

ÁCIDO FÓLICO EM ALIMENTOS: BREVE VISÃO E REVISÃO

Carine de Andrade Duarte Rosa, Lucile Tiemi Abe-Matsumoto*

Núcleo de Química, Física e Sensorial do Centro de Alimentos - Instituto Adolfo Lutz
Avenida Doutor Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000

*E-mail: lucile.matsumoto@ial.sp.gov.br

RESUMO

Folato é o termo genérico que caracteriza compostos semelhantes ao ácido fólico, quanto a sua estrutura e atividade vitamínica. Os folatos estão naturalmente presentes em alguns alimentos, principalmente em vegetais folhosos. Desde o início do século XX, estudos vêm comprovando sua relevância em diversos processos metabólicos e sua carência está intimamente relacionada a várias doenças como anemia megaloblástica, câncer e malformações congênitas. Diversos países têm adotado programas mandatórios de fortificação. No Brasil, a partir de dezembro de 2002, dada a publicação da Resolução RDC nº 344/2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a fortificação em farinhas tornou-se obrigatória. Com as evidências de que estas medidas têm diminuído a prevalência da deficiência do tubo neural em recém-nascidos, o programa de fortificação continua até os dias atuais com a atualização desta legislação em 2017. Entendendo a importância dos folatos na manutenção da saúde e do monitoramento dos alimentos fortificados, é indispensável o estabelecimento de métodos analíticos confiáveis. A multiplicidade de formas de folatos, a diversidade de matrizes alimentícias e as baixas concentrações do composto presentes em alimentos tornam a análise quantitativa uma tarefa difícil. Este trabalho descreve uma abordagem geral sobre o ácido fólico, sua importância na nutrição e apresenta diferentes métodos analíticos para a sua quantificação em alimentos, os quais são essenciais para a fiscalização dos alimentos enriquecidos e para o monitoramento das políticas públicas de fortificação de alimentos, tendo em vista a promoção da saúde da população.

Palavras-chave: ácido fólico, folatos, fortificação, metodologia analítica.

Introdução

Vitaminas são definidas como substâncias orgânicas com ampla variedade de estruturas e funções. O ácido fólico é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel, cuja fonte é exclusivamente exógena. O termo ácido fólico deriva do latim *folium*, folha, devido a sua presença em vegetais predominantemente folhosos, e é usado para caracterizar a forma sintetizada, não presente nos alimentos. Os folatos representam um grupo de compostos de mesma característica vitamínica, que inclui os folatos naturais e o ácido fólico (VANNUCCHI, 2010).

Com as crescentes evidências e comprovações sobre sua importância para a saúde e relação com doenças cardiovasculares, câncer e principalmente dos defeitos congênitos, a partir de 1993 o Serviço de Saúde Pública Americano passou a recomendar a ingestão diária adequada de folato para todas as mulheres em idade fértil, a fim de reduzir o risco de malformações do feto. No Brasil a Resolução RDC nº 344/02 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS) tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Em 2017, houve alteração dos requisitos para a fortificação com a publicação da Resolução RDC nº 150/2017. Com o desenvolvimento dos alimentos enriquecidos com ácido fólico, metodologias analíticas para a quantificação deste micronutriente são necessárias, tanto para o controle de qualidade nas indústrias quanto para fins de fiscalização.

Este trabalho teve como objetivo apresentar os principais aspectos sobre a importância do ácido fólico para a saúde, as políticas públicas de fortificação de alimentos no Brasil e as diferentes técnicas analíticas para a quantificação de ácido fólico em alimentos.

Metodologia

O trabalho foi desenvolvido por meio de revisão bibliográfica utilizando periódicos nacionais e internacionais cujas bases de dados utilizadas foram: Science Direct, Web of Science, National Library of Medicine (Pubmed), Scientific Electronic Library Online (Scielo), Scopus, Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Google Acadêmico (Google Scholar), além de referências de órgãos da saúde como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS).

Generalidades

Histórico

O ácido fólico foi isolado em 1943, com o objetivo de avaliar os fatores de crescimento observados em bactérias e animais. Quinze anos antes desta descoberta, Lucy Wills havia descrito a existência de um fator em leveduras e extratos de fígado, que teria capacidade de curar a anemia tropical na Índia (VANNUCCHI, 2010).

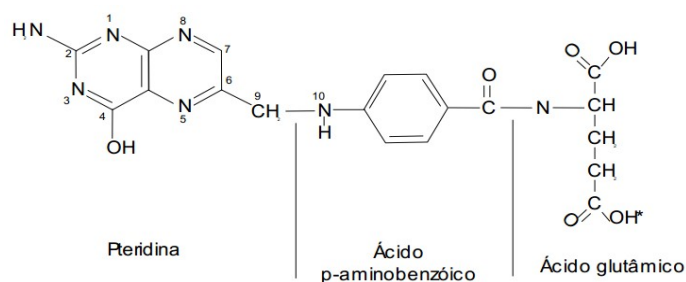
Em 1945, Angier e colaboradores descreveram a estrutura química do composto e Spies demonstrou que a vitamina é capaz de curar a anemia megaloblástica durante o período gestacional (ALABURDA, 2007).

Em 1962, foram estabelecidos critérios diagnósticos para a deficiência de folato e estimadas as necessidades de ácido fólico para adultos, os quais serviriam como base para o estabelecimento das atuais recomendações de ingestão. A partir da década de 1990, iniciaram-se estudos mais aprofundados quanto à síntese, vias de absorção e metabolismo e sua relação com os defeitos congênitos do tubo neural (VANNUCCHI, 2010).

Estrutura e Características Físico-Químicas

A estrutura molecular do ácido fólico é constituída por um anel de pteridina ligado ao ácido p-aminobenzóico, unido a um ou mais resíduos de ácido glutâmico, conforme a figura 1.

Figura 1. Estrutura química do ácido fólico.



Fonte : GOODMAN & GILMAN (2003)

*Representa resíduos adicionais de glutamato que podem estar presentes num total de até 7 resíduos – poliglutamatos.

Os folatos diferem do ácido fólico em três aspectos: a) possuem resíduos adicionais de unidades de glutamatos; b) sofrem redução; e c) podem conter unidades carbônicas adicionais, como metil, formil e metileno ligados aos átomos de nitrogênio (ALABURDA, 2007).

O ácido fólico possui peso molecular 441,40 g/mol e fórmula molecular $C_{19}H_{19}N_7O_6$, é inodoro e insípido. Levemente solúvel em água em pH neutro, e altamente solúvel em água ácida e alcalina, insolúvel em solventes orgânicos. Apresenta alta sensibilidade à luz e ao calor decompondo-se quando submetido a essas condições (MERCK INDEX ONLINE).

O ácido fólico absorve radiação eletromagnética na região ultravioleta, porém não apresenta fluorescência, enquanto que os folatos absorvem na região ultravioleta e apresentam fluorescência (MERCK INDEX ONLINE).

Funções

O ácido fólico é essencial para síntese, reparação e metilação do DNA (ZHANG et. al, 2012; VANNUCHI, 2010). Os folatos agem como uma coenzima em muitas reações no metabolismo de aminoácidos e nucleótidos, constituindo importante papel nos processos de desenvolvimento celular. Há evidências de que uma dieta rica em folatos reduz o risco de doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios mentais e anemia megaloblástica, doença na qual a medula óssea produz glóbulos vermelhos gigantes e imaturos (COZZOLINO, 2011).

Na tabela 1 são apresentadas funções aceitas e não aceitas pelo Comitê de Cientistas e pela Iniciativa Conjunta para Alegações de Saúde do Reino Unido (United Kingdom Joint Health Claim Initiative - UK- JHCI).

Tabela 1. Funções aceitas e não aceitas pelo Comitê de Cientistas Líderes e pelo Conselho do UK - UK- JHCI

Efeito	Necessário	Contribuição	Função Estrutural	Recomendado pelo Comitê	Recomendado pelo Conselho
Funções Aceitas					
Divisão celular	x			Sim	Sim
Desenvolvimento do tubo neural	x		x	Sim	Sim
Hematopoiese *	x			Sim	Sim
Metabolismo da Homocisteína **		X		Sim	Sim
Funções não aceitas					
Neurotransmissor	x		x	Não	Não

*Hematopoiese: produção de células sanguíneas. ** Homocisteína: relacionada ao desenvolvimento da doença cardiovascular (TRICHES et. al, 2001).

Fonte: (VANNUCCHI, 2010)

A deficiência de folato pode ser causada por ingestão inadequada, anorexia ou dietas para emagrecimento, má absorção devido a patologias no trato gastrointestinal ou aumento das necessidades teciduais, o que ocorre em mulheres gestantes e lactantes (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Fonte Alimentar

Os folatos estão presentes em quase todos os alimentos naturais de origem animal e vegetal, mas é altamente suscetível à oxidação, havendo perdas de 50 % a 95 % do conteúdo alimentar de folatos durante os processos de cozimento e congelamento. Os alimentos com maior teor de folatos são os vegetais folhosos verde-escuros, fígado e outras vísceras, amendoim, ovo e grãos integrais (VANNUCCHI, 2010).

É importante observar que além da composição da dieta, outro fator relevante é o preparo dos alimentos, uma vez que estes compostos são hidrossolúveis e termolábéis, sofrendo degradação com a cocção (ALABURDA, 2007).

Fortificação de Alimentos

A fortificação ou enriquecimento é o processo no qual um ou mais nutrientes são acrescidos aos alimentos, com o objetivo de reforçar seu valor nutritivo e prevenir ou corrigir eventuais deficiências nutricionais apresentadas pela população em geral ou de grupos de indivíduos. A legislação brasileira considera como alimento fortificado quando 100 mL ou 100 g do produto, pronto para consumo, forneça no mínimo 15% da IDR, no caso de líquidos, e 30% da IDR, no caso de sólidos (BRASIL, 1998). Atendendo a estes requisitos, a Informação Nutricional Complementar “alto teor de ... (nutriente)” ou “rico em ... (nutriente)” pode ser utilizada no rótulo (BRASIL, 2012).

Seguindo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Institute of Medicine (IOM), a Resolução RDC nº 269/2005 da ANVISA/MS estabelece as recomendações de ingestão diária de ácido fólico, sendo 240 µg para adultos, 48 µg para lactentes, 95 µg a 177 µg para crianças variando de acordo com a faixa etária, 355 µg e 295 µg, respectivamente, para gestantes e lactantes.

Em 1933 o Serviço de Saúde Pública americano passou a recomendar a ingestão diária adequada de folato para todas as mulheres em idade fértil, a fim de reduzir o risco de malformações do feto, tais como espinha bífida e outros defeitos do tubo neural (VANNUCCHI, 2010).

Da mesma forma, no Brasil, dado conhecimento de que a espinha bífida e outros defeitos do tubo neural estavam associados com a baixa ingestão de folato, a fortificação de alimentos com ácido fólico foi recomendada como fator de proteção.

No Brasil, em junho de 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC nº 344, tornando obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e de milho e seus subprodutos com ácido fólico, devendo cada 100 g do produto fornecer uma quantidade mínima de 150 µg da vitamina. Esta resolução foi revogada com a publicação da Resolução RDC nº 150/2017, que atualizou as regras de fortificação. De acordo com esta norma, os fabricantes são obrigados a enriquecer as farinhas de trigo e de milho com 140 a 220 µg de ácido fólico para cada 100 g de farinha.

Escolheu-se a fortificação de farinhas, pois os alimentos produzidos a partir dessas, são consumidos constantemente pela maioria da população durante todo o ano, tendo como exemplo, os pães. Além de não alterar as características dos alimentos, sua fortificação é economicamente viável (FOLDER ANVISA, 2004).

Os níveis de fortificação mandatória são diferentes em diversos países, como ilustrado na Tabela 2.

Em alguns países com alta prevalência de anemia como na Ásia e na África, a suplementação com ferro e ácido fólico em gestantes se mostrou eficaz na redução da anemia e da mortalidade materna e infantil. No Brasil, estudos indicam redução significativa na prevalência de defeitos do tubo neural após a fortificação obrigatória das farinhas de trigo e milho com ácido fólico, mostrando a importância da suplementação adequada com ácido fólico (FUJIMORI, 2013).

Tabela 2. Níveis de fortificação com ácido fólico em diferentes países

País	Nível de Fortificação	Implementação
Estados Unidos	140 µg/100g	1998
Canadá	150 µg/100g	1998
Costa Rica	180 µg/100g	1998
Chile	220 µg/100g	2000
África do Sul	150 µg/100g	2003
Brasil	150 µg/100g	2002
Brasil	140 a 220 µg/100g	2017

BRASIL, 2002; BRASIL, 2017; BERRY, 2010; CHEN e RIVIERA, 2004; HERTRAMPF e CORTES, 2004;

Metodologias para determinação de ácido fólico em alimentos

Tendo em vista a obrigatoriedade da fortificação de farinhas e a abundância de alimentos enriquecidos atualmente no mercado, é importante estabelecer métodos analíticos confiáveis para a quantificação de ácido fólico em alimentos, tanto para o controle de qualidade nas indústrias, quanto para fins de fiscalização destes produtos.

O ensaio de folatos em alimentos geralmente envolve três passos: liberação dos folatos da matriz celular, desconjugação do poliglutamato para mono e di-glutamato e a detecção da atividade biológica ou concentração química dos folatos resultantes (ARCOT, 2005).

A determinação de ácido fólico pode ser realizada por métodos biológicos, microbiológicos e químicos, dos quais se destacam os ensaios imunológico e cromatográfico (ALABURDA, 2007). Embora a legislação obrigue a fortificação e exija qualidade neste processo, não há recomendação de um método para análise de ácido fólico em farinhas, neste caso, o mais indicado é recorrer a métodos oficiais como os descritos na *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*.

Biológico

Existem poucos registros deste tipo de metodologia, de acordo com CATHARINO (2004) os métodos biológicos avaliam os efeitos da suplementação de dietas pobres em folatos sobre as características e comportamentos fisiológicos de animais de laboratório, tais como reprodução, crescimento e estocagem no fígado.

Os métodos biológicos são inevitavelmente demorados, dispendiosos e de baixa repetibilidade, raramente utilizados nos dias de hoje, no entanto, são importantes ferramentas para o estudo de vias bioquímicas no organismo (CATHARINO, 2004).

Microbiológico

O método microbiológico é um método tradicional, recomendado pela AOAC para determinação de folatos (método 992.05). Neste método os folatos estimulam o desenvolvimento de bactérias dos gêneros *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium* e *Pediococcus cerevisiae*, o crescimento é proporcional a concentrações de folatos e essa diferença é medida pela turbidez.

Para a etapa de extração, realiza-se uma digestão trienzimática, onde as enzimas protease e a α -amilase são utilizadas para digerir a matriz e liberar os folatos e a enzima conjugase promove a hidrólise dos poliglutamatos para mono e diglutamatos (ALABURDA, 2007).

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 enzimática (ALABURDA, 2007).

Embora o método microbiológico tenha boa sensibilidade de detecção, requer muito tempo para execução da análise. Também é importante o conhecimento da estrutura da amostra uma vez que estes microrganismos utilizam para seu metabolismo apenas as formas monoglutâmicas, ou seja, folatos com mais de um resíduo de ácido glutâmico não podem ser detectados, nesses casos os folatos poliglutamatos devem ser convertidos em monoglutamatos antes de ser iniciada a análise (SENA, 2003).

O método microbiológico é considerado de baixo custo e muito sensível, no entanto é demorado e pode ocorrer contaminação cruzada, quando algumas substâncias presentes nos alimentos podem inibir ou estimular o crescimento de microrganismos.

Químico

Os métodos químicos são utilizados para determinação das concentrações, através de técnicas como gravimetria, volumetria, ou instrumentais.

A literatura descreve diversas técnicas e aplicações na determinação de folatos em alimentos, que podem ser observadas no Anexo 3, onde estão listadas as condições de extração e os principais parâmetros utilizados para a determinação de ácido fólico em alguns alimentos.

CATHARINO (2004) e SILVA (2012) descrevem a reação dos folatos com permanganato, liberando ácido p-aminobenzóico, formando um complexo colorido que pode ser lido a 540 nm. SILVA (2012) validou o método em suplementos vitamínicos, cuja metodologia mostrou-se simples, rápida e específica, podendo ser executado na rotina de um laboratório de controle de qualidade.

Atualmente há grande destaque para os ensaios imunológicos e também para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), descritos em detalhe nos tópicos abaixo.

Imunológico

Imunoensaios são técnicas para detecção ou quantificação de antígenos ou anticorpos, tornando-se tecnologia padrão em medicina laboratorial nas últimas décadas. Recentemente, a utilização de imunoensaio aplicada à química analítica permitiu o

desenvolvimento de técnicas relativamente rápidas para a quantificação de alergênicos, micotoxinas e também de vitaminas em alimentos.

Como exemplo, podemos citar a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) que se baseia nas reações antígeno-anticorpo, detectáveis por meio de reações enzimáticas. O teste de Elisa em sua forma mais simples, chama-se ELISA indireto, onde um antígeno aderido a um suporte sólido é preparado (placa de ELISA), e a amostra é aplicada sobre ele. Se houver anticorpos, ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpo. Ao adicionar o substrato apropriado para a enzima, que é H_2O_2 dissolvida em uma substância química que dá reação colorida quando H_2O_2 é desdobrada, os orifícios onde ocorreram a reação antígeno – anticorpo apresentam coloração.

Existe no mercado o kit Ridascreen® Fast Folsaure, para análise de ácido fólico em leite, leite em pó, nutrição enteral, grãos e cereais, farinhas, vitaminas em pó, misturas, cápsulas e sucos vitaminados, este kit foi utilizado para análise de farinha de trigo (ALABURDA, 2008).

O princípio do método baseia-se na reação antígeno-anticorpo. A placa de microtitulação é revestida com anticorpos específicos contra ácido fólico, onde são adicionadas amostra e padrões de ácido fólico. O ácido fólico livre e conjugado com a enzima competem por sítios de ligação dos anticorpos, os conjugados não ligados são removidos nas etapas de lavagem. A adição de solução de paragem conduz a alteração de cor azul para amarelo, a partir do qual é realizada a leitura da absorbância em 450 nm (ROITT, 1999).

ZHANG et. al (2012) utilizou o kit JET Bio-filtration, na análise de leite, leite em pó e bebida energética. De acordo com este autor, o imunoensaio pode ser considerado um método simples, rápido (1-3h) e específico para análise rápida semi-quantitativa e quantitativa de folatos em alimentos. Dentre as limitações, considera-se a baixa vida útil dos kits, cerca de 12 meses, e não adequado para análise de alimentos com altas concentrações de di e poliglutamatos.

Alaburda et al. (2007) investigaram a precisão do ensaio imunoenzimático (ELISA) e o compararam ao desempenho do método cromatográfico (CLAE-Uv-vis) para determinação de ácido fólico em farinha de trigo, e não observaram diferenças significativas entre os resultados obtidos por ambos os métodos.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Atualmente o método capaz de diferenciar as formas de folato é a cromatografia líquida de alta eficiência, que pode ser acoplado a detector de fluorescência (FD), detector ultra-violeta (UV-VIS), detector de arranjo de diodos (DAD) ou espectrometria de massas (MS). A CLAE permite a execução de uma análise mais rápida quando comparada à análise tradicional (microbiológica).

A técnica de CLAE não responde de forma adequada aos derivados de folatos de cadeia longa, portanto é obrigatoriamente necessária a conversão de poliglutamatos em monoglutamatos (SENA, 2006) e este procedimento pode ser realizado através de conversão enzimática, utilizando a enzima γ -glutamil carboxipeptidase (conjugasse ou folato hidrolase), cujas fontes podem ser pâncreas de frango, rim de porco e plasma de rato (DELLA LUCIA, 2010).

O Plasma de rato apresenta algumas vantagens em relação às demais fontes, como a facilidade de preparo, ampla disponibilidade comercial, baixa concentração de folatos

endógenos e a não necessidade de procedimentos de extração e purificação. Amostras ricas em amidos ou proteínas requerem ainda tratamento com trienzima - mistura de enzimas amilase, protease e conjugase (DELLA LUCIA, 2010).

O processo de extração de ácido fólico geralmente é feito com solução tampão pH 8-9 seguida por digestão com α -amilase, e também pode ser adicionada de metanol e acetonitrila. A limpeza do extrato tem como objetivo melhor identificação da substância de interesse e proporcionar uma maior vida útil para o equipamento. O processo de limpeza pode ser feito por meio de extração em fase sólida, adição de ácido tricloroacético ou por filtração em membrana (CATHARINO & GODOY, 2003).

Alaburda et al. (2008) descreve um método de cromatografia líquida de fase reversa com detecção ultravioleta para determinação de ácido fólico em farinha de trigo enriquecida. O método inclui a extração com solução tampão de ácido tricloroacético e tetraborato, a purificação por extração de fase sólida com cartuchos de permuta aniônica forte.

Para fase móvel pode ser empregado sistema isocrático ou gradiente e geralmente é composta por tampão acetato ou fosfato, acompanhado de acetonitrila ou metanol. Para fase estacionária diversos trabalhos utilizam colunas de fase reversa C18 – octadecilsílica.

A detecção de ácido fólico em CLAE pode ser realizada por UV-visível, cujo comprimento de detecção está na faixa de 254-290 nm (SENA, 2006) por fluorescência ex. 280 nm, em. 360 nm (CATHARINO, 2007) ou detector de massas 442,2 > 295 quantificador e 442 > 176,2 confirmador (MARTINS JUNIOR, 2008)

A cromatografia líquida acoplada ao detector de massas tem sido considerado o ensaio mais preciso, e possui algumas vantagens como a correção de perdas durante o preparo de amostra “clean up” e as variações na eficiência de ionização devido interferência na matriz (MARTINS JUNIOR, 2008).

Martins Júnior et al. (2008) utilizou a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Espectrometria de Massas do tipo triplo quadrupolo (CLAE-EM/EM). O analito foi ionizado com fonte de ionização por electrospray no modo positivo e o espectrômetro de massas foi operado em modo de aquisição por Monitoramento Múltiplo de Reação (Multiple Reaction Monitoring - MRM), com o propósito de detectar duas transições de m/z, uma para quantificação e outra para confirmação. Este autor, realizou a otimização para análise de farinhas fortificadas, utilizando coluna C8 fase reversa, apresentando baixo tempo de retenção (1,70 min), sem interferência de matriz.

A AOAC também descreve métodos cromatográficos (AOAC 2011.06 e 2013.13) para a determinação de folatos totais em fórmulas infantis e fórmulas pediátricas, pela técnica de UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*, com detector de massas.

O método cromatográfico pode ser altamente específico, confiável e requer menos tempo quando comparado ao ensaio microbiológico, porém, requer equipamento de alto custo, além de exigir rigorosa limpeza da amostra antes da análise.

Conclusão

O ácido fólico, assim como todas as vitaminas, é um nutriente essencial ao organismo e deve ser adquirido por meio da alimentação. Atua como coenzima em diversas reações celulares e é imprescindível para o crescimento e desenvolvimentos dos fetos.

Estudos comprovam que a deficiência de ácido fólico na alimentação de gestantes pode acarretar em malformações fetais, levando à anencefalia e espinha bífida. A política nacional de fortificação de farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico tem sido uma estratégia acertada, pois diversos estudos demonstram reduções significativas na prevalência de defeitos do tubo neural após a obrigatoriedade da fortificação. O desenvolvimento de alimentos enriquecidos com ácido fólico leva à necessidade de estudos sobre as metodologias analíticas para a quantificação deste micronutriente nos alimentos.

Foram apresentadas algumas alternativas para determinação de ácido fólico em diferentes matrizes de alimentos. Dentre os ensaios químicos, a cromatografia líquida de alta eficiência possui boa seletividade e rapidez de análise, no entanto, envolve uma etapa de extração complexa. A técnica mais recente LC/MS/MS permite a determinação com alta sensibilidade, seletividade e menor tempo de análise, mas a instrumentação torna a metodologia de alto custo. O ensaio imunológico mostrou-se barato, fácil, mas pouco adequado para determinação de amostras de alimentos. Os ensaios apresentados possuem diversas peculiaridades, a escolha do método ideal depende da finalidade de cada análise, e dos recursos disponíveis no laboratório.

Referências

ALABURDA J; SHUNDO L. Ácido fólicos e fortificação de alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66:95-102, 2007.

ALABURDA J; ALMEIDA A P; SHUNDO L; RUVIERI V; SABINO M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. *Jornal of Food Composition and Analysis*, 21:336-342, 2008.

ARCOT J; SHRESTHA J. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 16:253–266, 2005.

BERRY RJ; BAILEY L; MULINARE J; BOWER C. Folic Acid Working Group. Fortification of flour with folic acid. *Food Nutr Bull*. 2010;31(1 Suppl):S22-S35. doi:10.1177/15648265100311S103

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais, constante do anexo desta Portaria. Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da União.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 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. Brasília: D.O.U. – Diário Oficial da União.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da União.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Brasília: D.O.U. – Diário Oficial da União.

CANADA GAZETTE FOOD DRUG REGULATIONS.SOR/96/527. Online: <http://publications.gc.ca/gazette/archives/p2/1998/1998-11-25/pdf/g2-13224.pdf>. (Acessado em Agosto, 2016).

CATHARINO R; et al. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. *Química Nova*, nº 5, 29: 972-976, 2006.

CATHARINO R; VISENTAINER, J V ; GODOY, H T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 23(3):389-395,2003.

CHEN L T ;RIVERA M A. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutrition Review*, 62:S40-S43, 2004.

COZZOLINO S. Fortificação de Alimentos Processados. *Science & Nutrition*, Kraft Foods, Vol.7,2011.

DELLA L; PINHEIRO-SANT'ANA H M. Otimização de Método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Universidade Federal de Viçosa, 2010.

DIAS, PM et. al. Homocisteína: um fator de risco vascular / Homocysteine: A vascular disease risk fator. *Rev. Cient. AMECS*.10(1):53-58, 2001.

FAO/WHO. Human Vitamin and Mineral Requirements. World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2002.

FOLDER ANVISA – A Importância das farinhas fortificadas com ferro e ácido fólico. Folder Agência Nacional de Vigilância Sanitária e FINATEC/UnB, Brasília, v.1.1, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food Standars: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid.Final Rule. 21 CFR Parts 136,137, and139. Fed. Regist.1996, 61, 8781-8789.

FUJIMORI E; BALDINO C F; SATO A P S; Borges A L V; GOMES M N. “Prevalência e distribuição espacial de defeitos do tubo neural no estado de São Paulo, Brasil, antes e após a fortificação de farinhas com ácido fólico”. 2013, *Cad Saúde Pública*; 29(1):145-54.

GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª edição. Rio de Janeiro. McGraw-Hill, 2003.

HERTRAMPF E, CORTES F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr. Rev.* , 62, S44–S48, discussion S49, 2004.

IOM- Institute of Medicine of National Academies. The National Academies. [acesso 22 ago 2017]. Disponível em: <http://www.nationalacademies.org/DRI>.

MERCK INDEX. Online. Disponível em: <https://www.rsc.org/MerckIndex/monograph/m5518/folicacid2>. (Acessado em Agosto, 2020)

LIMA PALLONE J A; CATHARINO R R; GODOY H T. Determinação de folatos em espinafre – avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, nº1, v.58, 2008.

MARTINS JÚNIOR, et.al. A Validated method to quantify folic in wheat flour samples using liquid chromatography – Tandem mass spectrometry. *Journal Brazilian Chemistry Society*. v.19, 5: 971-977, 2008.

MARTINS W J S. Ácido fólico: Validação do método espectrofotométrico. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

ROITT I; BROSTOFF J; MALE D. *Imunologia*. Ed. Manole, 29: 386-387.

SAYED A R; et al. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* , 82:211–216, 2008.

SENA, C. S. Estabilidade físico-química de ácido fólico em farinha de milho fortificada. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, 2006.

ZHANG T., et al. Determination of folic acid in milk, milk powder and energy drink by an indirect immunoassay. *J Sci Food Agric*; 92: 2297–2304, 2012.

VANNUCCHI H; MONTEIRO T. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes Ácido Fólico, ILSI BRASIL, Vol.10, 2010.