN, L. G. Folate fortification: potential impact on folate intake in an older population. **Eur. J. Of Clin. Nutr.**, v. 55, p. 793 – 800, 2001.
- FÓRSSSEN, K. M., JÄGERSTAD, M. I., WUGERTZ, K., WITHÖF, C. M. Foliates and dairy products: a critical update. **J. of the Am. Coll. Of Nutri.**, v. 19, n. 2, 100s-110s, 2000.
- GIOVANNUCCI, E., STAMPFER, M. J., COLDITZ, G. A., RIMM, E. B., TRICHOPOULOS, D., ROSNER, B. A., SPEIZER, F. E., WILLET, W. C. Folate, methionine and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. **J. Of The Nat. Can. Inst.**, v. 85, p. 875 – 884, 1993.
- GLYNN, S. A., ALBANES, D. Folate and cancer: a review of the literature. **Nutr. Cancer**, v. 22, p. 101-119.
- GREGORY, J. F. Bioavailability of folate. **Eur. J. Of Clin. Nutr.**, v. 51, p.S54-S59, 1997.
- GREGORY, S. K. Foliates: Supplemental forms and therapeutical applications. **Alt. Med. Rew.**, v. 3, no. 3, p. 208-220, 1998.
- GREGORY III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research analytical procedures, methods of folates synthesis, stability and bioavailability of dietary folate. **Ad. In Food and Nutr. Res.**, v. 33, p. 1-101, 1989.
- HALSTED, C. H. The intestinal absorption of dietary folates in health and disease. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 8, p. 650-658, 1989.
- HAWKES, J. G., VILLOTA, R. Foliates in food: reactivity, stability during processing and nutritional implications. **Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.**, v. 28, n. 6, p. 439-539, 1989.
- 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.
- IPSON MARPLAN PESQUISAS LTDA. XLVII Estudos Marplan, 2005.
- LIMA, J. A. **Folatos em vegetais – Influência do tipo de cultivo e do processamento**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp, 2005.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in desease process. **Mol. Gen. Met.**, v. 71, p. 121-138, 2000.
- MARKS, J. **A guide to the vitamins their role in health and disease**. 1ed. Great Britain. St. Leonard's House Lancaster, England, 1975.
- MARTINEZ, A. B. O., BERRUEZO, G. R., CAVA, M. J. B., GRACIÁ, C. M., CASTÓN, M. J. P. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. **Arch. Latin. Am. Nutr.**, v.55, no.1, p. 5-14, 2005.
- MILLER, A. L., KELLY, G. S. Homocysteine metabolism: Nutritional modulation and impact on health and disease. **Alt. Med. Rev.**, v. 2, p. 234-254, 1997.

- MITCHELL, H. K., SNELL, E. E., WILLIAMS, R. J. The concentration of "folic acid". **J. Am. Chem. Soc.**, v. 63, p. 2284, 1941.
- 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 Chem.** 92: 587-595, 2005.
- PRIETO, S. P., GRANDE, B. C., FALCÓN, S. G., GÁNDARA, J. S. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. **Food Contr.**, v. 17, p. 900 – 904, 2006.
- SCOTT, J., RÉBEILLE, F., FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, 80: 795-824, 2000.
- SICHERI, R., COITINHO, D. C., MONTEIRO, J. B., COUTINHO, W. F. Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população brasileira. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.**, v. 44, no. 3, p. 227 – 232, 2000.
- SONG, J., SONH, K. J., MEDLINE, A., ASH, C., GALLINGER, S., KIM, Y. I. Chemoprotective effects of dietary folate on intestinal polyps in Apc + / - Msh2- / -mice. **Can. Res.**, v. 60, p. 3191 – 3199, 2000.
- SWIGLO, A. G. Folates as antioxidants. **Food Chem.**, v. 101, p. 1480 – 1483, 2007.
- WRIGHT, A. J. A., FINGLAS, P. M., SOUTON, S. Proposed mandatory fortification of the UK diet with folic acid: have potential risks been underestimated? **Trends in Food Sci. & Tech.**, v. 12, p. 313 – 321, 2001.

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM ACHOCOLATADOS ENRIQUECIDOS

Pane, D. Q.¹ e Godoy, H. T.¹

**1. Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp
dqpane@yahoo.com.br**

RESUMO

Também chamado de vitamina B₁₂, B₉ ou M, o ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, importante por reduzir a possibilidade de falhas na formação do tubo neural de fetos e por estar relacionado com a possível prevenção de doenças cardiovasculares, mal de Alzheimer e alguns tipos de câncer. A deficiência desta vitamina pode levar ainda à anemia megaloblástica, alterações na medula óssea, distúrbios intestinais e lesões nas mucosas. As principais fontes de ácido fólico, na forma de folatos, são os vegetais e as leveduras. Muitos países, incluindo o Brasil, realizam a fortificação de alimentos, como as farinhas de trigo, milho, cereais e produtos lácteos, a fim de garantir a ingestão desta vitamina em níveis adequados ao bom funcionamento do organismo. Os achocolatados podem ser considerados fontes importantes, entre os produtos fortificados, devido à regularidade com a qual são consumidos. Assim, assegurar a presença e o teor de ácido fólico nesses produtos se torna muito importante. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi a validação de uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise de ácido fólico em achocolatados enriquecidos. A vitamina foi extraída de 1g (mL) de amostra, com 3mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L) em banho ultrassônico por 10 minutos. A próxima etapa foi de limpeza, realizada com ácido fosfórico, tampão fosfato e ácido tricloroacético, seguida de filtração e injeção no cromatógrafo a líquido. Para o sistema cromatográfico utilizou-se uma coluna C₁₈ e eluição por gradiente, sendo a fase móvel composta por solução de ácido acético e acetonitrila. A relação entre as soluções que compõem a fase

móvel foi de 90:10 (fase aquosa:acetonitrila) no início da corrida, chegando a 76:24 em 8,5 minutos e mantendo-se essa proporção até 11 minutos de corrida. O tempo de re-equilíbrio da coluna antes de cada injeção foi de 10 minutos. A detecção foi realizada com o detector de arranjo de diodos (DAD) operando a 290 nm e a quantificação feita por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente, apresentando taxas de recuperação entre 103 e 108%, boa repetibilidade e limites de detecção e quantificação de 0,25 e 0,50µg/g, respectivamente. A metodologia validada apresentou eficiência, rapidez e simplicidade para a análise de ácido fólico.

ABSTRACT

Also known as vitamin B9 or M, folic acid is a water-soluble vitamin, important for reducing the possibility of imperfections in the formation of the neural pipe of embryos and for being related with the possible prevention of cardiovascular illnesses, Alzheimer's disease and some types of cancer. The deficiency of this vitamin can still lead to the megaloblastic anemia, intestinal problems, alterations in the bone marrow, rashes and injuries in the mucosae. The main sources of folic acid, in the form of folates, are the vegetables and the leavenings. Many countries, including Brazil, carry through the food fortification, as flours of wheat, milky maize, cereals and products, in order to guarantee the ingestion of this vitamin in adequate levels to the good functioning of the human organism. The powder and chocolate milk ones can be considered important sources, between the strengthened products, due to regularity with which they are consumed. Thus, to assure the presence and the text of folic acid in these products it becomes very important. Thus, the objective of the present work was the validation of a methodology for high performance liquid chromatography (HPLC) for the analysis of folic acid in powder and chocolate milk drink enriched. The vitamin was extracted of 1g (mL) of sample, with 3mL of potassium hydroxide (0,1mol/L) in ultrasonic bath per 10 minutes. The next stage was of cleanliness, carried through with phosphoric acid, drain plug phosphate and acid trichloroacetic, followed of

filtration and injection in the chromatograph the liquid. For the chromatographic system was used a C18 column and gradient elution, being the composed mobile phase for acetic acid and acetonitrile water solution. The relation between the solutions that compose the mobile phase was of the 90:10 (phase aqueous:acetonitrile) in the beginning of the race, arriving 76:24 in 8,5 minutes remaining itself this ratio up to 11 minutes of race. The time of re-balance of the column before each injection was of 10 minutes. The detection was carried through with the diode array detector (DAD) operating a 290nm and the quantification was made for external standardization. The methodology revealed efficient, presenting rates of recovery between 103 and 108%, good repeatability and limits of detection and of quantification were 0,25 and 0,50µg/g, respectively. The methodology validated here presented efficiency, rapidity and simplicity for the analysis of folic acid.

INTRODUÇÃO

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel, presente naturalmente em apenas alguns alimentos. Sua ocorrência natural está geralmente sob diferentes formas reduzidas do ácido pteroilglutâmico, chamadas genericamente de folatos. Estes atuam como cofatores nas reações metabólicas de transferência de carbono, principalmente a biossíntese do DNA e o ciclo de metilação (SCOTT *et al.*, 2000). É importante por estar relacionado à prevenção de doenças cardiovasculares pela diminuição de homocisteína plasmática, além de prevenir defeitos na formação do tubo neural em fetos (GREGORY, 1989; HAWKES & VILLOTA, 1989).

Os folatos estão naturalmente presentes em alimentos como vegetais de folha verde-escuro, levedura, fígado, rim e frutas, sob suas diferentes formas (LUCOCK, 2000; SCOTT *et al.*, 2000; GREGORY, 1989; BRODY, 1991). A fim de se garantir a ingestão diária recomendada de certas vitaminas, têm-se enriquecido alimentos largamente consumidos pela população.

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 ácido fólico é a forma da vitamina utilizada para enriquecer os alimentos por ser mais estável e mais biodisponível em relação aos folatos.

No Brasil, a Resolução RDC nº 324, 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 2002. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver 150µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2005). A medida visou reduzir os altos índices de anemia e outras doenças decorrentes da carência em ácido fólico e ferro.

Os produtos lácteos foram os primeiros a serem enriquecidos com ácido fólico uma vez que são muito consumidos pela população em geral, podendo suprir grande parte das necessidades diárias da vitamina.

Devido a este aumento na produção e consumo de alimentos fortificados, torna-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e eficiente para determinação do ácido fólico nesses produtos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produtos avaliados

Após a otimização e validação da metodologia, esta foi aplicada às seis amostras de achocolatado, sendo quatro em pó e dois prontos para beber. Os produtos foram adquiridos em supermercados da região de Campinas e grande São Paulo. As determinações foram feitas sempre em duplicata.

Reagentes

O padrão de ácido foi adquirido da empresa Sigma (cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico foi adquirida da empresa Tedia; o ácido acético glacial e o Na_2HPO_4 da Synth; o hidróxido de potássio da Alkimia; o ácido fosfórico da Cinética Química; o ácido tricloroacético da Merck e o KH_2PO_4 da Nuclear. A água utilizada no preparo dos reagentes e da fase móvel foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore) e posteriormente filtradas em filtros Millipore (HAWP e FHLP 04700), com poros de 0,45 μm de diâmetro.

Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático de capacidade de 1 a 100 μL , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, o qual também gerenciou o sistema de aquisição dos dados. Para o processo cromatográfico foi utilizada uma coluna Metasil, ODS-2, 3 μm , 150x4,6 mm d.i. produzida pela MetaChem Technologies Inc.

Determinação do ácido fólico

Para a determinação do ácido fólico em achocolatados partiu-se da metodologia desenvolvida por CATHARINO *et al.* (2005). Para a extração da vitamina tomou-se 1,0g ou 1 mL do achocolatado enriquecido, em pó ou em líquido, previamente homogeneizado. Adicionou-se 3 mL de hidróxido de potássio (0,1 mol/L) e esta mistura foi submetida ao banho ultra sônico por 10 minutos. Adicionou-se então 3 mL de ácido fosfórico (0,1 mol/L), 2 mL de tampão fosfato (composto por Na_2HPO_4 (0,25 mol/L) e KH_2PO_4 (0,37 mol/L)) e 350 μL de ácido tricloroacético. Completou-se o volume do balão com o tampão. Após precipitação da proteína seguiu-se a filtração em duas etapas, primeiramente em papel filtro comum e depois em filtro Millex (HV Millipore), com poros de 0,45 μm de diâmetro. Deste filtrado, 20 μL foram imediatamente injetados no cromatógrafo.

O ácido fólico eluiu através de um sistema de gradiente linear, com vazão de 0,5 mL/min, sendo a fase móvel composta por 90% de fase aquosa (0,166 mol/L de ácido acético glacial; pH 2,8) e 10% de fase orgânica (acetonitrila) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% da fase aquosa e 24% da orgânica mantendo-se nestas condições até 11 minutos. As condições iniciais foram então retomadas e a coluna re-equilibrada por 10 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi realizada em um detector de arranjo de diodos, a 290 nm. A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção, obtidos pela análise do padrão isoladamente, por co-cromatografia e através dos espectros obtidos pelo detector de DAD. O grau de pureza da vitamina foi avaliado pelo sistema disponível no Chemstation-HP. A quantificação foi feita por padronização externa através da curva analítica construída com 5 níveis de concentração (0,2; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,1 $\mu\text{g/mL}$), sendo cada ponto representado pela média de três injeções.

O fluxograma da metodologia utilizada na determinação do ácido fólico está representado na **Figura 1**.

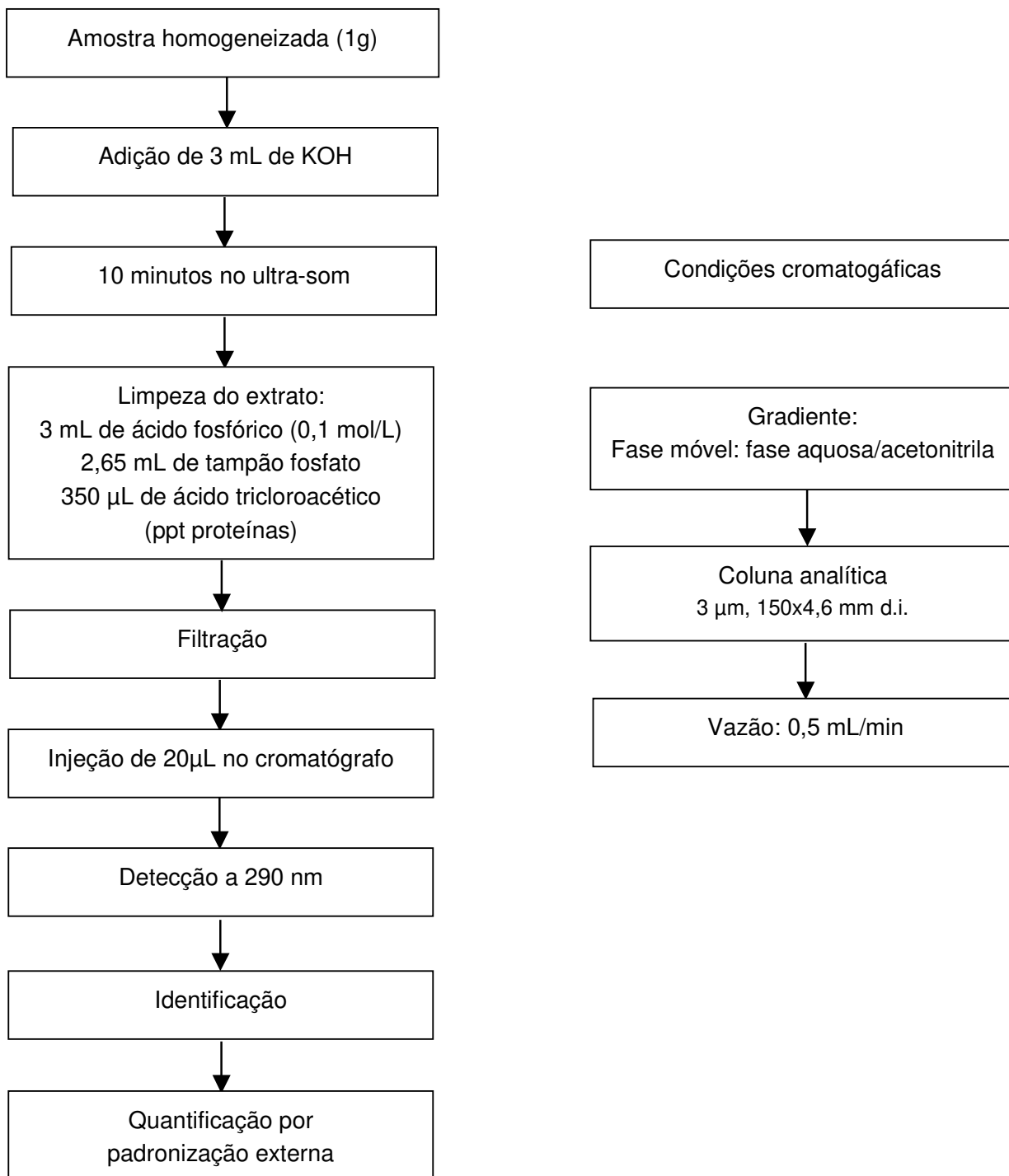


Figura 1. Fluxograma da metodologia utilizada na determinação de ácido fólico em achocolatados enriquecidos.

Validação do método

Uma vez que a metodologia utilizada foi desenvolvida para outras matrizes alimentícias (leite em pó e cereais), testes de recuperação e repetibilidade foram realizados, além de terem sido determinados os limites de detecção e quantificação para as novas matrizes.

Recuperação dos padrões

Para a avaliação da exatidão do método foram realizados testes de recuperação dos padrões adicionados à amostra de achocolatado não enriquecido em dois níveis diferentes de concentração, 110 e 220µg/100g. Estes valores foram escolhidos por serem, respectivamente, ligeiramente inferiores e superiores ao declarado no rótulo de alguns produtos.

Para o procedimento foram utilizados 1mL de amostra. As determinações foram feitas em duplicata.

Para o cálculo da recuperação utilizou-se a seguinte equação, indicada por RODRIGUEZ *et al.* (1995):

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração da amostra})}{\text{Concentração adicionada}}$$

Repetibilidade

Este parâmetro foi avaliado através de 10 determinações. A repetibilidade foi calculada segundo CALCUTT e BRODDY (1983), através da equação:

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

onde r = repetibilidade, com significância de 95%
 sr = estimativa do desvio padrão
 t = t de student

Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção foi estimado através de diluições sucessivas do padrão adicionado à matriz. Foi considerado como limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal de amplitude três vezes maior que o

ruído ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (CALCUTT e BRODDY, 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram introduzidas duas pequenas alterações ao método original desenvolvido por Catharino *et al.* (2006). Em primeiro lugar foi observado não haver necessidade de adição de KOH à fase móvel aquosa. E em segundo lugar, o tempo de re-equilíbrio da coluna ficou estabelecido em 10 minutos em virtude das características da amostra.

Validação da metodologia

Introduzidas essas pequenas alterações na metodologia, a mesma foi validada para o achocolatado em pó. As taxas de recuperação obtidas para os dois níveis de enriquecimento foram de 103% e 108% para os níveis 110µg/100g e 220µg/100g respectivamente.

Estes valores foram superiores aos encontrados por ALBALÁ- HURTADO *et al.* (1997), que determinaram taxas de recuperação de 79% para o leite fluido e próximos aos de CATHARINO & GODOY (2000), que obtiveram taxas de 97 a 99% para leite em pó. Tais valores indicam que o método permitiu uma boa taxa de recuperação da vitamina analisada.

A **Tabela 1** apresenta as faixas de repetibilidade em 10 determinações de ácido fólico para o achocolatado analisado. Sendo assim, espera-se que os valores fornecidos pelas replicatas difiram entre si dentro dos limites estabelecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada (95%). Como pode ser observada, a diferença entre o menor e o maior valor de concentração de ácido fólico na amostra não ultrapassa o valor de r (5,22) calculado, demonstrando dessa forma a repetibilidade da metodologia.

Tabela 1. Repetibilidade do ácido fólico adicionado ao achocolatado.

Produto	Concentrações obtidas para 10 determinações (µg/100g)	Repetibilidade (r)
Achocolatado	199,60	5,22
	202,23	
	197,49	
	202,06	
	198,99	
	197,22	
	197,45	
	197,05	
	199,23	
	200,15	
Média +/- DP*	199,14 ± 1,91	
CV (%)	0,96	
Limite de confiança de 95% (t=2,262)		t=t de Student
* Média aritmética dos valores ± desvio padrão		CV=coeficiente de variação

Os limites de detecção e quantificação determinados no achocolatado foram, respectivamente, 0,25 e 0,50µg/g de produto.

Estes valores foram muito próximos aos de ALBALÁ- HURTADO *et al.* (1997), que determinou 0,5µg/g como limite de detecção para produtos lácteos.

Foram superiores aos encontrados por CATHARINO & GODOY (2000) em leites enriquecidos, ou seja, 0,013µg/ml como limite de detecção.

Tal fato ocorre em virtude das características da matriz e do fato de que no tempo de retenção onde o ácido fólico se encontra há mais ruído no cromatograma, o que aumenta o limite de detecção.

Um cromatograma referente a uma das amostras analisadas neste estudo está disposto na **Figura 2**, onde pico do ácido fólico apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos.

A pureza do pico foi avaliada através dos espectros de absorção obtidos no pico de ácido fólico e trabalhados no programa Chemstation-HP, o qual gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

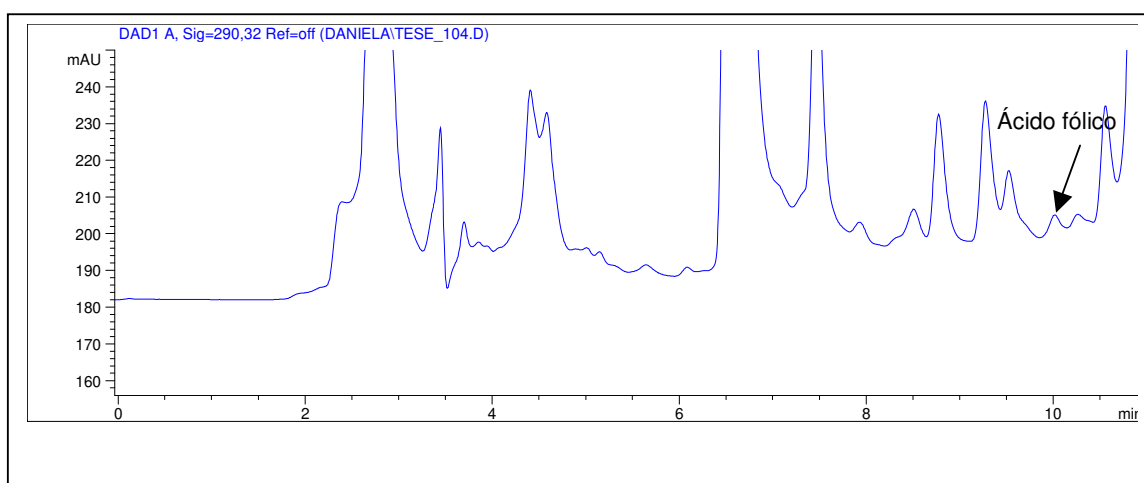


Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato do achocolatado. Coluna Metasil ODS-2, 3 μ m, 150x4,6 mm. Fase móvel: 10% acetonitrila e 90% de fase aquosa (0,166mol/L ácido acético glacial) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de fase aquosa, mantendo-se nestas condições até 11 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.

A curva analítica de calibração do ácido fólico apresentou uma boa faixa de linearidade no intervalo de concentração estudada, com coeficiente de correlação igual a 0,9947 conforme mostra a **Figura 3**.

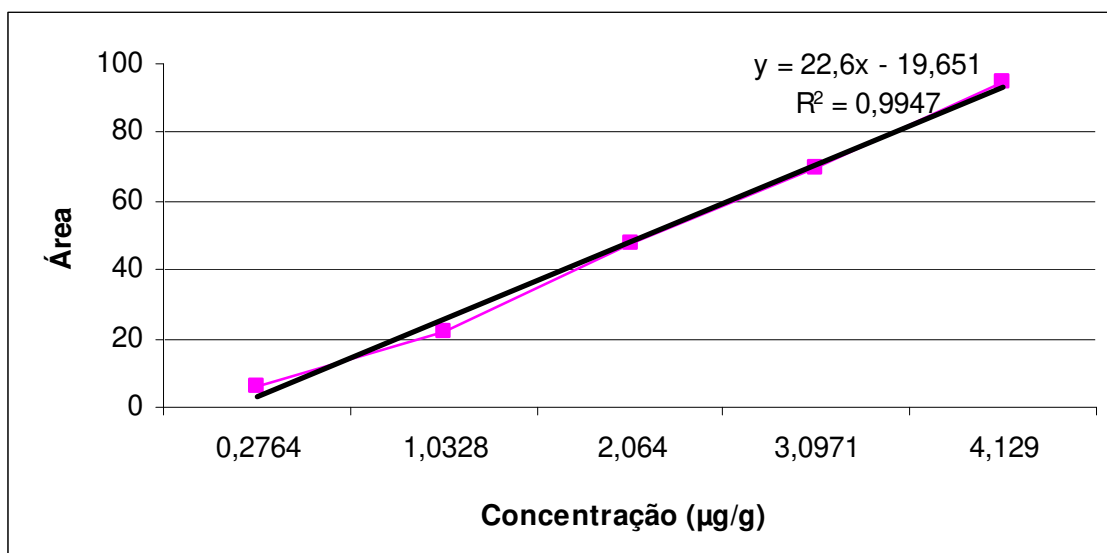


Figura 3. Curva de calibração do ácido fólico.

A **Tabela 2** apresenta o teor de ácido fólico encontrado em algumas amostras de achocolatado em pó e pronto para beber aplicando a metodologia aqui validada.

Tabela 2. Teor de ácido fólico em amostras de achocolatado em pó e prontos para beber.

Marca/amostra	Concentração de ácido fólico (µg/100g)	CV (%)
BS líquida	94,0 ± 2,61	2,77
PB líquida	*	-
BS pó	84,8 ± 0,62	0,73
LC pó	199,5 ± 0,49	0,25
PB pó	89,3 ± 1,66	1,85
AA pó	188,1 ± 5,84	3,10

* Valor abaixo do limite de quantificação ou não detectável.

Nas amostras aqui analisadas o teor de ácido fólico variou de 84,8 a 188,1 µg/100g nas amostras de achocolatado em pó. Das duas amostras prontas para beber analisadas apenas a marca BS apresentou a vitamina, na concentração de 94,0 µg/100g.

CONCLUSÕES

A retirada do KOH da fase móvel foi importante, deixando a análise mais simples embora o tempo de retenção tenha aumentado em aproximadamente dois minutos. Esse tempo foi essencial para a separação do ácido fólico em virtude da complexidade da matriz. Assim como o tempo de re-equilíbrio da coluna de 10 minutos antes da próxima injeção mostrou-se fundamental ao bom desempenho das análises.

A metodologia utilizada para a determinação de ácido fólico em achocolatados mostrou-se eficiente através dos parâmetros de validação avaliados. Também mostrou-se satisfatória devido à simplicidade e rapidez das análises, fundamental para fiscalização de produtos enriquecidos e estudos de estabilidade da vitamina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBALÁ-HURTADO, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., IZQUIERDO-PULIDO, M., MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by HPLC. **J. of Chromat.**, v. 778, n. 1, p. 247-253, 1997.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fortificação de farinhas. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 16/11/2006.
- BRODY, T. Folic Acid In: Machlin, L. J. **Handbook of vitamins**. 2 ed. New York: Marcel Decker, 1991.
- CALCUTT, R., BRODDY, R. *Statistic for Analytical Chemists*. 1 ed. Chapman and Hall, Londres. 1983. 1007p.
- CATHARINO, R. R., LIMA-PALLONE, J. A., GODOY, H. T. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 972-976, 2006.

- CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para a análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, 2000.
- GREGORY III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research analytical procedures, methods of folates synthesis, stability and bioavailability of dietary folate. **Ad. In Food and Nutr. Res.**, v. 33, p. 1-101, 1989.
- HAWKES, J. G., VILLOTA, R. Foliates in food: reactivity, stability during processing and nutritional implications. **Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.**, v. 28, n. 6, p. 439-539, 1989.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Mol. Gen. Met.**, v. 71, p. 121-138, 2000.
- SCOTT, J., RÉBEILLE, F., FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.** 80: 795-824, 2000.
- 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. **J. AOAC Intern.**, v. 78, n. 2, p. 471-476, 1995.

DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM ACHOCOLATADOS ENRIQUECIDOS

Pane, D. Q.¹ e Godoy, H. T.¹

**1. Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp
dqpane@yahoo.com.br**

RESUMO

O ácido fólico é uma vitamina essencial à manutenção do organismo, uma vez que participa de reações biológicas importantes. Assim sendo, vários alimentos têm sido enriquecidos com essa vitamina. Entre eles, as farinhas de trigo e milho, além dos produtos lácteos. Os achocolatados também têm sido enriquecidos, já que atingem, principalmente, crianças e adolescentes, que necessitam dessa vitamina que participa de várias reações importantes durante o desenvolvimento dos seres humanos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o teor de ácido fólico em diferentes marcas de achocolatados, tanto em pó como em prontos para beber, a fim de garantir a quantidade de ácido fólico adicionado aos achocolatados brasileiros. O objetivo deste trabalho foi também verificar a homogeneidade dentre os diversos lotes de uma mesma amostra e comparar com o declarado em seus respectivos rótulos. Assim, foram determinadas as concentrações de ácido fólico em seis diferentes marcas de achocolatados em pó e prontos para beber, em 5 diferentes lotes. O teor de ácido fólico variou de 50,2 a 305,0µg/100g nos produtos em pó e nos prontos para beber de não detectável a 94,0µg/100g. Nos produtos que tinham a quantidade de ácido fólico presente declarada no rótulo, ou seja, em três produtos, apenas 2 tiveram concordância com o declarado. Na avaliação entre lotes do mesmo fabricante, em todos houve diferença significativa entre os cinco lotes analisados, exceto o fabricante PB.

ABSTRACT

The folic acid is an essential vitamin to the maintenance of the organism, a time that participates of important biological reactions. Thus being, some foods have been enriched with folic acid. Between them, flours of wheat and maize, beyond the milky products. Also the powder and milk chocolate drink ones have been enriched, since they reach, mainly, children and adolescents, who need this vitamin since it participates of some important reactions during the development of the human body. Thus, the objective of this work was to evaluate the levels of folic acid in different marks of powder and milk chocolate drink. In order to guarantee the amount the levels of folic acid added in the Brazilian chocolate products, the objective of this work was also to verify the homogeneity amongst the different lots of one same sample and to compare with the declared one in its respective labels. Thus, the concentrations of folic acid in six different marks of chocolate products in powder and ready drink had been determined, in 5 different lots. The level of folic acid varied of 50,2-305,0 μ g/100g in the powder products and the liquids of not detectable by 94,0 μ g/100g. In the products that had the amount of folic acid present declared in the label, in three products, only 2 had had agreement with the declared one. In the evaluation between lots of the same manufacturer, in all it had significant difference between the five analyzed lots, except manufacturer PB.

INTRODUÇÃO

Os folatos pertencem à classe de vitaminas do complexo B e são também chamados de vitamina B_C, B₉ ou M. São importantes por prevenirem problemas de desenvolvimento no tubo neural de fetos, estando ainda associados à prevenção de doenças cardiovasculares por diminuir o nível de homocisteína plasmática (GREGORY, 1989; HAWKES & VILLOTA, 1989; BROWER, 2000; AUSTIN *et al.*, 2003, ANDERSON *et al.*, 2004; BAZZANO, 2006).

A deficiência em folatos é um problema atual e como medida preventiva países como a Austrália, USA, Reino Unido e vários países europeus introduziram a fortificação com esta vitamina em alimentos comumente consumidos pela população.

No Brasil, segundo a Resolução RDC nº 324, 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 2002. Para cada 100g de farinha de milho ou trigo deve haver 150µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2005). Entretanto, há uma grande variedade de produtos alimentícios já enriquecidos com essa vitamina, destacando-se os cereais matinais e os produtos lácteos, entre eles os achocolatados.

Os achocolatados são importantes por atingirem principalmente o público infantil, podendo se tornar uma fonte alternativa em função da quantidade e da frequência com a qual são consumidos.

Em virtude destes fatores, monitorar e avaliar o processo de enriquecimento e a estabilidade da vitamina frente ao processamento e estocagem do alimento é de fundamental importância para poder garantir a ingestão da quantidade adequada da vitamina. Verificar a homogeneidade entre os lotes também propicia uma melhor avaliação do processo de enriquecimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produtos avaliados

Foram avaliados cinco lotes distintos de cada tipo de achocolatado, de seis diferentes fabricantes, sendo 3 prontos para beber e 7 em pó, totalizando 10 diferentes amostras. Cada lote foi formado por duas embalagens, que foram totalmente homogeneizadas antes da retirada da amostra para análise. Os produtos foram adquiridos em supermercados da região de Campinas e grande São Paulo. As determinações foram feitas sempre em duplicata.

Reagentes

O padrão de ácido foi adquirido da empresa Sigma (cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico foi adquirida da Tedia; o ácido acético glacial e o Na_2HPO_4 da Synth; o hidróxido de potássio da Alkimia; o ácido fosfórico da Cinética Química; o ácido tricloroacético da Merck e o KH_2PO_4 da Nuclear. A água utilizada no preparo dos reagentes e da fase móvel foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore) e posteriormente filtradas em filtros Millipore (HAWP e FHLP 04700), com poros de 0,45 μm de diâmetro.

Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático de capacidade de 1 a 100 μL , degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, o qual também gerenciou o sistema de aquisição dos dados. Para o processo cromatográfico foi utilizada uma coluna Metasil, ODS-2, 3 μm , 150x4,6 mm d.i. produzida pela MetaChem Technologies Inc.

Determinação do ácido fólico

Para a análise do ácido fólico em achocolatados utilizou-se a metodologia desenvolvida e validada por CATHARINO *et al.* (2005) adequada às amostras.

De acordo com o tipo de amostra – pó ou líquida – partiu-se de 1 g ou de 1 mL da mesma. Para a extração da vitamina tomou-se 1,0g (mL) do achocolatado enriquecido previamente homogeneizado. Adicionaram-se 3 mL de hidróxido de potássio (0,1 mol/L) e esta mistura foi submetida ao banho ultra sônico por 10 minutos. Adicionou-se então 3 mL de ácido fosfórico (0,1 mol/L), 2 mL de tampão fosfato (composto por Na_2HPO_4 (0,25 mol/L) e KH_2PO_4 (0,37 mol/L)) e 350 μL de ácido tricloroacético. Completou-se o volume do balão com o tampão. Após precipitação da proteína seguiu-se a filtração em duas etapas, primeiramente em papel filtro comum e depois em filtro Millex (HV Millipore), com poros de 0,45 μm de diâmetro. Deste filtrado, 20 μL foram imediatamente injetados no cromatógrafo.

O ácido fólico eluiu através de um sistema de gradiente linear, com vazão de 0,5 mL/min, sendo a fase móvel composta por 90% de fase aquosa (0,166 mol/L de ácido acético glacial; pH 2,8) e 10% de fase orgânica (acetonitrila) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% da fase aquosa e 24% da orgânica mantendo-se nestas condições até 11 minutos. As condições iniciais foram então retomadas e a coluna re-equilibrada por 10 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi realizada em um detector de arranjo de diodos, a 290 nm. A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção, obtidos pela análise do padrão isoladamente, por co-cromatografia e através dos espectros obtidos pelo detector de DAD. O grau de pureza da vitamina foi avaliado pelo sistema disponível no Chemstation-HP. A quantificação foi feita por padronização externa através da curva analítica construída com 5 níveis de concentração (0,2 1,0; 2,0; 3,0 e 4,1 $\mu\text{g/mL}$), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

Análise estatística

Realizou-se o teste de Tukey através do programa GraphPad Prism (versão 2.01) a fim de verificar se existiu ou não diferença significativa entre os lotes de cada produto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 1** apresenta os cromatogramas obtidos através da injeção do padrão de ácido fólico (A) e de uma amostra de achocolatado (B). Neles, os picos de ácido fólico aparecem com tempos de retenção de aproximadamente 10 minutos. **A figura 2** apresenta a curva de calibração.

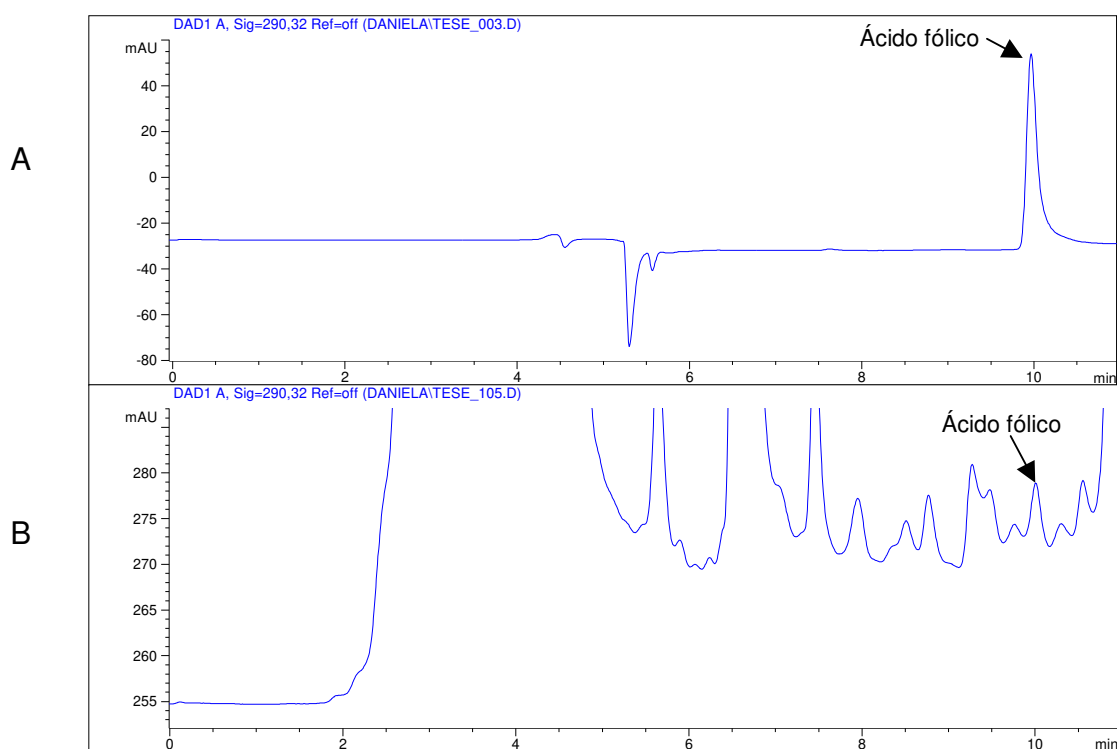


Figura 1: Perfil cromatográfico do padrão de ácido fólico (A) e da amostra (B). Coluna Metasil ODS-2, 3 μ m, 150x4,6 mm. Fase móvel: 10% acetonitrila e 90% de fase aquosa (0,166mol/L ácido acético glacial) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de fase aquosa, mantendo-se nestas condições até 11 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.

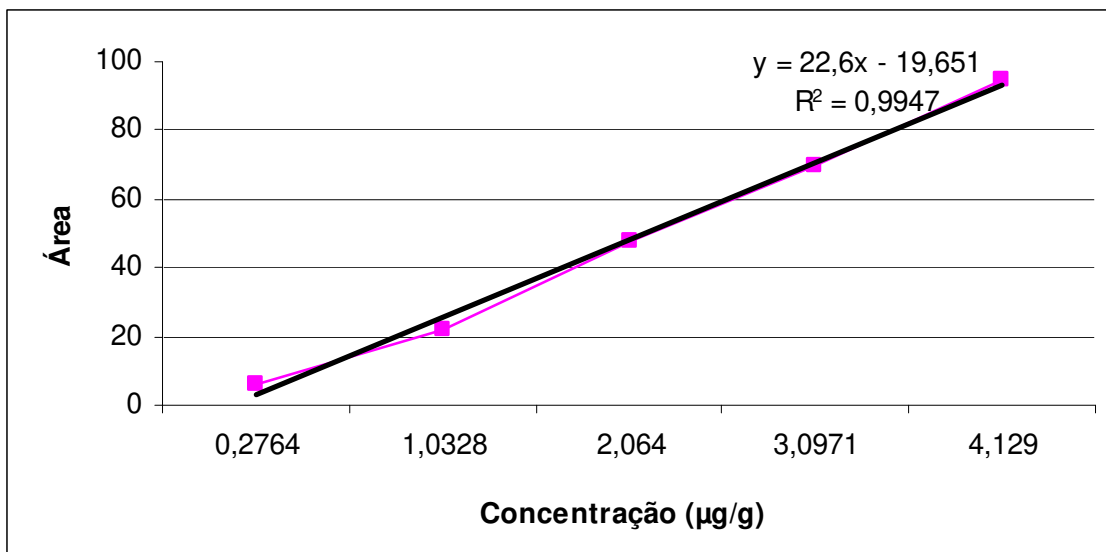


Figura 2: Curva de calibração do ácido fólico.

A curva analítica de calibração do ácido fólico apresentou uma boa faixa de linearidade no intervalo de concentração de 0,2 a 4,2µg/100g, com coeficiente de correlação igual a 0,9947.

A **Tabela 1** e a **Tabela 2** apresentam, e relacionam pelo teste de Tukey, o teor de ácido fólico presente em cada lote, de cada produto analisado.

Tabela 1. Teor de ácido fólico em achocolatados em pó enriquecidos.

Fabricante	Produto	Lote	Ácido fólico ($\mu\text{g}/100\text{g}$) $M \pm DP$	CV (%)
BS	BS ₁	1	101,2 $\pm$ 1,94 (a)	1,92
		2	90,2 $\pm$ 1,58 (a,b)	1,75
		3	91,2 $\pm$ 5,79 (a,b)	6,35
		4	84,8 $\pm$ 0,62 (b)	0,73
		5	89,0 $\pm$ 2,61 (b)	2,93
	BS ₂	-	ND	-
LC	LC ₁ (Declarado no rótulo 180 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	1	199,5 $\pm$ 0,49 (a)	0,25
		2	160,4 $\pm$ 3,59 (b)	2,24
		3	193,2 $\pm$ 1,87 (a,c)	0,97
		4	164,1 $\pm$ 7,11 (b)	9,84
		5	180,7 $\pm$ 6,89 (a,b,c)	3,81
	LC ₂ (Declarado no rótulo 180 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	1	199,7 $\pm$ 0,65 (a)	0,33
		2	191,5 $\pm$ 5,88 (a)	3,07
		3	187,8 $\pm$ 5,58 (a)	2,97
		4	305,0 $\pm$ 9,47 (b,c)	3,57
		5	290,9 $\pm$ 3,33 (c)	1,15
PB	PB ₁	1	72,0 $\pm$ 6,77 (a)	9,41
		2	89,3 $\pm$ 1,66 (a)	1,85
		3	66,5 $\pm$ 5,38 (a)	8,09
		4	87,6 $\pm$ 8,04 (a)	9,18
		5	70,6 $\pm$ 3,42 (a)	4,84
AA	AA ₁	1	274,9 $\pm$ 2,37 (a)	1,26
		2	177,1 $\pm$ 1,02 (a,c)	0,58
		3	188,1 $\pm$ 5,84 (a)	3,10
		4	165,2 $\pm$ 9,75 (a,c)	8,69
		5	93,5 $\pm$ 5,84 (b)	4,92
TF	TF ₁ (Declarado no rótulo 1200 $\mu\text{g}/100\text{g}$)	1	50,2 $\pm$ 0,46 (a)	0,92
		2	51,5 $\pm$ 1,67 (a)	3,25
		3	73,1 $\pm$ 1,30 (b,c)	1,78
		4	78,6 $\pm$ 7,18 (c)	9,14
		5	55,4 $\pm$ 1,39 (a)	2,50

Valores assinalados com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

ND = Valor abaixo do limite de quantificação ou não detectável.

Os valores são as médias das determinações em duplicatas.

$M \pm DP$: média dos valores $\pm$ estimativa do desvio padrão.

CV: % coeficiente de variação.

Tabela 2. Teor de ácido fólico em achocolatados prontos para beber enriquecidos.

Fabricante	Produto	Lote	Ácido fólico ($\mu\text{g}/100\text{g}$) $M \pm DP$	CV (%)
BS	BS ₃	1	90,2 $\pm$ 5,19 (a)	5,75
		2	94,0 $\pm$ 2,61 (a)	2,77
		3	29,6 $\pm$ 0,56 (b)	1,89
		4	60,4 $\pm$ 3,69 (c)	6,11
		5	87,8 $\pm$ 2,82 (a)	3,21
PB	PB ₂	-	ND	-
NP	NP ₁	-	ND	-

Valores assinalados com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

ND = Valor abaixo do limite de quantificação ou não detectável.

Os valores são as médias das determinações em duplicatas.

$M \pm DP$: média dos valores $\pm$ estimativa do desvio padrão.

CV: % coeficiente de variação.

Pode-se concluir, pela análise estatística, que além da diferença existente entre os achocolatados em pó analisados ainda existem falhas no processo de enriquecimento e sua homogeneização, uma vez que pelo teste de Tukey a concentração de ácido fólico varia entre os diferentes lotes de uma mesma amostra, exceto na amostra PB₁, a qual não apresentou diferença entre os lotes.

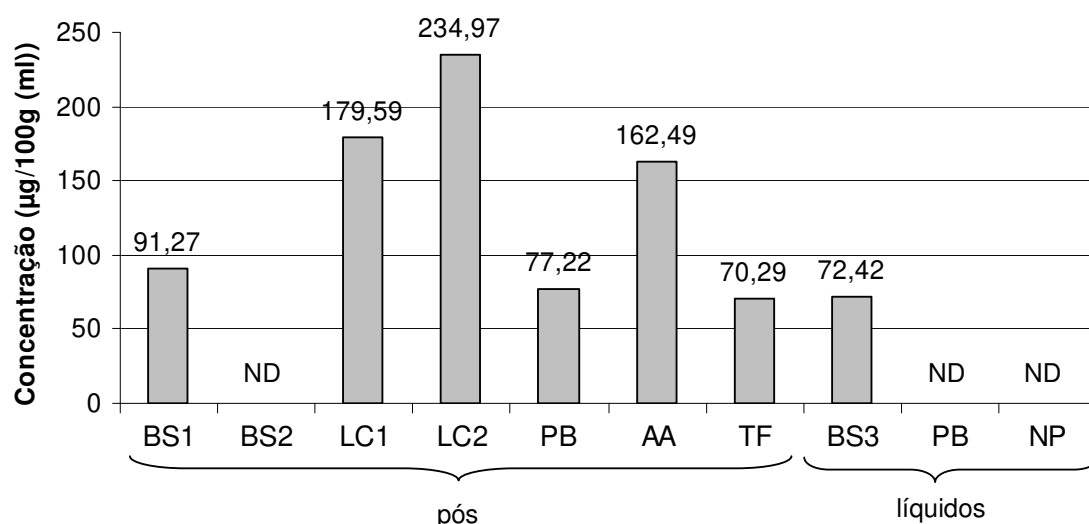
Apenas as amostras dos fabricantes LC e TF apresentavam, declarados em seus rótulos, as seguintes concentrações de ácido fólico: 180 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 1200 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectivamente. Sendo assim, comparando-se com a **Tabela 1** verificou-se que as concentrações de ácido fólico nas amostras do fabricante LC encontram-se dentro do valor esperado, o declarado no rótulo. Já para a amostra do fabricante TF, a concentração de ácido fólico encontra-se abaixo da informada em seu rótulo (apenas 5,8% do declarado), possivelmente por problemas de homogeneização durante o processo de enriquecimento ou ainda pelo tipo de matéria prima utilizada.

As demais amostras não indicavam a presença da vitamina em seus rótulos. Entretanto, as amostras do fabricante AA, PB e BS (amostras 1 e 2) apresentaram teor a ser considerado na alimentação, mesmo não estando estes valores declarados em seus rótulos.

Nas amostras em pó, a concentração média variou entre 70 e 234 μ g/100g, evidenciando a diferença existente entre as fórmulas utilizadas pelas indústrias para o enriquecimento do produto.

Nas 3 amostras prontas para beber que foram analisadas, apenas uma apresentou quantidade de ácido fólico possível de ser quantificada, conforme indicado na **Tabela 2**.

A **Figura 1** compara as médias das concentrações da vitamina obtidas para cada fabricante de achocolatado.



ND = Valor abaixo do limite de quantificação ou não detectável.

Figura 1. Concentração de ácido fólico nos achocolatados.

PRIETO *et al.* (2006) avaliou 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 μ g/mL, enquanto os autores encontraram 0,75 μ g/mL. Em sucos, das 3 marcas analisadas, uma apresentou concentração ligeiramente superior ao declarado, que foi 0,72 μ g/mL contra

0,66µg/mL informado na embalagem. Na marca de iogurte analisada não houve discordância com o rótulo.

LIMA *et al.* (2004), também avaliou o teor de ácido fólico em 12 marcas diferentes, sendo 4 de leite em pó, 4 de leite esterilizado e 4 de bebida láctea achocolatada. Para as amostras de leite em pó, não houve diferença entre o valor encontrado e o que foi declarado no rótulo dos produtos. Para o leite em pó apenas 2 estavam de acordo com o rótulo – nas demais os valores foram inferiores: 7,7µg/100mg e 23,2µg/100mg contra 20µg/100mg e 300µg/100mg declarados no rótulo, respectivamente. Nas bebidas láctea achocolatadas foram encontrados, em duas marcas, valores inferiores ao declarado: 49,2µg/100mL e 48,5µg/100mL, sendo que o rótulo de ambas declarava haver 300µg/100mL.

Considerando que no preparo dos achocolatados em pó sejam utilizados 25g de produto, média sugerida, para 200 ml de leite, pode-se calcular a quantidade ingerida e sua correspondência em % das necessidades diárias recomendadas para folatos, conforme **Tabela 3**.

Tabela 3. Suprimento das necessidades diárias de ácido fólico de acordo com a faixa etária.

Fabricante	Quantidade ingerida (µg)	Necessidades diárias (%)			
		Crianças ¹	Adultos ²	Gestantes ³	Lactação ⁴
BS ₁	22,81	11	6	4	5
BS ₂	-	-	-	-	-
LC ₁	44,90	22	11	8	9
LC ₂	58,74	29	15	10	12
PB	19,30	10	5	3	4
AA	40,62	20	10	7	8
TF	17,57	9	4	3	4

1. Crianças de 4 a 8 anos – IDR: 200µg

2. Adultos de 14 a >70 anos – IDR: 400µg

3. Gestantes – IDR: 600µg

4. Lactação - IDR: 500µg

Os achocolatados líquidos já vêm prontos para beber, em embalagens de 200ml. Das amostras analisadas, somente na marca BS₃ foi detectada a presença da vitamina, na concentração média de 72µg/100mL, ou seja, 145µg/200mL. Esta quantidade corresponde a 72% das necessidades diárias de crianças, 36% de adultos, 24% de gestantes e 29% na lactação, com as mesmas condições de análise empregadas na **Tabela 3**.

CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para a determinação de ácido fólico em achocolatados mostrou-se eficiente na quantificação da vitamina nas matrizes estudadas. Entretanto, os resultados encontrados indicam falhas no processo de enriquecimento na indústria, uma vez que os lotes dos produtos analisados diferem entre si.

Algumas amostras, mesmo sem estar declarada em seus rótulos, apresentaram quantidades significativas de ácido fólico, mostrando-se satisfatórias para o uso na alimentação, principalmente de crianças.

Os achocolatados podem ser considerados fontes alternativas da vitamina, tendo importante participação na dieta de acordo com a frequência na qual são consumidos.

Os dados encontrados no nosso trabalho mostram a importância de estudos referentes a melhor forma da adição da vitamina, com equipamentos melhores projetados, os quais aumentem a eficiência do processo de homogeneização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. L., JENSEN, K., R., CARLQUIST, J. F., BAIR, T. L., HORNE, B. D., MUHLESTEIN, J. B. Effect of folic acid fortification of food on homocysteine-related mortality. **The Am. J. Of Med.**, v. 116, p. 158 – 164, 2004.

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fortificação de farinhas. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 16/11/2006.
- AUSTIN, R. C., KONING, A. B. L., WERSTUCK, G. H., ZHOU, J. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. **Clin. Biochem.**, v. 36, p. 431 – 441, 2003.
- BAZZANO, L. A., REYNOLDS, K., HOLDER, K. N., HE, J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases. *Am. Med. Ass.*, v. 292, n. 22, p. 2720 – 2726, 2006.
- BROWER, I. A. Folic acid, folate and homocysteine: Human intervention studies. **Europ. J. of Obst. And Gynecol. And Reprod. Biol.**, v. 92, p. 183 – 184, 2000.
- GREGORY III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research analytical procedures, methods of folates synthesis, stability and bioavailability of dietary folate. **Ad. In Food and Nutr. Res.**, v. 33, p. 1-101, 1989.
- HAWKES, J. G., VILLOTA, R. Foliates in food: reactivity, stability during processing and nutritional implications. **Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.**, v. 28, n. 6, p. 439-539, 1989.
- LIMA, J. A., GODOY, H. T. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 93p., 2001.
- LIMA, J. A., CATHARINO, R. R., GODOY, H. T. Ácido fólico e bebida láctea enriquecidos – estudo da vida de prateleira. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 82 – 87, 2004.
- PRIETO, S. P., GRANDE, B. C., FALCÓN, S. G., GÁNDARA, J. S. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. **Food Contr.**, v. 17, p. 900 – 904, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

Algumas marcas de achocolatado em pó, embora não declarem a existência de ácido fólico em seus rótulos, contêm a vitamina em quantidades significativas, tornando o alimento uma fonte alternativa de ácido fólico, principalmente para crianças e adultos.

Nos produtos que tinham a quantidade de ácido fólico presente declarado no rótulo, ou seja, em três deles, apenas dois tiveram concordância com o declarado.

Nos achocolatados prontos para beber, uma dentre as três marcas analisadas apresentou quantidades significativas da vitamina, embora essa informação não esteja declarada nos rótulos das três amostras.

Desta forma, os achocolatados podem ser considerados fontes importantes, dentre os produtos fortificados, visto a faixa etária da população que o produto atinge e a regularidade com a qual são consumidos.

A adição de ácido fólico em alimentos, realizada pelas indústrias, deve ser constantemente avaliada e monitorada, uma vez que houve diferenças significativas entre os lotes dos produtos, demonstrando problemas de homogeneidade das amostras.

Para tanto, a metodologia aqui apresentada e validada mostrou ser simples, rápida e versátil, tendo a possibilidade de ser empregada como análise de rotina em indústrias e órgãos de fiscalização, para a matriz utilizada.