



Fundação Educacional do Município de Assis  
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis  
Campus "José Santilli Sobrinho"

**FERNANDA SANTOS DE OLIVEIRA**

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHAS DE TRIGO  
ENRIQUECIDAS.**

Assis  
2012

**FERNANDA SANTOS DE OLIVEIRA**

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHAS DE TRIGO  
ENRIQUECIDAS**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientador: Idécio Nogueira da Silva

Área de Concentração: Ciências Exatas da Terra

Assis  
2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, Fernanda Santos.

Determinação de ácido fólico em farinhas de trigo enriquecidas / Oliveira Fernanda Santos. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA - Assis, 2012.

80p.

Orientador: Dr. Idécio Nogueira da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Ácido fólico. 2. Farinha de trigo. 3. Fortificação de alimentos.

CDD: 660

Biblioteca da FEMA

# DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHAS DE TRIGO ENRIQUECIDAS

FERNANDA SANTOS DE OLIVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Municipal  
de Ensino Superior de Assis, como  
requisito do Curso de Graduação,  
analisado pela seguinte comissão  
examinadora:

Orientador: Dr. Idécio Nogueira da Silva

Analisador: Dra. Rosângela Aguilar da Silva

Assis  
2012

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Senhor Deus que possibilitou a realização deste sonho. À minha família, que esteve presente em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor, Dr. Idécio Nogueira da Silva, minha gratidão pela orientação, amizade, ensinamentos, e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho.

A todos os professores do curso, que contribuíram para a minha formação, e realização deste trabalho. As professoras Patricia Cavani, Gilcelene Bruzon e Elaine Amorim, por todo carinho e amizade ao longo do curso.

Agradeço também, a professora Mary Leiva, por toda a sua dedicação. Muito obrigado pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula.

Aos todos meus amigos de turma, que estiveram ao meu lado dividindo a busca pelo saber. Compartilhando os momentos de dor e fraqueza, e principalmente os momentos de alegria. Clóvis, Grazielle, João Artur, Louisy, vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

Ao meu grande amigo Marcelo Caetano “morango”, que esteve ao meu lado desde os primeiros dias do curso, me fazendo rir, me dando força, pagando almoços, Xerox e tudo o que fosse preciso para me ajudar. Sem você eu não teria chegado até aqui, OBRIGADO!

Ao meu namorado Lucas, por todo o auxílio na realização prática deste trabalho. Por toda a paciência, pelos ensinamentos e principalmente por todo o amor a mim dedicado.

Aos colegas estagiários do laboratório de Química: Rafael, Mateus e Maria Angélica, que dividiram comigo os dias ruins e também os dias de conquista. Obrigado pela ajuda e incentivo.

Aos familiares, em especial minha amada mãe Edna, meu ilustre pai Edmilson, e meu irmão e amigo Danilo, obrigado pelo apoio (emocional e financeiro), carinho, incentivo, paciência e principalmente pelo amor incondicional, de onde sempre tirei a força e a coragem necessária para vencer.

## RESUMO

O ácido fólico, também conhecido por Bc, B<sub>9</sub> ou M é uma importante vitamina hidrossolúvel do complexo B. Dentre os principais problemas causados pela falta de ácido fólico estão às malformações congênitas, problemas cardíacos, e anemia megaloblástica. O termo ácido fólico é utilizado para designar a forma sintética da vitamina, já o termo folato representa as diversas estruturas que ocorrem naturalmente nos alimentos. As principais fontes de folato são os alimentos de origem vegetal e animal, especialmente fígado, espinafre, aspargo e brócolis. Hoje, diversos países que sofrem com doenças ocorridas pela falta de ácido fólico estão suplementando os alimentos com essa vitamina. No Brasil em 2002 a ANVISA através da resolução RDC N<sup>o</sup> 344, de 13 de dezembro de 2002, tornou obrigatório a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro. O objetivo do trabalho foi determinar o teor de ácido fólico em farinhas de trigo enriquecidas. A determinação foi realizada através da técnica de cromatografia de coluna, seguido de leitura no espectrofotômetro. Inicialmente analisaram-se as amostras do padrão de ácido fólico, adicionando-se 75 µg da vitamina na coluna cromatografica. Os valores experimentais encontrados foram de 0,389 µg de ácido fólico na primeira análise com o padrão de ácido fólico, e 0,187 µg de ácido fólico na segunda análise. Foram analisadas amostras de duas diferentes marcas de farinha de trigo enriquecidas. Os valores experimentais obtidos foram de 43,5042 µg de ácido fólico em 50 g de farinha de trigo para a amostra A e de 82,7265 µg de ácido fólico em 50 g de farinha de trigo para a amostra B. A legislação prevê que a cada 50 g de farinha de trigo, deve haver 75 µg de ácido fólico. Na amostra de farinha B, o valor encontrado estava próximo do declarado no rótulo, porém são necessários melhores estudos para controlar os fatores responsáveis pela baixa concentração de ácido fólico obtido. É necessário também, o uso de outros métodos quantitativos, como o método de cromatografia líquida de alta eficiência, para discutir e comparar com os resultados obtidos neste trabalho.

**Palavras chaves:** Ácido fólico; Farinha de trigo; Fortificação de alimentos.

## ABSTRACT

Folic acid, also known as Bc, B<sub>9</sub> and M is an important water-soluble vitamin B-complex. Among the major problems caused by a lack of folic acid are to congenital malformations, heart problems, and megaloblastic. The term folic acid is used to designate a synthetic form of vitamin folate as the term representing the various structures that occur naturally in. The main sources of folate are foods of plant and animal products, especially liver, spinach, asparagus and broccoli. Today, many countries that suffer from diseases that occur due to lack of folic acid are supplementing foods with this vitamin. In Brazil in 2002 by ANVISA RDC Resolution N<sup>o</sup>. 344 of December 13, 2002, will become mandatory flour fortification of maize and wheat with iron and folic acid. The aim of this study was to determine the levels of folic acid in enriched wheat flour. The determination was performed by column chromatography technique, followed by reading in the spectrophotometer. Initially we analyzed samples from the standard folic acid, adding 75 µg of vitamin column chromatography. The experimental values found were 0.389 µg of folic acid in the first analysis with standard folic acid, and 0.187 µg of folic acid in the second analysis. Samples from two different brands of wheat flour enriched. The experimental values obtained were 43.5042 µg of folic acid in 50 g of wheat flour for sample A and 82.7265 µg of folic acid in 50 g of wheat flour for sample B. The legislation provides for every 50 g of wheat flour, there should be 75 µg of folic acid. In flour sample B, the value found was near the declared on the label, but better studies are needed to control the factors responsible for the low levels of folic acid obtained. It is necessary to also use other quantitative methods, the method of high performance liquid chromatography to discuss and compare with results obtained in this study.

**Keywords:** Folic acid; Wheat flour; Fortification of foods.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Principais formas ativas e funções das vitaminas.....	18
Tabela 2	- Doenças ocasionadas pela deficiência de vitaminas.....	19
Tabela 3	- Funções das diferentes formas de folato.....	27
Tabela 4	- Valores de absorvência da radiação eletromagnética na região do ultravioleta de alguns folatos: comprimentos de onda máximos e absorvências.....	28
Tabela 5	- Necessidades diárias recomendadas para a ingestão de folatos.....	33
Tabela 6	- Valores das absorvências lidas nas análises realizadas com o padrão de ácido fólico e com as amostras A e B de farinha de trigo.....	57
Tabela 7	- Teor de ácido fólico nas amostras de farinha de trigo avaliadas.	65

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura Química do ácido fólico.....	26
Figura 2	– Aspecto do ácido fólico.....	29
Figura 3	– Estados de oxidação do ácido fólico.....	30
Figura 4	– Absorção e ativação do ácido fólico.....	35
Figura 5	– Espectro de absorção UV do ácido fólico.....	55
Figura 6	– Espectro de absorção UV do ácido fólico padrão.....	55
Figura 7	– Placa de sílica revelada.....	56
Figura 8	– Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna de sílica gel 60 – Análise 1 com o padrão de ácido fólico.....	58
Figura 9	– Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna de sílica gel 60 – Análise 2 com o padrão de ácido fólico.....	58
Figura 10	– Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna de sílica gel 60 – Análise com a amostra A.....	59
Figura 11	– Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna de sílica gel 60 – Análise com a amostra B.....	60

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>VITAMINAS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS.....</b>	<b>21</b>
3.1	FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM FERRO.....	22
3.2	FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ÁCIDO FÓLICO.....	23
3.3	FORTIFICAÇÃO DE FARINHAS DE MILHO E TRIGO.....	25
<b>4.</b>	<b>ÁCIDO FÓLICO .....</b>	<b>26</b>
4.1	ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO.....	28
4.2	FUNÇÕES.....	30
4.3	FONTES ALIMENTARES.....	32
<b>4.3.1</b>	<b>Ingestão Recomendada.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Biodisponibilidade.....</b>	<b>33</b>
4.4	ABSORÇÃO E METABOLISMO.....	34
4.5	DEFICIÊNCIAS DE FOLATOS.....	35
<b>4.5.1</b>	<b>Deficiência de folatos na gestação.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Deficiência de folatos e anemia megaloblástica.....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO.....</b>	<b>39</b>
5.1	MÉTODO MICROBIOLÓGICO.....	39
5.2	MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	40
<b>6.</b>	<b>VITAMINAS: UM TEMA MOTIVADOR PARA O ENSINO MÉDIO.....</b>	<b>42</b>
6.1	ATIVIDADES EXPERIMENTAIS NO ENSINO MÉDIO.....	43

6.1.1	<b>Material utilizado.....</b>	<b>45</b>
6.1.2	<b>Descrição do experimento.....</b>	<b>46</b>
6.1.3	<b>Entendendo o Experimento.....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
7.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	48
7.2	EQUIPAMENTOS.....	49
7.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	50
7.3.1	<b>Escolha da fase móvel.....</b>	<b>50</b>
7.3.2	<b>Preparação da coluna de sílica.....</b>	<b>50</b>
7.3.3	<b>Análise da solução padrão de ácido fólico.....</b>	<b>51</b>
7.3.3.1	Leitura das amostras do padrão no espectrofotômetro.....	52
7.3.4	<b>Preparo das soluções.....</b>	<b>52</b>
7.3.5	<b>Tratamento da amostra.....</b>	<b>53</b>
7.3.6	<b>Extração do ácido fólico.....</b>	<b>53</b>
7.3.7	<b>Análise da amostra.....</b>	<b>53</b>
7.3.7.1	Leitura das amostras no espectrofotômetro.....	54
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
8.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NAS SOLUÇÕES PADRÃO E NAS AMOSTRAS DE FARINHA DE TRIGO.....	60
8.1.1	<b>Determinação da concentração de ácido fólico nas soluções padrão.....</b>	<b>61</b>
8.1.2	<b>Determinação da concentração de ácido fólico nas amostras A e B da farinha de trigo enriquecidas.....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>

<b>REFERÊNCIAS:.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 1 - REGULAMENTO TÉCNICO PARA FORTIFICAÇÃO DAS FARINHAS DE TRIGO E DAS FARINHAS DE MILHO COM FERRO E ÁCIDO FÓLICO.....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência de vitaminas é um sério problema de nutrição e saúde pública que atinge o mundo todo, principalmente os países em desenvolvimento, sendo que crianças em idade pré-escolar, adolescentes e mulheres em idade fértil são os mais atingidos (ELIAS, 2010, p.11).

Vitaminas são grupos de compostos orgânicos indispensáveis ao crescimento e funções normais dos animais superiores, sendo necessárias na dieta em pequenas quantidades, já que são precursores das coenzimas, cujas concentrações celulares são muito pequenas (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.87).

Dentre as vitaminas, destaca-se hoje o ácido fólico, uma vitamina hidrossolúvel, do complexo B muito importante para a manutenção do organismo humano, sendo também conhecido por B<sub>9</sub>, Bc ou M. Sua deficiência causa a anemia megaloblástica e aumenta a ocorrência de defeitos no tubo neural, que são defeitos congênitos que se referem ao desenvolvimento incompleto da medula espinhal ou do cérebro (PANE, 2007, p.5; SANCHO et al., 2010 p. 636).

O ácido fólico é encontrado como folipoliglutamatos reduzidos em diversos alimentos de origem vegetal e animal, tais como: fígado, cogumelos e vegetais folhosos verdes (especialmente espinafre, aspargo e brócolis). Carne bovina magra, batatas, pão de trigo integral, suco de laranja e feijões secos também são boas fontes. Ocorrem perdas de 50% a 90% de ácido fólico durante o armazenamento, cozimento ou processamento em altas temperaturas (MAHAN, 2005, p.101).

Atualmente países que sofrem com doenças ocorridas pela falta de ácido fólico estão suplementando os alimentos com essa vitamina. Essa suplementação vem ganhando espaço, pois visa prevenir doenças decorrentes de sua carência, como também adicionar valor agregado aos produtos enriquecidos (CATHARINO; GODOY, 2001, p.326).

A fortificação alimentar é um recurso utilizado mundialmente, cujo objetivo é corrigir deficiências nutricionais de uma população, alcançando ampla parte dos indivíduos, sem mudar necessariamente seus hábitos alimentares (ELIAS, 2010, p.11).

Em 2002 a ANVISA através da resolução RDC N° 344, de 13 de dezembro de 2002, tornou obrigatório no Brasil a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro. Para cada 100 g de farinha de milho ou trigo deve haver 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2003).

Tendo em vista a importância do ácido fólico para a saúde da população, o crescente interesse industrial em alimentos fortificados e as determinações da ANVISA para a fortificação de farinha de trigo com ácido fólico, o objetivo deste trabalho foi determinar o teor de ácido fólico em farinhas de trigo enriquecidas comercializadas na região de Assis.

## 2. VITAMINAS

Vitaminas compreendem um grupo diverso de compostos orgânicos, essências e biologicamente ativos, sendo necessárias na dieta em pequenas quantidades, já que são precursores das coenzimas, cujas concentrações celulares são muito pequenas (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.87; PANE, 2007, p.1).

O termo “vitamina” foi aplicado pela primeira vez a um micronutriente orgânico, que era necessário para prevenção da doença beribéri (doença provocada por carência nutricional). Como este micronutriente tinha as propriedades de uma amina, Casimir Funk, bioquímico polonês que o purificou pela primeira vez deu-lhe a denominação de vitamina, denotando uma amina essencial para a vida. Posteriormente, quando um grande número de micronutrientes orgânicos essências foi descoberto, o termo vitamina passou a designá-los genericamente, mesmo sabendo que nem todos eles são aminas (LEHNINGER, 1984, p.185).

As vitaminas não são fontes de calorías e também não contribuem de modo significativo para o acúmulo de massa corporal. Classicamente são divididas de acordo com sua solubilidade em lipossolúveis e hidrossolúveis (OLIVEIRA, 1998, p.192).

As vitaminas lipossolúveis constituem um grupo de substâncias orgânicas com estrutura variada, solúveis em solventes orgânicos e sem valor energético. O organismo não as sintetiza, ou sintetiza em quantidade insuficiente, sendo necessárias adquiri-las dos alimentos. Porém a ingestão de doses elevadas ou maciças dessas vitaminas traz risco de toxicidade ao organismo, superior à quele referente às vitaminas hidrossolúveis (OLIVEIRA, 1998, p.168).

São geralmente absorvidas passivamente e devem ser transportadas com o lipídeo da dieta. Geralmente são encontradas nas porções lipídicas da célula, como as membranas e gotículas de lipídeos. São normalmente excretadas com as fezes através da circulação êntero-hepática. Não apresentam nitrogênio em sua



composição. Correspondem a essa classe as vitaminas A, D, E e K (AGOSTINI, 1996, p.9; MAHAN, 2005, p.73).

A vitamina A é fundamental para o crescimento e desenvolvimento do ser humano. Atuando na manutenção da visão, no funcionamento adequado do sistema imunológico e mantendo saudáveis as mucosas, agindo como barreira contra as infecções (ZANCUL, 2004, p.47). Já a vitamina E é o antioxidante lipossolúvel mais importante na célula. Desempenha esse papel por meio de sua capacidade de reduzir radicais em metabólitos não prejudiciais, através da doação de um hidrogênio a eles (varredura de radicais livres) (MAHAN, 2005, p.85).

As vitaminas hidrossolúveis desempenham uma atuação essencial em muitos aspectos do metabolismo, incluindo o metabolismo dos carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. São absorvidas por mecanismo passivo e ativo, transportadas por carreadores, não são armazenadas com facilidade pelo organismo animal, e juntamente com seus metabólitos são excretadas na urina. Apresentam solubilidade em água, possuem estrutura química diversificada e geralmente atuam como coenzimas. Nesta classe estão às vitaminas do complexo B e vitamina C (AGOSTINI, 1996, p.9; MAHAN, 2005, p.73).

Entre suas diversas funções, a vitamina C tem capacidade de ceder e receber elétrons, o que lhe confere um papel muito importante: o de antioxidante (OLIVEIRA, 1998, p.191).

As vitaminas do complexo B são: B<sub>1</sub>, ou tiamina; B<sub>2</sub>, ou riboflavina; B<sub>6</sub> ou piridoxina; B<sub>12</sub> ou cianocobalamina; niacina; ácido fólico; ácido pantotênico e biotina. São encontradas geralmente nos mesmos alimentos, e durante muito tempo imaginou-se que se tratasse de uma única vitamina. A deficiência de ingestão de uma das vitaminas desse complexo pode alterar a utilização das demais (BORSOI, 2004 p.24). Essas vitaminas podem ser amplamente encontradas nos fígados e nas leveduras, sendo que os cereais integrais, as leguminosas, as castanhas, os ovos, o leite as vísceras e os peixes são também fontes importantes (AGOSTINI 1996, p.10).

A atividade biológica de cada vitamina pode ser associada a um, ou até mesmo vários compostos diferentes, chamados de vitâmeros. Além dos vitâmeros, algumas vitaminas apresentam precursores, ou pró-vitaminas, que são substâncias naturais, convertidas em vitaminas através do metabolismo normal do organismo (MORESCHI, 2006, p.26).

Em geral, as vitaminas apresentam diversificadas funções, podendo atuar como coenzimas ou seus precursores (niacina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido pantotênico, vitamina B6, B12 e folatos), como componentes do sistema de defesa antioxidante (vitamina E, ácido ascórbico, e alguns carotenóides), podendo atuar também como fatores envolvidos na regulação genética (vitaminas A e D e várias outras) e em funções específicas como no caso da vitamina A na visão (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010, p.346). A Tabela 1 apresenta as formas ativas das vitaminas e suas respectivas funções.

<b>Vitamina</b>	<b>Forma ativa (ou forma coenzímica)</b>	<b>Função</b>
A	11-cis retinal, ácido retinóico e retinol.	Mecanismo da visão e integridade epitelial.
D	1,25-dihidroxi-colecalciferol.	Metabolismo de Ca e P.
E	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -tocoferol.	Proteção contra oxidação dos lipídeos de membranas.
K	2-metil-1,4-naftoquinona; 2-metil-3-fenil-1,4 naftoquinona.	Cofator em reações de carboxilação. Ativa em vários fatores sanguíneos.
C	Ácido L-ascórbico e deidroascórbico.	Coenzima - Hidroxilação da prolina e lisina na síntese do colágeno; Ação Antioxidante.
B <sub>1</sub>	TPP (tiamina pirofosfato).	Transferência de aldeídos. Metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Regula canal Cl <sup>-</sup> na condução do nervo
B <sub>2</sub>	FMN e FAD	Transferência de Hidrogênio. Coenzima em reações de oxido-redução.
B <sub>3</sub>	NAD e NADP	Transferência de Hidreto. Coenzima em reações de oxido-redução. Regulação Ca intracelular.
B <sub>5</sub>	Coenzima A	Transferência de grupos acila. Síntese e metabolismo ácidos graxos.

B <sub>6</sub>	PLP (piridoxal fosfato)	Transferência de grupos amino. Coenzima p/ muitas enzimas envolvidas no metabolismo celular Atua no sistema imune.
Biotina	Biocitina	Transferência de CO <sub>2</sub> . Coenzima em reações de carboxilação na gluconeogênese, síntese de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos e catabolismo de ácidos graxos.
B <sub>9</sub>	Tetraidrofolato	Transferência de Carbono Síntese de purina e pirimidina. Doa grupo metil à homocisteína para formação de metionina.
B <sub>12</sub>	Metil cobalamina Adenosil cobalamina	Transferência de Metil. Reação de isomerização, desidrogenação e metilação (homocisteína); Ação no metabolismo do folato.

**Tabela 1 – Principais formas ativas e funções das vitaminas.**

A tabela 2 abaixo mostra as doenças ocasionadas pela deficiência de diferentes vitaminas.

<b>Vitamina</b>	<b>Doenças</b>
A	Xeroftalmia, cegueira noturna, pele áspera e seca ou queratinização da pele.
B <sub>1</sub>	Perda de apetite, fraqueza, irritabilidade e dificuldade p/ caminhar; dano do nervo periférico (beribéri) ou lesões do sistema nervoso central.
B <sub>2</sub>	Feridas na boca e nariz, inchaço nos lábios e língua. Diminuição da resistência a doenças comuns. Dermatite seborréica.
B <sub>3</sub>	Disenterias graves, alterações mentais, psicose depressiva, dermatite foto-sensível (Pelagra).
B <sub>5</sub>	Lesões na pele e inibição do crescimento. Cansaço, problemas de coordenação motora, gastrintestinais e suprarenais. Dano do nervo periférico.
B <sub>6</sub>	Irritabilidade, insônia, depressão, dermatite e TPM. Desordens do metabolismo do aminoácido, convulsões.

B <sub>9</sub>	Má formação do tubo neural em fetos. Anemia megaloblástica.
B <sub>12</sub>	Anemia perniciosa ou macrocítica.
C	Escorbuto. Diminuição da resistência a infecções, cansaço em geral, dificuldades de restabelecimento pós-cirúrgico e gangrena.
D	Raquitismo, deformações no peito, na coluna vertebral e na pélvis. Dentes fracos. Aumento de risco de osteoporose. Osteomalacia.
E	Dermatite e problemas na produção de hormônios sexuais. Disfunção neurológica séria (muito raro).
H	Perda de apetite, náuseas, dores musculares, anemia e dermatites. Metabolismo do carboidrato e gordura prejudicados.
K	Hemorragias, que podem acontecer após longos períodos de tratamento com antibióticos. Dificuldade na coagulação do sangue.

**Tabela 2 – Doenças ocasionadas pela deficiência de vitaminas.**

### 3. FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS

A alimentação constitui fonte de cerca de 40 nutrientes para os seres humanos. Esses nutrientes são divididos em componentes alimentares produtores de energia (carboidratos, lipídios e proteínas), fontes de aminoácidos essenciais e não essenciais (proteínas), ácidos graxos insaturados essenciais (gorduras), sais minerais e vitaminas (compostos orgânicos hidrossolúveis e lipossolúveis) (CREPALDI, 2006, p.3).

Uma boa alimentação deveria conter todos os nutrientes de que o ser humano necessita. Entretanto certos nutrientes nem sempre estão disponíveis para a população, ou nem todos podem ter acesso a eles. Dentre esses nutrientes deficientes na alimentação são considerados mais importantes os aminoácidos essenciais, as vitaminas e os minerais. A prática de fortificar os alimentos é uma maneira de suprir a carência de micronutrientes e pode ser utilizada para toda a população ou direcionada a determinados grupos populacionais (CAMPÊLO, 2004, p.16; TORRES, et al., 1995, p.302; ZANCUL, 2004, p.45).

Fortificar os alimentos constitui uma medida de baixo custo, grande efetividade e flexibilidade e rápida aplicação. Além disso, como as doses de fortificante adicionadas aos alimentos são pequenas, os riscos de efeitos colaterais e toxicidades são mínimos (TUMA et al., 2003, p.31).

Do ponto de vista nutricional, existem três motivos principais para se adicionar nutrientes em um alimento, que são: repor as perdas ocorridas durante o processamento, reproduzir a composição de um alimento que um medicamento pretende substituir e redistribuir nutrientes pouco encontrados seja por razões econômicas, culturais ou geográficas (CAMPÊLO, 2004, p.27).

Como visto, a fortificação apresenta várias vantagens, mas é também um processo onde se encontram algumas dificuldades, tais como o consumo massivo do alimento, sua distribuição e preço. A eficiência da fortificação para prevenir ou

corrigir doenças específicas causadas pela falta de nutrientes, é amplamente reconhecida. Entretanto, os programas de fortificação devem ser colocados em prática em conjunto com outras ações, que levem a combater ou a evitar outros problemas nutricionais, usando-se também uma alimentação composta por alimentos em seu estado natural (ZANCUL, 2004, p.46).

A seleção correta do tipo de composto que vai ser utilizado na fortificação é de extrema importância, assim como o alimento usado como veículo. Cada fortificante possui suas vantagens e desvantagens que devem ser analisadas de acordo com as características de cada alimento. Solubilidade, reatividade química, biodisponibilidade e custo são aspectos importantes na seleção de um composto (SAMPAIO, 2009, p.33).

Segundo Sena (2006, p.22), a legislação brasileira permite o enriquecimento de alimentos com minerais, vitaminas e aminoácidos. Cada grupo deve obedecer aos requisitos mínimos para uso em fortificação, sendo que os minerais e as vitaminas são os nutrientes mais usados para o enriquecimento de alimentos, e o nível em que podem ser adicionados tem como referência de valores as RDA (recomendação de doses alimentares).

### 3.1 FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM FERRO

Atualmente, muitos alimentos são enriquecidos com ferro. Em 1860, Boussingault admitiu o ferro como nutriente essencial, desde então, muitos estudos sobre a anemia ferropriva e o comportamento do mineral têm sido amplamente divulgados (ELIAS, 2010, p.16).

No Brasil, desde 2002, o Ministério da Saúde, através da Comissão Interinstitucional de Condução e Implementação das Ações de Fortificação, passou a considerar as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Panamericana de Saúde (OPAS) para fortificação de produtos alimentícios com ferro

e ácido fólico (KIRA et al., 2006, p.182).

Com o objetivo de reduzir a anemia ferropriva, que representa um grave problema nutricional no país, o Ministério da Saúde, por meio de um Regulamento Técnico, tornou obrigatória a adição de ferro e de ácido fólico em produtos largamente consumidos pela população brasileira, tais como, farinhas de trigo e farinhas de milho (KIRA et al., 2006, p.182).

Na adição de um composto de ferro, é preciso avaliar possíveis mudanças que possam ocorrer com o tempo ou devido a condições adversas de estocagem, como coloração, sabor e aparência nos alimentos (SAMPAIO, 2009, p.33). Os produtos lácteos e os cereais são considerados os principais veículos para serem fortificados com ferro, sendo que, leite e cereais apresentam vantagens, pois são muito utilizados e bem adaptados à alimentação de crianças, no entanto, existem outros produtos, tais como: sal, açúcar, condimentos e café que também podem ser fortificados com ferro (ZANCUL, 2004, p.47).

Para a fortificação de ferro a legislação permite a utilização de sulfato ferroso desidratado (seco), fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, sódio ferro etileno diamino tetracético (NaFeEDTA), ferro bisglicina quelato e outros compostos de biodisponibilidade não inferior a dos compostos permitidos (ANVISA, 2003).

### 3.2 FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ÁCIDO FÓLICO

Os folatos, compostos com estrutura química e atividade biológica semelhante a do ácido fólico estão envolvidos em várias reações metabólicas importantes, sendo essencial para o bom funcionamento do organismo. A deficiência de folatos está associada a males como doenças cardiovasculares, falhas na formação do tubo neural em fetos, mal de Alzheimer e problemas neurológicos. Na tentativa de evitar estas e outras moléstias decorrentes da carência desta vitamina, tem-se utilizado a fortificação de alimentos com ácido fólico (PANE, 2009, p.3).

Desde a comprovação de que defeitos do tubo neural poderiam ser prevenidos pela suplementação da dieta materna com ácido fólico, muitas medidas vêm sendo adotadas, para alcançar a diminuição deste defeito congênito através da fortificação de alimentos. Nos EUA, em 1998 foi adotada a fortificação de produtos a base de cereais, no nível de 140 µg de ácido fólico para cada 100 g de produto. Outros países, como o Chile e Grã-Bretanha, a partir de 2000 também regulamentaram a fortificação de farinhas com ácido fólico (FERREIRA, 2005, p.19; SENA, 2006, p.24).

Como forma preventiva, o Brasil adotou medida semelhante, a ANVISA através da resolução RDC n<sup>o</sup> 344 de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatório no Brasil a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro. Para cada 100 g de farinha de milho ou trigo deve haver 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro (ANVISA, 2003).

A fortificação de farinha de milho e trigo com ácido fólico tem o objetivo de alcançar o maior número de mulheres em idade fértil, pois sabe-se que muitas gestações não são planejadas, e que a formação do tubo neural no embrião ocorre cerca de 22-28 dias após a concepção, período em que grande parte das mulheres ainda não sabe que está grávida. Sendo assim a fortificação estaria fornecendo um aumento na ingestão de ácido fólico no período crítico para a formação do tubo neural (SENA, 2006, p.24).

Segundo Ferreira (2005, p.19), a taxa de diminuição de defeitos de tubo neural nos EUA, após a introdução de farinhas enriquecidas com ácido fólico, foi em torno de 20% a 30%, e essa redução foi atribuída à fortificação alimentar.

O interesse na fortificação de alimentos com o ácido fólico está se tornando uma importante área de estudo, afetando diretamente os fabricantes de alimentos, em termos de compatibilidade do nutriente com os componentes base da matriz e de como sua estabilidade química é afetada, pela estocagem, pelas variáveis de processamento encontradas no dia-a-dia, seja em escala doméstica ou industrial (CREPALDI, 2006, p.11).



### 3.3 FORTIFICAÇÃO DE FARINHAS DE MILHO E TRIGO

O ácido fólico e o sulfato ferroso são complementos vitamínico-alimentares importantes na prevenção de doenças ocasionadas pela deficiência dos mesmos, na formação de tecidos essenciais na gestação (aumento de produção de hemácias por parte materna) e nos tecidos que vão constituir o feto. As alterações congênitas relacionadas à carência desses complementos durante a gestação tem sido alvo de preocupações e vem sendo discutido por vários especialistas da área da saúde (GAMA, FERREIRA, 2010, p.578).

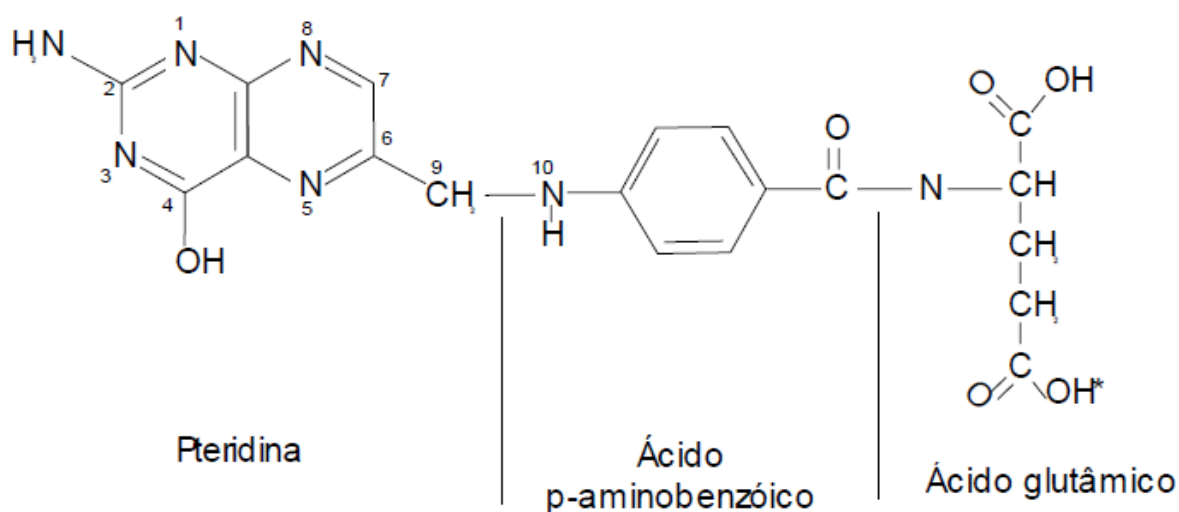
Preocupada com os prejuízos causados pela ausência de ferro e ácido fólico na alimentação da população brasileira, a ANVISA publicou resolução tornando obrigatória a adição desses nutrientes em farinhas de milho e trigo comercializadas em todo o país. As empresas tinham até junho de 2004 para adequarem a esta medida. A resolução previa que as farinhas de trigo e milho, bem como os produtos que utilizam essas matérias-primas em sua fabricação, tais como pães, biscoitos, macarrão, misturas para bolo e salgadinho tivessem uma quantidade maior de ácido fólico e ferro (ANVISA, 2003).

A resolução determinou também que nos rótulos dos produtos deveria constar a expressão: fortificada (o) com ferro e ácido fólico/ enriquecida (o) com ferro e ácido fólico/ rica (o) com ferro e ácido fólico. Foram excluídas destas normas as farinhas de biju ou farinha de milho obtida por maceração; flocão; farinha de trigo integral e farinha de trigo durum, devido às limitações dos processos tecnológicos (FERREIRA, 2005, p.21).

Mais de 600 milhões de toneladas de farinha de trigo e milho, no mundo, são moídas por ano e consumidas como pães, macarrão e outros produtos. Assim sendo, a fortificação de farinhas de trigo e milho, é uma estratégia eficaz, simples e barata de suprir às dietas de grandes segmentos da população mundial (PLANTIER, 2010, P.27).

## 4. ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico é uma importante vitamina hidrossolúvel, pertencente ao grupo de vitaminas do complexo B, também conhecido por B<sub>C</sub>, B<sub>9</sub> ou M. É formado por três componentes: um composto nitrogenado de pteridina, uma molécula de ácido para-aminobenzóico e uma de ácido glutâmico. Apresenta peso molecular 441,40 g/mol e fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>, conforme mostra a figura 1 (TORRES, 2005, p.68; PANE, 2007 p.5).



**Figura 1 – Estrutura química do ácido fólico (In: SENA, 2006, p.25).**

Em 1941, o nome ácido fólico foi sugerido por Mitchell e colaboradores (do latim, *folium* que significa folha), após isolá-lo de vegetais folhosos (SENA, 2006 p.25). Ainda nessa década, foi possível isolar, cristalizar e identificar a estrutura desta vitamina, como também, elaborar formas sintéticas para o uso no tratamento de enfermidades (RAMOS; MAGNONI; CUKIER, 2011, p.20).

O termo ácido fólico é usado para caracterizar a forma totalmente oxidada não presente naturalmente nos alimentos, ou seja, é a forma sintética utilizada na

fortificação dos alimentos, enquanto que o termo folato representa estruturas similares à do ácido fólico, porém que ocorrem naturalmente nos alimentos na forma reduzida como derivados de poliglutamatos, contendo de 2 a 7 unidades de ácido glutâmico. Além da estrutura similar, eles também apresentam atividade vitamínica semelhante á deste ácido (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.96).

Os folatos diferem do ácido fólico em três aspectos:

- Possuem resíduos adicionais de unidades de glutamatos (poliglutamatos).
- Sofrem redução para di ou tetra-hidroderivados.
- Podem conter unidades carbônicas adicionais, tais como, radicais metil, formil, metileno ligados aos átomos de nitrogênio (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.96).

Cada uma das diferentes formas de folatos que são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano desempenha um papel específico no metabolismo intracelular, conforme apresentado na Tabela 3 (LIMA; GODOY; CATHARINO, 2003, p.132).

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

**Tabela 3 – Funções das diferentes formas de folato.**

Os folatos absorvem na região do ultravioleta e apresentam fluorescência, já o ácido fólico absorve radiação eletromagnética na região do ultravioleta, contudo não apresenta fluorescência. Possui diversos grupos ionizáveis com constantes de dissociação ácida variando dentro de uma extensa faixa de pH, de forma que as medidas de absorvância dependem drasticamente do pH do meio. Na tabela 4 estão representados os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de absorção na região eletromagnética do ultravioleta e as respectivas absortividades em solução tampão fosfato 0,10 M a pH 7 (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.96).

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

**Tabela 4 - Valores de absorvância da radiação eletromagnética na região do ultravioleta de alguns folatos: comprimentos de onda máximos e absortividades.**

#### 4.1 ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico caracteriza-se como um pó amarelo ou amarelo-alaranjado (Figura 2), inodoro, insípido e ligeiramente hidrossolúvel, sendo praticamente insolúvel em solventes como acetona, clorofórmio e éter. Sofre rápida dissolução em soluções alcalinas de hidróxidos e carbonatos, é sensível ao oxigênio, à luz e ao pH ácido e neutro, sendo estável em pH alcalino (CÂMPELO, 2004, p.25; SENA, 2006, p.26).

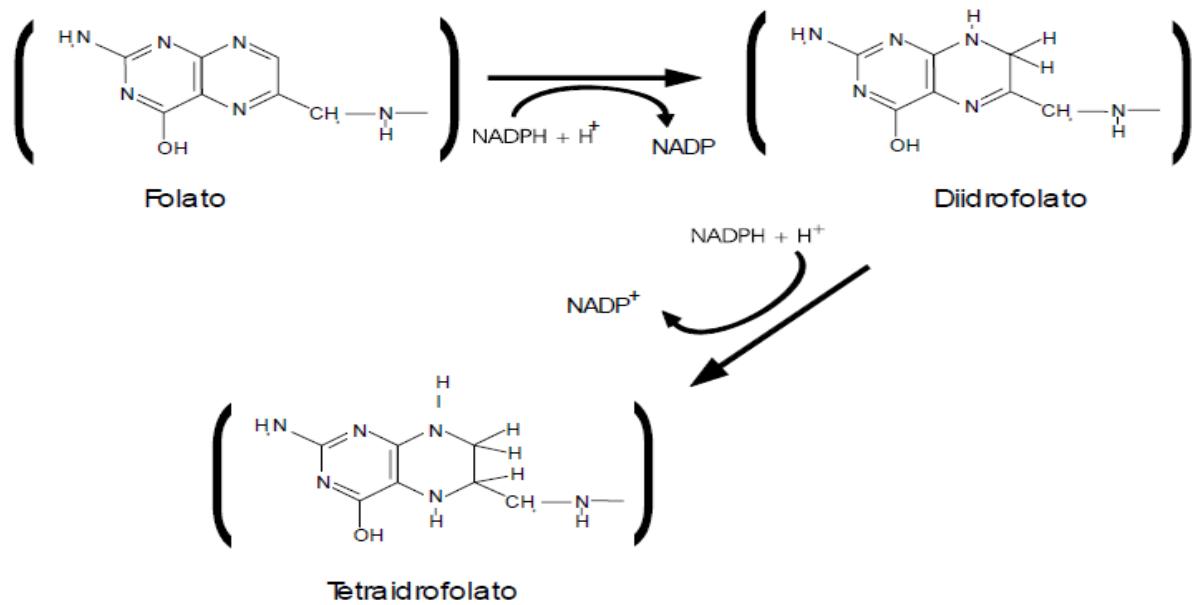


**Figura 2 – Aspecto do Ácido fólico**

Segundo Alaburda (2007, p.96), a sua estabilidade, também, depende do tipo de tampão em que ele é armazenado. Sendo que boa parte das metodologias para análise deste ácido em alimentos utiliza tampão fosfato nas etapas de extração como de separação e quantificação.

Os alimentos estão sujeitos à perda de nutrientes desde a colheita, transporte, pré-tratamento, processamento e armazenamento do produto até o preparo final para o consumo (MURATE, 2001, p.26). O ácido fólico apresenta boa retenção durante o processamento e armazenamento de alimentos fortificados e em pré-misturas, ocorrendo pouca degradação durante o armazenamento prolongado, em baixa umidade. Porém, ocorrem grandes perdas de folato durante o processamento e preparação doméstica de alimentos. Além de serem suscetíveis à degradação oxidativa, os folatos também podem ser perdidos por lixiviação por cocção, em meio aquoso (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010, p.391).

A estabilidade dos folatos é regida pela natureza química do anel de pteridina, sem ser influenciada pela cadeia de poliglutamatos. O ácido fólico pode sofrer redução e apresentar três estados diferentes de oxidação no anel de pteridina, conforme a figura 3 (SENA, 2006, p.26).



**Figura 3 - Estados de oxidação do ácido fólico (In: SENA, 2006, p.26).**

Como ácido fólico é a forma mais oxidada do anel de pteridina, ele é considerado o congêneres mais estável, já o tetraidrofolato, que é a forma mais reduzida do anel de pteridina, é considerado a forma mais instável do grupo dos folatos (SENA, 2006, p.28).

Em relação ao seu ponto de fusão, não há um valor estabelecido, mas as alterações na molécula são observadas em temperatura acima de 140-148°C, que culmina com a carbonização do composto à 250-262°C (SENA, 2006, p.29).

## 4.2 FUNÇÕES

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, sendo assim é pouco armazenada no organismo. É fundamental para as reações metabólicas específicas no meio celular e essencial para o funcionamento e crescimento normal do organismo (MAGNONI; CUKIER; RAMOS, 2011, p.21).

Entretanto até poucos anos atrás, ele apresentava funções pouco conhecidas. Hoje,

os folatos e o ácido fólico são conhecidamente fundamentais no metabolismo dos aminoácidos e na síntese do DNA e do RNA. É também assumida a importância dessa vitamina na prevenção de defeitos no tubo neural fetal, doenças cardiovasculares, doenças neuropsiquiátricas, anemia megaloblástica e alguns tipos de câncer (CREPALDI, 2006, p.4).

Os folatos agem na formação de produtos intermediários do metabolismo, transferindo uma unidade de carbono á vários compostos durante a síntese de purinas (guanina e adenina) e pirimidinas (timina), como também no metabolismo de ácidos nucléicos e aminoácidos (FERREIRA, 2005, p.14). São também essenciais para a formação de hemácias e leucócitos na medula óssea e para sua maturação, sendo um carreador de carbono simples na formação de heme (MAHAN, 2005, p.101).

O ácido fólico, por si próprio, não tem atividade coenzimática, entretanto ele é enzimaticamente reduzido nos tecidos a ácido tetraidrofólico (FH<sub>4</sub>), que é a forma coenzimaticamente ativa. O tetraidrofolato tem função de transportador intermediário de grupos monocarbônicos em diversas reações enzimáticas complexas. Nessas reações grupos como o metil (-CH<sub>3</sub>), metileno (-CH<sub>2</sub>-), metenil (-CH-C=), formil (-CHO) e formimino (-CH=NH), são transferidos de uma molécula de substrato para outra (LEHNINGER, 1984, p.192).

O ácido fólico é ainda essencial no metabolismo da homocisteína, aminoácido tóxico para o endotélio capilar, mantendo seus níveis normais (NASSER et al., 2005, p.200). O tetraidrofolato juntamente com a vitamina B<sub>12</sub> participa da conversão da homocisteína a metionina. Esta é uma reação de grande importância para o sistema cardiovascular, visto que a hiperhomocisteinemia pode causar lesões nos vasos sanguíneos, levando à arteriosclerose vascular e trombose. Os altos níveis de homocisteína no sangue também aumentam o risco de doenças cardiovasculares e derrame cerebral (LIMA; CATHARINO; GODOY, 2003, p. 132).

### 4.3 FONTES ALIMENTARES

As bactérias e as plantas são capazes de sintetizar ácido fólico. As bactérias sintetizam através de precursores – incluindo ácido p-aminobenzóico. Contudo os outros organismos, principalmente os mamíferos são incapazes de sintetizar ácido fólico, tendo que obtê-lo da dieta, através da ingestão de alimentos que são fontes desta vitamina (TORRES, 2005, p.68).

Os folatos estão presentes como folipoliglutamatos reduzidos em uma variedade de alimentos de origem vegetal e animal. As fontes mais ricas em folatos são: fígado, cogumelos e vegetais folhosos verdes, como o espinafre, aspargo e brócolis. Outras fontes são as batatas, carne bovina magra, pão de trigo integral, suco de laranja e feijões secos (MAHAN, 2005, p.101).

Os teores de folatos encontrados na literatura apresentam diferenças e são bastante contraditórios, em decorrência 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 (PANE, 2007, p.12).

#### 4.3.1 Ingestão Recomendada

As necessidades de ingestão de folato variam em função da idade, sexo, estado fisiológico (gravidez e lactação), sendo que gestantes, nutrízes, lactentes e idosos são considerados grupo de risco para deficiência de ácido fólico (MAGNONI; CUKIER; RAMOS, 2011, p.24).

Para adultos a ingestão diária recomendada de folato é de 400µg. No caso de gravidez a ingestão terá que ser maior devido ao aumento da demanda provocado pelo feto, e durante a lactação há aumento da demanda devido à perda diária de até



50µg/dia de folato no leite materno (SENA, 2006, p.29).

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

**Tabela 5 - Necessidades diárias recomendadas para a ingestão de folatos.**

#### **4.3.2 Biodisponibilidade**

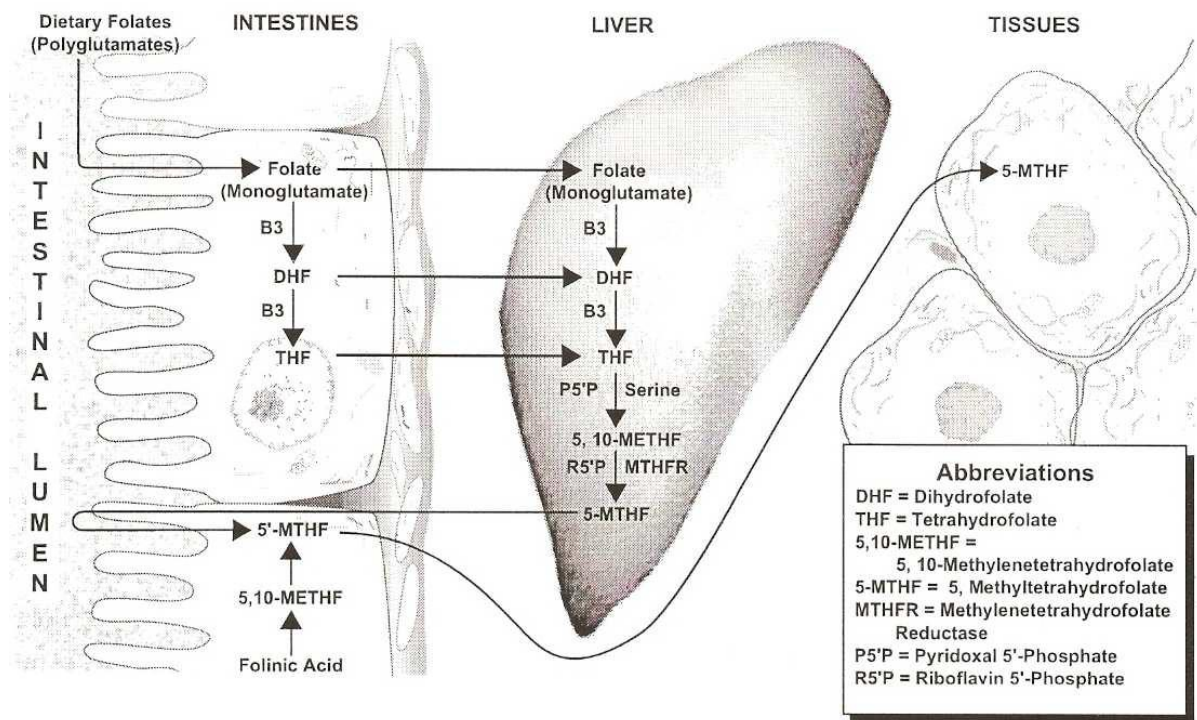
“A Biodisponibilidade se refere à porção do folato ingerido que é absorvido e torna-se disponível para os processos metabólicos e para o armazenamento pelo organismo” (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.97).

Nos alimentos a biodisponibilidade de folatos varia consideravelmente, em virtude das diferentes formas da vitamina, presença ou ausência de inibidores de conjugases e ligantes de folato, e também do estado nutricional do indivíduo. A deficiência em ferro e ácido ascórbico também pode prejudicar a utilização de folato (MAHAN, 2005, p.101).

Estima-se que a biodisponibilidade dos folatos naturais é incompleta em relação à vitamina na sua forma sintética. Os fatores responsáveis por essa biodisponibilidade incompleta são: efeitos da matriz alimentar, possível degradação dos folatos labéis no meio ácido do estômago e conversão enzimática incompleta dos folatos poliglutamil para as formas absorvíveis de monoglutamil (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010, p.394). Este processo de conversão de poliglutamatos em monoglutamatos, ocorre num pH ótimo entre 6-7, portanto alimentos que alteram o pH intestinal podem acarretar uma incompleta desconjugação do poliglutamato, e conseqüentemente, uma diminuição na sua biodisponibilidade (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.97).

#### 4.4 ABSORÇÃO E METABOLISMO

O ácido fólico normalmente é bem absorvido pelo organismo. 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 dependente da presença de niacina para realizar a conversão. O tetraidrofolato, em conjunto com a serina origina 5,10-metileno-tetraidrofolato e glicina. Em seguida, outro complexo enzimático transforma o 5,10-metilenotetraidrofolato em 5-metil-tetraidrofolato, forma utilizada na re-metilação da homocisteína (Figura 4) (PANE, 2007, p.7).



**Figura 4 – Absorção e ativação do ácido fólico (In: PANE, 2007, p.7).**

Após absorção, a distribuição pelos tecidos é rápida e dependente de proteínas de ligação que transportam até a medula óssea, ossos e fígado. Um sistema de reabsorção entero-hepático mantém constante os níveis de ácido fólico (Bekaert et al., 2008), através da absorção pelo fígado que metila e transporta o ácido fólico até a bile, levando-o até o intestino para ser reabsorvido (BUFALINO, 2010, p.34; MAGNONI; CUKIER; RAMOS, 2011, p.22).

#### 4.5 DEFICIÊNCIAS DE FOLATOS

Os seres humanos não sintetizam folato, nem conseguem estocar quantidades consideráveis da vitamina, por isso precisam adquiri-la da dieta. Quando há pouca ingestão de folatos, dentro de uma a quatro semanas, pode surgir algum estado de deficiência, dependendo dos hábitos alimentares e das reservas que o indivíduo tem (SENA, 2006, p.31).

As deficiências nutricionais são hoje, uma das maiores causas de preocupação em relação ao bem estar da população mundial. Dentre os principais problemas causados pela deficiência de folatos estão às malformações congênitas, que desencadearam campanhas de incentivo ao seu consumo em vários países, além de problemas cardíacos, associados ao acúmulo de homocisteína no sangue, doenças degenerativas, incluindo mal de Alzheimer, por dificultar a síntese de mielina e anemia megaloblástica (GODOY et al., 2008, p.81).

Segundo Nasser (2005, p.200), vários estudos apontam a associação entre a deficiência do ácido fólico com o câncer do cólon, leucemia, doenças mieloproliferativas e algumas enfermidades crônicas da pele. Ainda perda de apetite, diarreia, mal estar geral, glossite e deterioração mental. Em gestantes, além de má formação fetal são relatados prematuridade e baixo peso ao nascimento.

O crescimento fetal consome ácido fólico materno. Alcoolistas, que ingerem apenas calorias vazias do álcool desenvolvem múltiplas deficiências, pois neles, a falta de ácido fólico é potencializada, o álcool age como antagonista do seu metabolismo. Pacientes com doenças inflamatórias crônicas do trato digestivo podem apresentar má absorção de ácido fólico. Quando o aumento da necessidade não é compensado pela ingestão da vitamina, como em fase de crescimento, gestação e lactação haverá deficiência de folato. Má absorção, diálise e doença hepática são outras causas de deficiência de folato (NASSER, 2005, p.200).

#### **4.5.1 Deficiência de folatos na gestação**

A deficiência de folato é comum em gestantes, mesmo em países desenvolvidos. Por ser difícil de atender a alta necessidade neste período, é necessária uma suplementação materna no cuidado pré-natal para cobrir esses requerimentos elevados (MAGNONI; CUKIER; RAMOS, 2011, p.26).

O ácido fólico é uma vitamina imprescindível durante a gravidez, pois tem papel fundamental no processo da multiplicação celular. O folato interfere com o aumento

dos eritócitos, o alargamento do útero e o crescimento da placenta e do feto (SANTOS, 2007, p.18).

Além de retardo do crescimento intrauterino, a deficiência de folato esta relacionada com o descolamento de placenta, morte neonatal, baixo peso ao nascer, prematuridade, toxemia, hemorragia pós-parto, atraso de maturação do sistema nervoso, anemia megaloblástica e malformação fetal (MAGNONI; CUKIER; RAMOS, 2011, p.28).

Os defeitos do tubo neural são malformações que ocorrem na fase inicial do desenvolvimento fetal, entre a terceira e a quinta semana de gestação, envolvendo a estrutura primitiva que dará origem ao cérebro e à medula espinhal (SCURACHIO, 2010, p.21).

O tubo neural se converte em medula espinhal e cérebro entre os 18 a 26 primeiros dias de gestação, período no qual grande parte das mulheres desconhece ainda seu estado gravídico. É importante que a mulher tenha acesso a uma quantidade adequada de ácido fólico pelo menos um mês antes de engravidar. Entretanto, como nem toda gravidez é planejada, justificam-se medidas de mais largo alcance, como a fortificação de alimentos com este micronutriente (SANTOS, 2007, p.18).

#### **4.5.2 Deficiência de folatos e anemia megaloblástica**

A anemia megaloblástica é uma doença na qual a medula óssea produz glóbulos vermelhos gigantes e imaturos (SENA, 2006, p.36).

Um dos efeitos da deficiência de folato é a inibição da síntese de DNA devido a disponibilidade diminuída de purinas e dTMP(timidina monofosfato). Isso ocasiona a parada das células na fase S e uma alteração característica, chamada megaloblástica, no tamanho e na forma dos núcleos de células em rápida divisão. Este bloqueio na síntese de DNA retarda a maturação dos glóbulos vermelhos, causando então a produção dos glóbulos vermelhos anormalmente grandes e

imaturos (DELVIN, 2003, p.1024).

Essa anemia pode surgir pela deficiência de folato dentro de 10 a 12 semanas, contudo ela não pode ser diferenciada da anemia causada pela deficiência de vitamina B12, devido à via comum das duas vitaminas no metabolismo intracelular. Quando a anemia é causada pela deficiência de folato, não se encontra associação com anormalidades neurológicas, diferentemente do que acontece com a anemia causada pela deficiência de cobalamina (SENA, 2006, p.36).

## 5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO

Os métodos para análise de ácido fólico podem ser agrupados em métodos biológicos, químicos, bio-específicos (imunoenzimático e radioimunoensaio), microbiológicos e cromatográficos, sendo os dois últimos, os métodos mais empregados (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.98).

Segundo Azevedo et al., (2006, p.972), a análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em virtude da baixa concentração em que se encontram, da presença de interferentes, da complexidade da matriz e dos cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes. As dificuldades a serem superadas na determinação de vitaminas em alimentos incluem, além do melhoramento dos processos de extração e limpeza, o desenvolvimento e a validação de métodos simultâneos que reduziriam o tempo gasto para a análise e os custos, possibilitando também, menor geração de resíduos.

### 5.1 MÉTODO MICROBIOLÓGICO

O ensaio de crescimento microbiológico é considerado um método tradicional para análise de folatos. É recomendado pela AOAC, como o método oficial de determinação de folatos, e foi o primeiro método usado para a análise de ácido fólico. A técnica baseia-se no fato de que os folatos estimulam o desenvolvimento de bactérias dos gêneros *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium* e *Pediococcus cerevisiae* (SENA, 2006, p.47).

Os micro-organismos *Streptococcus faecium* e *Pediococcus cerevisiae* têm pouca utilidade para a análise de alimentos, pois não respondem a todas as formas de vitamina, já o *Lactobacillus casei* responde a todas as formas de folato, sendo o organismo mais adequado para teste microbiológico do total de folatos em alimentos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010, p.396).

A principal vantagem do método é a sensibilidade de detecção. As diferenças no desenvolvimento do micro-organismo são determinadas por medidas da turbidez. Outras vantagens são: equipamentos de baixo custo e determinação da quantidade total de folatos. Porém, pode ocorrer reação cruzada, isto é, algumas substâncias presentes podem estimular ou inibir o crescimento do microrganismo, além de ser um método demorado e necessitar de uma pessoa experiente para o manuseio da amostra e do micro-organismo, para assegurar a qualidade e reprodutibilidade dos resultados analíticos (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.99).

Como o método permite a quantificação de folato total presente na amostra, mas não permite a diferenciação entre as diversas formas de folato é necessário o uso de outro método para a detecção individual de cada congêneres do grupo dos folatos (SENA, 2006. p.48).

## 5.2 MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O método cromatográfico, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a separação dos diferentes tipos de folatos, bem como a quantificação individual de cada um. Este método pode ser altamente específico, confiável, sendo mais rápido do que o ensaio microbiológico, porém requer equipamento mais caro e apresenta menor sensibilidade. Utiliza-se a cromatografia em fase reversa com detectores de ultravioleta ou de massas, para o ácido fólico que não apresenta fluorescência natural, e de fluorescência ou de massas para os folatos naturais (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.99).



Através de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência a literatura vem apresentando avanços nos métodos para a determinação de folatos, em função da rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão da técnica. Diversas pesquisas com CLAE têm sido realizadas para determinação simultânea de ácido fólico, em preparações farmacêuticas, multivitamínicas e em alimentos. Contudo, grande parte das determinações de folatos em alimentos envolve a utilização de enzimas (conjugases) no processo de extração, o que dificulta a aplicação do método e aumenta o tempo de análise, além de promover a perda de folatos (AZEVEDO et al., 2006, p.972).

Para análise de folatos, é preciso estabelecer qual a forma da vitamina que se deseja determinar (ácido fólico, diidrofolato, tetraidrofolato), pois quando se trata da determinação de folatos naturalmente presentes em alimentos, a forma predominante é de folatos reduzidos (tetraidrofolatos), sendo que aproximadamente 80% destes, se apresentam como poliglutamatos. Nestes casos é comumente utilizado enzimas que convertem os poliglutamatos em monoglutamatos, a fim de aperfeiçoar o processo de extração da vitamina. Já no caso da análise de ácido fólico esta etapa não é necessária, pois ele encontra-se na forma de monoglutamato, embora alguns autores recomendem o uso de  $\alpha$ -amilase para hidrolisar o amido quando as amostras são cereais ou produtos derivados, pois o uso dessa enzima tem ajudado na extração do ácido fólico (SENA, 2006, p.49).

A extração do ácido fólico a partir da matriz alimentícia é uma etapa muito importante para a garantia da qualidade dos resultados experimentais. A extração desta vitamina tem sido feita com solução tampão pH 8-9 seguida por digestão com  $\alpha$ -amilase, ou inicialmente com solução de hidróxido de potássio, seguida de ácido tricloroacético e tampão fosfato pH 6,0. A separação do ácido fólico normalmente é realizada em fase reversa utilizando coluna C18 e eluição isocrática com pareamento de íons ou gradiente. A fase móvel mais utilizada em eluição por gradiente é uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato pH < 3. A detecção normalmente é feita na região eletromagnética do ultravioleta a 280 ou 290 nm (ALABURDA; SHUNDO, 2007, p.99).

## 6. VITAMINAS: UM TEMA MOTIVADOR PARA O ENSINO MÉDIO

A química fornece explicações importantes sobre o cotidiano e como ele funciona. É uma ciência prática, porém apresenta grande impacto no dia-a-dia. De fato, a química encontra-se próxima do centro de vários problemas que preocupam a todos como melhoria da saúde, conservação dos recursos naturais, proteção do meio ambiente e suprimento diário de alimentos, vestuário e moradia (LUCINDO, 2010, p.10).

A aprendizagem de Química deve proporcionar aos alunos a compreensão das transformações químicas que ocorrem no mundo físico de forma abrangente e integrada, possibilitando que estes julguem com fundamentos as informações adquiridas na mídia, na escola e no convívio com pessoas. A partir daí o aluno poderá interagir com o mundo enquanto indivíduo e cidadão (SECRETARIA DE EDUCAÇÃO BÁSICA, 2006 p.109).

A abordagem de questões atuais do cotidiano ajuda a formar cidadãos qualificados, mais críticos e mais preparados para a vida, para o trabalho e para o lazer (NEVES, 2008 p.34). Sendo assim o contexto do aluno é um campo muito rico para a atuação dos professores, pois diversas atividades presentes no cotidiano envolvem processos físicos, químicos e bioquímicos que passam despercebidos e a reflexão sobre eles pode levá-los a níveis acima da cotidianidade (RIBEIRO, 2010, p.169).

A vasta complexidade do mundo atual não permite mais, que o ensino médio seja apenas preparatório para um exame de seleção. O mundo hoje exige que o estudante saiba se posicionar, julgar e tomar decisões, sendo responsável por elas. Essas são capacidades mentais construídas nas interações sociais vivenciadas na escola, em diferentes situações que exigem novas formas de participação. Para tal, não servem componentes curriculares desenvolvidos com base em treinamento para respostas padrão. Não se avalia um bom projeto pedagógico pelo número de

exercícios propostos e resolvidos, mas pela qualidade das situações propostas, em que os estudantes e os professores, em conjunto, terão de produzir conhecimentos contextualizados (SECRETARIA DE EDUCAÇÃO BÁSICA, 2006 p.106).

Dentre os diversos temas contextualizadores, destacam-se os alimentos. Além de ser um elemento motivador, a alimentação é um tema conceitualmente rico, pois permite desenvolver conceitos químicos, físicos, biológicos, entre outros, proporcionando aos estudantes compreender sua importância, de forma a conscientizá-los sobre a necessidade de uma dieta que esteja de acordo com as necessidades diárias (NEVES, 2008 p.34).

As vitaminas são substâncias orgânicas consideradas essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde. São necessárias em pequenas quantidades, sendo necessário adquiri-las pela ingestão de alimentos que as contêm, pois não são sintetizadas pelo organismo. Podem ser divididas em dois grupos: hidrossolúveis e lipossolúveis (SENA, 2006, p.20).

Desta forma elas representam um tema que pode ser abordado com os alunos do ensino médio para ressaltar a sua importância na dieta alimentar, proporcionando um estudo de suas características e propriedades. Como conteúdo específico poderá ser trabalhado conceitos de solubilidade, polaridade e reações de oxirredução.

## 6.1 ATIVIDADES EXPERIMENTAIS NO ENSINO MÉDIO

O ensino de ciências por meio da experimentação recebeu impulso no século XX, década de 60, por projetos instrucionais norte-americanos e ingleses. Esses projetos foram importados por diversos países, entre eles o Brasil, que criou seis centros de treinamento de professores de ciências, em regiões que abrangiam todo o território nacional, com a finalidade de traduzi-los e de treinar professores para aplicá-los nas escolas (BARATIERI, 2008, p.20).

Atualmente, parece existir um consenso entre pesquisadores e professores das ciências naturais, que as atividades experimentais devem permear as relações ensino-aprendizagem, afinal estas estimulam o interesse dos alunos em sala de aula e o engajamento em atividades posteriores (JUNIOR, et al., 2008, p.34).

Segundo Junior et al., (2008, p.34), diversos autores defendem que a atividade experimental constitui um dos aspectos-chave do processo de ensino-aprendizagem de ciências. Com isso, à medida que se planejam experimentos capazes de estreitar o elo entre motivação e aprendizagem, espera-se que o envolvimento dos alunos seja mais vívido e, portanto, acarrete evoluções em termos conceituais.

A experimentação pode ter um caráter indutivo, nesse caso, o aluno pode controlar variáveis e descobrir ou redescobrir relações funcionais entre elas, mas pode também ter um caráter dedutivo quando eles têm a oportunidade de testar o que é dito na teoria. Seja de uma forma ou de outra a utilização dessas atividades bem planejadas facilita muito a compreensão da produção do conhecimento em química, podendo incluir demonstrações feitas pelo professor, experimentos para confirmação de informações já dadas, cuja interpretação leve a elaboração de conceitos. Essas atividades são importantes na formação de elos entre as concepções espontâneas e os conceitos científicos, propiciando aos alunos oportunidades de confirmar suas ideias ou então reestruturá-las (FARIAS; BASAGLIA; ZIMMERMANN, p.1).

Os experimentos investigativos são também uma das estratégias sugeridas para conseguir a participação ativa dos alunos no processo de aprendizagem. Se os alunos participarem de etapas como: coleta de dados, análise e discussão, eles então poderão formular hipóteses e propor soluções para o problema proposto, desenvolvendo seu raciocínio lógico e habilidades cognitivas importantes para a construção do conhecimento químico e para a sua formação cidadã (MARCONDES; SUART, 2009, p.50).

Deste modo, as atividades experimentais podem assumir uma característica construtivista, se os professores incentivarem os alunos a perceberem os conflitos cognitivos, que são incentivadores da aprendizagem, pois conduzem aos alunos buscarem e confrontarem informações, reconstruindo ideias e maneiras de explicar

os problemas. Nessa perspectiva, o professor faz uma prospecção a respeito dos conhecimentos prévios de seus alunos. Esse levantamento permite ao professor estabelecer relações com o conteúdo sobre o qual se concentrará o processo de ensino, o que atenua a aprendizagem e fundamenta a construção dos novos significados. Uma aprendizagem é tanto mais significativa para o aluno quanto maior for a relação que ele desenvolver entre seus conhecimentos prévios e as novas informações (BARATIERI et al., 2008, p. 21).

Assim sendo, propõe-se um experimento para a verificação da presença de vitamina C em sucos de frutas variados, conforme o artigo “A procura da vitamina C”, produzido por Silva, Ferreira e Silva (1995). Através desse experimento o aluno terá contato com a estrutura desta vitamina e suas propriedades. É possível, através deste experimento, abordar com os alunos o conceito de solubilidade, como também reações de oxirredução.

#### 6.1.1 Material utilizado

- 1 comprimido efervescente de 1 g de vitamina C
- Tintura de iodo a 2% (comercial)
- Sucos de frutas variados (por exemplo: limão, laranja, maracujá e caju)
- 5 pipetas de 10 mL (ou seringas de plástico descartáveis)
- 1 fonte para aquecer a água (aquecedor elétrico ou secador de cabelo)
- 6 copos de vidro
- 1 colher de chá de farinha de trigo ou amido de milho
- 1 béquer de 500 mL ou frasco semelhante
- Água filtrada
- 1 conta-gotas
- 1 garrafa de refrigerante de 1 L

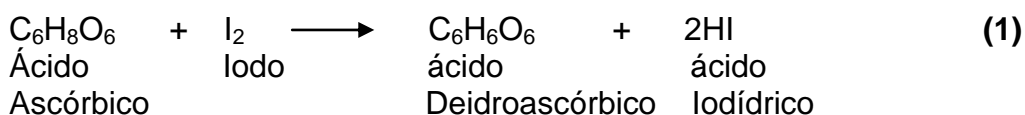
### 6.1.2 Descrição do experimento

1. Coloque 200 mL de água filtrada em um béquer de 500 mL. Em seguida, aqueça o líquido até uma temperatura próxima a 50 °C, cujo acompanhamento poderá ser realizado com um termômetro ou com a imersão de um dos dedos da mão (nessa temperatura é difícil a imersão do dedo por mais de 3 s). Em seguida, coloque uma colher de chá cheia de amido de milho (ou farinha de trigo) na água aquecida, agitando sempre a mistura até atingir a temperatura ambiente.
2. Em uma garrafa de refrigerante de 1L, contendo aproximadamente 500 mL de água filtrada, dissolva um comprimido efervescente de vitamina C e complete o volume até 1L.
3. Escolha seis frutas cujos sucos você queira testar, e obtenha o suco dessas frutas.
4. Deixe à mão a tintura de iodo a 2%, comprada em farmácias. Numere seis copos de vidro, identificando-os com números de 1 a 6. Coloque 20 mL da mistura (amido de milho + água) em cada um desses seis copos de vidro numerados. No copo 1, deixe somente a mistura de amido e água. Ao copo 2, adicione 5 mL da solução de vitamina C; e, a cada um dos copos 3, 4, 5 e 6, adicione 5 mL de um dos sucos a serem testados.
6. A seguir pingue, gota a gota, a solução de iodo no copo 1, agitando constantemente, até que apareça uma coloração azul. Anote o número de gotas adicionado (neste caso, uma gota é geralmente suficiente).
7. Repita o procedimento para o copo 2. Anote o número de gotas necessário para o aparecimento da cor azul. Caso a cor desapareça, continue a adição de gotas da tintura de iodo até que ela persista, e anote o número total de gotas necessário para a coloração azul persistir.
8. Repita o procedimento para os copos que contêm as diferentes amostras de suco, anotando para cada um deles o número de gotas empregado.

### 6.1.3 Entendendo o Experimento

A adição de iodo à solução amilácea (água + farinha de trigo ou amido de milho) provoca no meio uma coloração azul intensa, devido ao fato do iodo formar um complexo com o amido. Graças a sua bem conhecida propriedade antioxidante, a vitamina C promove a redução do iodo a iodeto (I<sup>-</sup>), que é incolor quando em solução aquosa e na ausência de metais pesados. Dessa forma, quanto mais ácido ascórbico um alimento contiver, mais rapidamente a coloração azul inicial da mistura amilácea desaparecerá e maior será a quantidade de gotas da solução de iodo necessária para restabelecer a coloração azul (SILVA, 1995, p.31).

A reação química que descreve o fenômeno esta descrita conforme a equação 1 :



## 7. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 MATERIAIS E REAGENTES

- Provetas
- Becker de 250 mL
- Becker de 50 mL
- Becker de 500 mL
- Becker de 2000 mL
- Bastão de vidro
- Pote de vidro de 500 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Pipetas de plástico
- Pipeta de vidro
- Tubos de ensaio
- Suporte de tubos
- Espátulas
- Funil de vidro
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 25 mL
- Pipeta volumétrica de 50 mL
- Balão volumétrico de 100 mL
- Balão volumétrico de 200 mL
- Balão volumétrico de 250 mL
- Balão volumétrico de 500 mL
- Balão volumétrico de 1000 mL
- Suporte universal
- Garras
- Bureta



- Cubeta
- Papel filtro Wattman nº2
- Ácido fólico padrão – Farmácia Callithea
- Sílica gel 60 - Vetec
- Álcool Etílico CRQ P.A
- Acetonitrila Synth P.A
- Hidróxido de Potássio P.A Nuclear
- Ácido tricloroacético P.A Merck
- Farinha de trigo
- Dihidrogeno fosfato de sódio Dinâmica
- Hidrogeno fosfato de sódio Nuclear
- Iodo P.A Cromoline

## 7.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica Marte AY220
- Espectrofotometro Femto – Cirrus 80
- Agitador magnético Tecnal
- Ultrassom Cleaner CD - 4860
- Bomba á vácuo

## 7.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Tirou-se o espectro de absorção UV do padrão de ácido fólico a fim de comparar com o espectro da literatura, para verificar a qualidade do padrão adquirido.

### 7.3.1 Escolha da fase móvel

O procedimento experimental para escolha da fase móvel foi realizado segundo

E. L. Ponder; B. Fried; J. Sherma, 2004.

Preparou-se 120 mL de uma solução de etanol/água (2v/1v), na qual usou-se 80 mL de etanol, para 40 mL de água.

Diluiu-se o padrão de ácido fólico nesta solução e com o auxílio de uma micropipeta, injetou-se na placa de sílica, marcando com lápis o local onde a amostra foi injetada.

Mergulhou-se a placa de sílica no becker contendo a solução etanol/água e esperou-se o tempo necessário para que houvesse a migração da amostra.

Após a amostra ter migrado distância suficiente, marcou-se a migração do solvente, e revelou-se a amostra em câmara de lodo.

Mediu-se a migração da amostra e do solvente, e calculou-se o  $R_f$ .

### 7.3.2 Preparação da coluna de sílica

O procedimento experimental para a preparação da coluna de sílica gel foi realizado conforme o método descrito por C. H. Collins; G. L. Braga; P. S. Bonato, 1997.

Mediu-se o diâmetro e o comprimento da coluna. Calculou-se o volume total da coluna.

Preparou-se a coluna em um suporte universal, na posição vertical. Adicionou-se um pequeno pedaço de algodão na ponta da coluna.

Pesou-se 18,0002 g de sílica gel, transferiu-se para uma proveta de 100 mL, adicionou-se a solução de etanol/água em excesso. Agitou-se a sílica. Em seguida foi adicionando-se a sílica pouco a pouco na coluna, até que preenchesse o volume adequado da coluna.

### **7.3.3 Análise da solução padrão de ácido fólico em cromatografia de coluna**

O procedimento experimental para a análise de ácido fólico em cromatografia de coluna foi realizado conforme o método descrito por C. H.Collins; G. L.Braga; P.S.Bonato, 1997.

Preparou-se 180 mL da fase móvel, com o solvente etanol/água, na proporção 2/1. Mediu-se 120 mL de etanol e adicionou-se em 60 mL de água. Homogeneizou-se a solução e guardou em um frasco adequado.

Pesou-se aproximadamente 0.0050 g do padrão de ácido fólico e diluiu-se com o solvente (etanol/água), transferiu-se para o balão, completando o volume até 100 mL.

Com o auxílio da pipeta volumétrica, coletou-se 1,5 mL desta solução e adicionou-se a coluna. Após a solução ter eluído, lavou-se a parede da coluna com a fase móvel. Adicionou-se a fase móvel a coluna, até o topo. Recolheu-se 10 tubos contendo 3 mL cada.

### 7.3.3.1 Leitura das amostras do padrão no espectrofotômetro

Ligou-se o aparelho, esperou-se 15 minutos e iniciou-se o seguinte procedimento:

Regulou-se o espectrofotômetro para o comprimento de onda de 287 nm, adicionando inicialmente o branco na cubeta. Depois se adicionou o tubo 1 e lêu-se a absorbância, o mesmo foi feito para os demais todos numerados de 1 a 10.

### 7.3.4 Preparo das soluções

Preparou-se 1000 mL de uma solução tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,37M/  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.25 M).

Pesou-se 51,0563 g de dihidrogenofosfato de sódio hidratado.

Pesou-se 35,4900 g de hidrogenofosfato de sódio.

Adicionou-se as duas massas em um becker de 2000 mL, colocou-se o becker sob o agitador magnético e adicionou-se água até a completa diluição, montou-se um esquema para medir o pH. Ajustou-se o pH para o valor 7,2 com hidróxido de sódio 0,1 M. Após correção do pH, transferiu-se para o balão volumétrico e completou-se o volume para 1000 mL.

Preparou-se 200 mL de uma solução de hidróxido de potássio 0,1 M. Pesou-se 1,1200 g de hidróxido de potássio e dilui-se com água, transferiu-se para o balão volumétrico e completou-se o volume para 200 mL.

Preparou-se 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Pesou-se 0,400g de hidróxido de sódio e dilui-se com água, transferiu-se para o balão volumétrico e completou-se o volume para 100 mL.

### **7.3.5 Tratamento da amostra**

Foram analisadas duas diferentes marcas de Farinhas de Trigo enriquecidas com ferro e ácido fólico, disponíveis comercialmente na cidade de Assis-SP. As farinhas de trigo foram inicialmente homogeneizadas e, posteriormente, amostradas manualmente, com a obtenção de 50 g de amostra para as análises.

### **7.3.6 Extração do ácido fólico**

O procedimento experimental para extração do ácido fólico foi realizado segundo o método descrito por Boen et al., 2010.

Pesou-se 50 g da farinha de trigo previamente homogeneizada, suspendeu-se com 200 mL da solução de hidróxido de potássio, e transferiu-se para um balão volumétrico de 500 mL. Com a ajuda de uma pipeta volumétrica de 50 mL, mediu-se 150 mL de acetonitrila e adicionou-se no balão contendo a amostra. Levou-se a solução para o ultrassom, durante 10 minutos.

Adicionou-se 100 mL do tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,37M/  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.25 M), e com o auxílio de uma pipeta volumétrica adicionou-se 25 mL de ácido tricloroacético. Completou-se o volume de 500 mL com a solução tampão. Filtrou-se em papel filtro quantitativo.

### **7.3.7 Análise da amostra em cromatografia de coluna**

O procedimento experimental para a análise das amostras de farinhas de trigo em cromatografia de coluna foi realizado conforme o método descrito por C. H.Collins; G. L.Braga; P.S.Bonato, 1997.

Pipetou-se 2 mL da solução filtrada da amostra e adicionou-se a coluna. Após toda a amostra eluir, lavou-se a parede da coluna com a fase móvel. Preencheu-se o restante do volume da coluna com a fase móvel etanol/água. Recolheu-se dez tubos, contendo 3 mL cada.

#### 7.3.7.1 Leitura das amostras no espectrofotômetro

Ligou-se o aparelho, esperou-se 15 minutos e iniciou-se o seguinte procedimento:

Regulou-se o espectrofotômetro para o comprimento de onda de 287 nm, adicionando inicialmente o branco na cubeta. Depois se adicionou o tubo 1 e lêu-se a absorbância, o mesmo foi feito para os demais todos numerados de 1 a 10.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tirou-se o espectro de absorção UV do padrão de ácido fólico e comparou-se com o a literatura, para verificar a qualidade do padrão adquirido. As figuras 5 e 6 mostram a semelhança entre o espectro de absorção UV do ácido fólico da literatura e do padrão de ácido fólico.

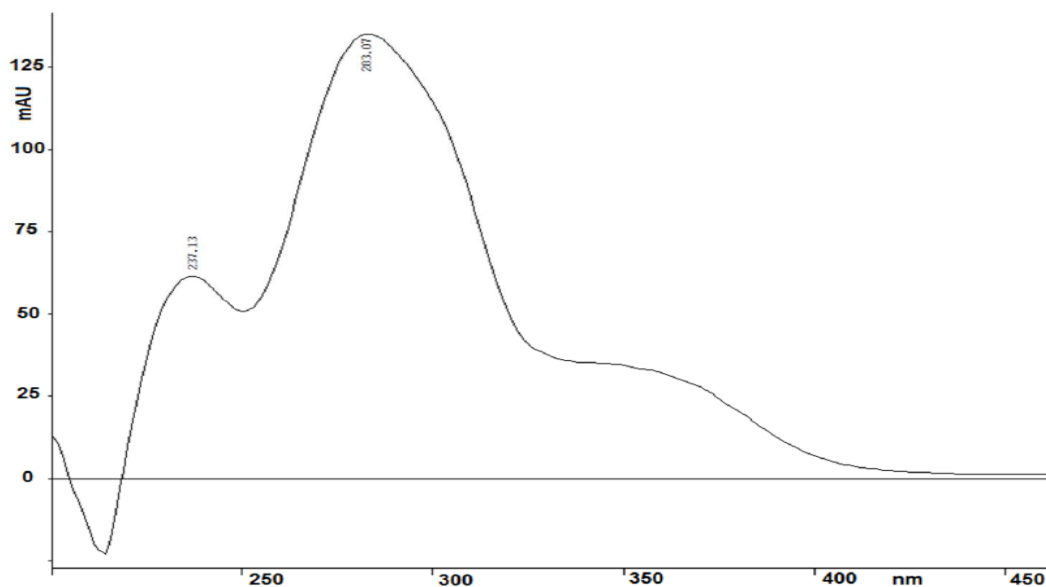


Figura 5 –Espectro de absorção UV do ácido fólico (In: ARAÚJO, 2012, p.21).



Figura 6 - Espectro de absorção UV do ácido fólico padrão.

A escolha da fase móvel para determinação do ácido fólico por cromatografia de coluna foi feita através da técnica de cromatografia de camada delgada.

A figura 7 mostra a placa de sílica após revelação em câmara de fumaça.



**Figura 7 – Placa de sílica revelada.**

Após marcar a migração da amostra e do solvente calculou-se o  $R_f$ , obtendo-se os seguintes resultados:

Migração da amostra = 5,4 cm

Migração do solvente = 6,1 cm

$$R_f = \frac{\text{Migração da amostra}}{\text{Migração do solvente}}$$

$$R_f = \frac{5,4}{6,1}$$

$$R_f = 0,88$$

O valor de  $R_f$  obtido através do experimento foi coerente com o valor apresentado no trabalho de E. L. Ponder; B. Fried; J. Sherma, 2004. O valor de  $R_f$  para o solvente



etanol/água (2v/1v) apresentado neste trabalho foi de 0,88.

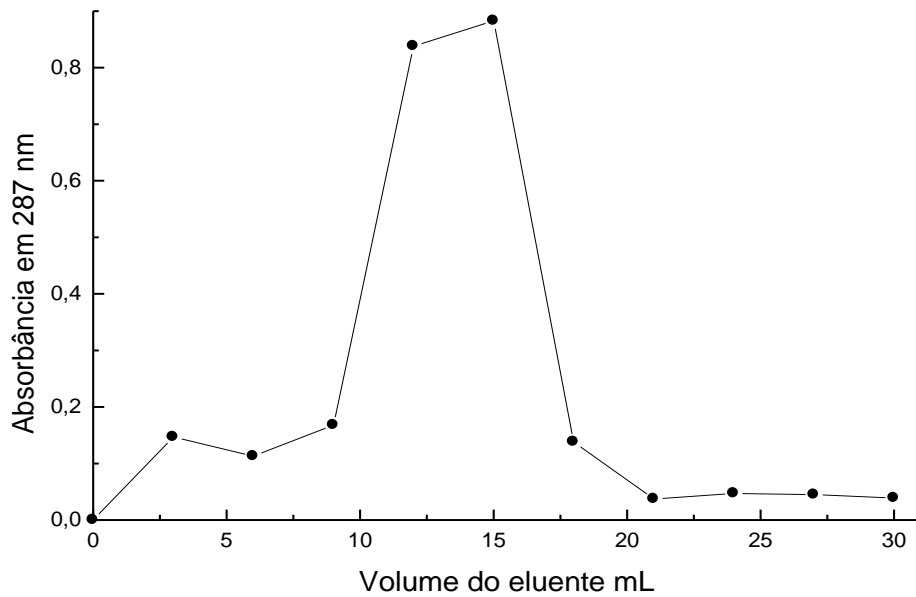
A mistura etanol/água é um solvente de baixo custo e pouca toxicidade. A mistura foi escolhida como fase móvel, pois se mostrou eficiente para a separação do ácido fólico.

Os resultados das análises com o ácido fólico e com as amostras A e B estão descritos na tabela 6 e nos gráficos abaixo.

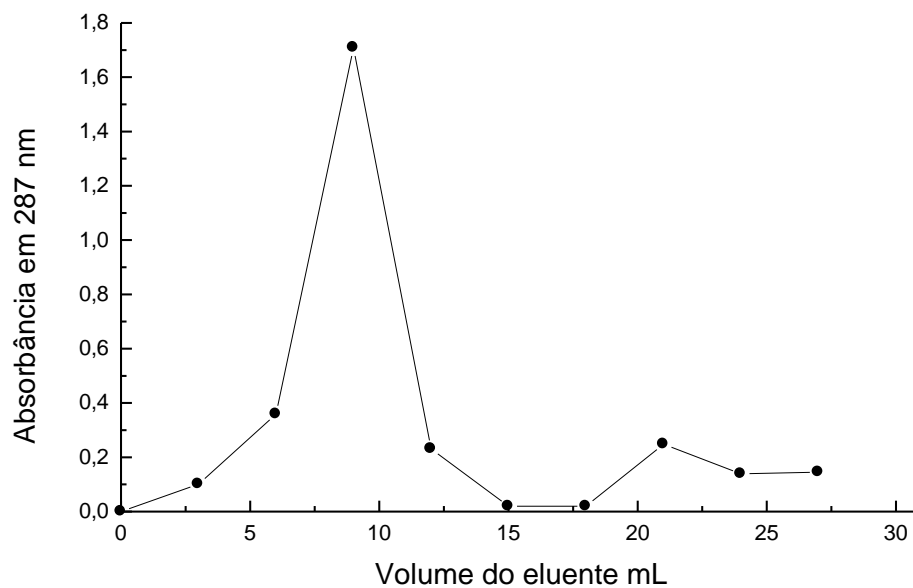
	<b>ANÁLISE (1) COM O PADRÃO DE ÁCIDO FÓLICO.</b>	<b>ANÁLISE (2) COM O PADRÃO DE ÁCIDO FÓLICO.</b>	<b>ANÁLISE COM A FARINHA DE TRIGO A</b>	<b>ANÁLISE COM A FARINHA DE TRIGO B</b>
<b>Tubos</b>	<b>Absorbância em 287 nm</b>	<b>Absorbância em 287 nm</b>	<b>Absorbância em 287 nm</b>	<b>Absorbância em 287 nm</b>
<b>Branco</b>	<i>0,000</i>	<i>0,000</i>	<i>0,000</i>	<i>0,000</i>
<b>1</b>	<i>0,147</i>	<i>0,044</i>	<i>0,106</i>	<i>0,101</i>
<b>2</b>	<i>0,113</i>	<i>0,590</i>	<i>0,010</i>	<i>0,359</i>
<b>3</b>	<i>0,168</i>	<i>0,620</i>	<i>- 0,020</i>	<i>1,709</i>
<b>4</b>	<i>0,838</i>	<i>0,090</i>	<i>0,499</i>	<i>0,231</i>
<b>5</b>	<i>0,883</i>	<i>0,024</i>	<i>0,571</i>	<i>0,020</i>
<b>6</b>	<i>0,138</i>	<i>0,018</i>	<i>0,139</i>	<i>0,020</i>
<b>7</b>	<i>0,037</i>	<i>0,009</i>	<i>- 0,050</i>	<i>0,248</i>
<b>8</b>	<i>0,047</i>	<i>0,011</i>	<i>- 0,068</i>	<i>0,139</i>
<b>9</b>	<i>0,045</i>	<i>0,015</i>	<i>- 0,069</i>	<i>0,145</i>
<b>10</b>	<i>0,039</i>	<i>0,029</i>	<i>- 0,081</i>	<i>0,167</i>

**Tabela 6- Valores das absorbâncias lidas nas análises realizadas com o padrão de ácido fólico e com as amostras A e B de farinha de trigo.**

Abaixo estão apresentados nas figuras 8 e 9 respectivamente os gráficos das análises 1 e 2 com o padrão de ácido fólico.



**Figura 8 – Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna com sílica gel 60 – Análise (1) com o padrão de ácido fólico.**



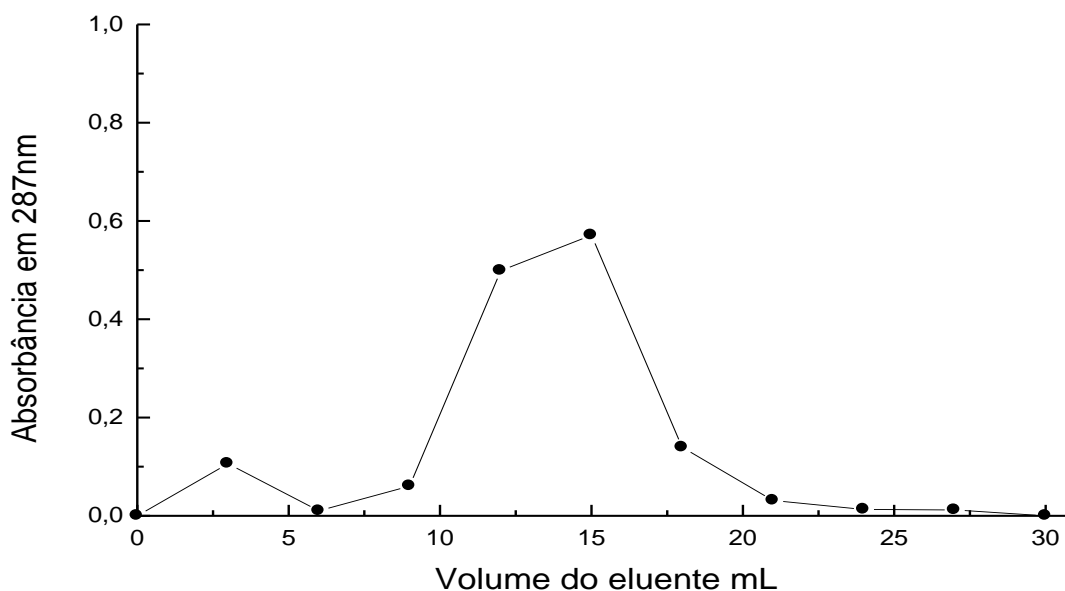
**Figura 9 - Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna com sílica gel 60 – Análise (2) com o padrão de ácido fólico.**

Na primeira análise com o padrão de ácido fólico observa-se maior absorvância de ácido fólico nos volumes de 10 a 17,5 mL. Analisando simultaneamente os dados da tabela 6 e a figura 8, conclui-se que o ácido fólico adicionado á coluna eluiu nos tubos 3,4,5 e 6.

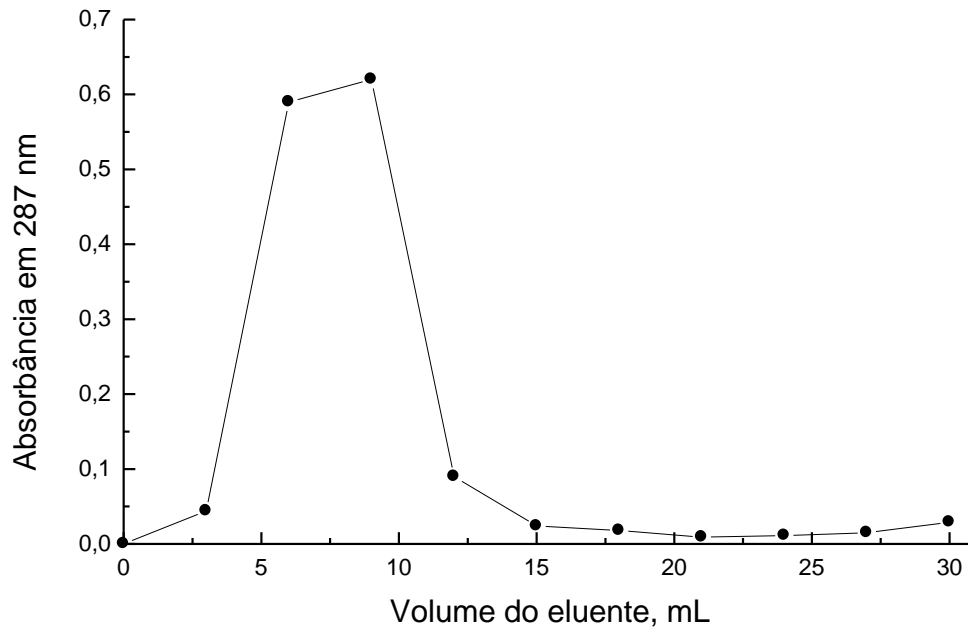
Na segunda análise com o padrão de ácido fólico observa-se maior absorvância de ácido fólico nos volumes de 5 a 12,5 mL. Analisando simultaneamente os dados da tabela 6 e a figura 9, conclui-se que o ácido fólico adicionado à coluna eluiu nos tubos 2,3 e 4.

Para efeito de construção de gráfico as absorvâncias negativas da analise com a amostra A, foram corrigidas para resultar em absorvâncias maiores ou iguais a zero.

Abaixo estão apresentados nas figuras 10 e 11 respectivamente os gráficos das análises após extração do ácido fólico das amostras das farinhas de trigo A e B.



**Figura 10 – Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna com sílica gel 60 - Análise com a amostra A.**



**Figura 11 – Eluição do ácido fólico em cromatografia de coluna com sílica gel 60 - Análise com a amostra B.**

Na análise com a amostra de farinha de trigo A, observa-se maior absorbância de ácido fólico nos volumes de 10 a 20 mL. Analisando simultaneamente os dados da tabela 6 e a figura 10, conclui-se que o ácido fólico adicionado á coluna eluiu nos tubos 4,5 e 6.

Na análise com a amostra de farinha de trigo B, observa-se maior abasorbância de ácido fólico nos volumes de 5 a 15 mL. Analisando simultaneamente os dados da tabela 6 e a figura 11, conclui-se que o ácido fólico adicionado á coluna eluiu nos tubos 2,3 e 4.

### 8.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NAS SOLUÇÕES PADRÃO E NAS AMOSTRAS DE FARINHA DE TRIGO

Observando-se os gráficos de eluição do ácido fólico, conclui-se que antes e após a sua eluição a linha base não se estabilizou. Para efeito de análise, decidiu-se assumir os pontos acima da linha base.

### 8.1.1 Determinação da concentração de ácido fólico nas soluções padrão.

A solução contendo o padrão de ácido fólico foi preparada com 5 mg de ácido fólico diluído em 100 mL do solvente etanol/água (2v/1v). Desta solução pipetou-se 1,5 mL e adicionou-se a coluna para a primeira análise com o padrão de ácido fólico. A partir desses valores, efetuou-se o cálculo para determinar a massa de ácido fólico conhecido injetado na coluna cromatográfica.

$$5 \times 10^{-3} \text{ g} \text{ ————— } 100 \text{ mL de solução}$$

$$X \text{ g} \text{ ————— } 1,5 \text{ mL de solução}$$

$X = 75 \times 10^{-6} \text{ g}$  ou  $75 \mu\text{g}$  de ácido fólico adicionado à coluna na primeira análise do padrão.

Nesta primeira análise com o padrão de ácido fólico, observou-se a sua eluição nos tubos 3, 4, 5 e 6. A somatória das absorvâncias nesses tubos foi de 2,027.

Para calcular a concentração de ácido fólico utilizou-se a equação de Lambert – Beer, descrita como;

$$A = \varepsilon \times b \times C \text{ (2)}$$

Onde:

A = Absorbância

b = Espessura da cubeta (cm)

C = Concentração Molar (mol/L)

$\varepsilon$  = Absortividade Molar ( $\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{L}$ )

Segundo Alaburda; Shundo (2007, p.97), o valor da absortividade molar do ácido fólico é de  $2,76 \times 10^7$  ( $\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{L}$ ). Substituindo os valores na equação temos:

$$2,027 = 2,76 \times 10^7 \times 1 \times C$$

$$C = 7,344 \times 10^{-8} \text{ M}$$

Para calcular a massa de ácido fólico, usa-se a fórmula da molaridade, descrita por:

$$m = M \times \text{PM} \times V \text{ (1)}$$

Onde:

M = Molaridade

m = massa

PM = peso molecular

V = volume

O peso molecular do ácido fólico é de 441,4 g/mol. O volume das amostras que apresentaram absorvância foi de 12,0 mL. Assim temos que:

$$m = 7,344 \times 10^{-8} \text{ mol/L} \times 441,4 \text{ g/mol} \times 0,012 \text{ L}$$

$m = 3,89 \times 10^{-7} \text{ g}$  ou  $0,389 \text{ } \mu\text{g}$  de ácido fólico na primeira análise com o padrão de ácido fólico.

Na segunda análise com o padrão de ácido fólico, observou-se a sua eluição nos tubos 2,3 e 4. A somatória das absorvâncias nesses tubos foi de 1,300.

Para calcular a concentração de ácido fólico utilizou-se a eq.(2), descrita como;

$$A = \varepsilon \times b \times C \text{ (2)}$$

Substituindo os valores na equação temos:

$$1,300 = 2,76 \times 10^7 \times 1 \times C$$

$$C = 4,7101 \times 10^{-8} \text{ M}$$

Para calcular a massa de ácido fólico, usa-se a form.(1), descrita por:

$$m = M \times \text{PM} \times V \text{ (1)}$$

O volume das amostras que apresentaram absorvância foi de 9,0 mL. Assim temos que:

$$m = 4,7101 \times 10^{-8} \text{ mol/L} \times 441,4 \text{ g/mol} \times 0,009 \text{ L}$$

$m = 1,87 \times 10^{-7} \text{ g}$  ou  $0,187 \text{ } \mu\text{g}$  de ácido fólico na segunda análise com o padrão de ácido fólico.

Os teores de ácido fólico obtidos nas análises 1 e 2, foram menores que o valor conhecido adicionado. Isto pode ser explicado por alguns fatores, como erros operacionais, bem como erros de método. Além disso, segundo Cavalcante et al., (2006, p.1), o ácido fólico sofre degradação de até 17 % de sua massa, quando exposto em presença de luz UV, por cerca de 120 minutos. O tempo gasto para cada análise foi de 3 a 4 horas. Neste período o ácido fólico esteve exposto à presença de luz, podendo ter sofrido fotodegradação.

### **8.1.2 Determinação da concentração de ácido fólico nas amostras A e B de farinha de trigo enriquecida.**

Nas análises com as amostras A e B, foram adicionados na coluna cromatográfica 2 mL da solução de 500 mL contendo a amostra após tratamento.

Na análise com a amostra A, o ácido fólico eluiu nos tubos 4,5 e 6. A somatória das absorvâncias, nesses tubos foi de 1,209.

Para calcular a concentração de ácido fólico na farinha de trigo A utilizou-se a eq.(2), descrita como:

$$A = \varepsilon \times b \times C \text{ (2)}$$

Substituindo os valores na equação temos:

$$1,209 = 2,76 \times 10^7 \times 1 \times C$$

$$C = 4,3804 \times 10^{-8} \text{ M}$$

Para calcular a massa de ácido fólico, usa-se a form. (1), descrita por:

$$m = M \times PM \times V \text{ (1)}$$

O volume das amostras que apresentaram absorvância foi de 9,0 mL. Assim temos que:

$$m = 4,3804 \times 10^{-8} \text{ mol/L} \times 441,4 \text{ g/mol} \times 0,009 \text{ L}$$

$$m = 1,7401 \times 10^{-7} \text{ g de ácido fólico em 2 mL.}$$

Efetuando o cálculo da diluição, temos que:

$$1,7401 \times 10^{-7} \text{ g} \quad \text{-----} \quad 2 \text{ mL}$$

$$X \text{ g} \quad \text{-----} \quad 500 \text{ mL}$$

$$X = 4,35 \times 10^{-5} \text{ g ou } 43,50 \text{ } \mu\text{g de ácido fólico em 50 g de farinha de trigo.}$$

Na análise com a amostra B, o ácido fólico eluiu nos tubos 2,3 e 4. A somatória das absorvâncias, nesses tubos foi de 2,299.

Para calcular a concentração de ácido fólico na farinha de trigo B utilizou-se a eq. (2), descrita como;

$$A = \varepsilon \times b \times C \text{ (2)}$$

Substituindo os valores na equação temos:

$$2,299 = 2,76 \times 10^7 \times 1 \times C$$

$$C = 8,3297 \times 10^{-8} \text{ M}$$

Para calcular a massa de ácido fólico, usa-se a form. (1), descrita por:

$$m = M \times PM \times V \text{ (1)}$$

O volume das amostras que apresentaram absorvância foi de 9,0 mL. Assim temos



que:

$$m = 8,3297 \times 10^{-8} \text{ mol/L} \times 441,4 \text{ g/mol} \times 0,009 \text{ L}$$

$$m = 3,3090 \times 10^{-7} \text{ g de ácido fólico em 2 mL.}$$

Efetuada o cálculo da diluição, temos que:

$$3,3090 \times 10^{-7} \text{ g} \text{ ————— } 2 \text{ mL}$$

$$Y \text{ g} \text{ ————— } 500 \text{ mL}$$

$$Y = 8,272 \times 10^{-5} \text{ g ou } 82,72 \text{ } \mu\text{g de ácido fólico em 50 g de farinha de trigo.}$$

Na tabela abaixo, estão apresentados os valores de ácido fólico presente nas amostras de farinha de trigo avaliadas.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de ácido fólico (<math>\mu\text{g}/ 50 \text{ g de farinha de trigo}</math>)</b>
<b>A</b>	43,50
<b>B</b>	82,72

**Tabela 7 – Teor de ácido fólico nas amostras de farinha de trigo avaliadas.**

A amostra A, apresentou um teor de ácido fólico menor que o declarado no rótulo. Segundo a Legislação, para cada 50 g de farinha, deve haver no mínimo 75  $\mu\text{g}$  de ácido fólico. O valor encontrado através da técnica de cromatografia de coluna para a amostra A foi de 43,5042  $\mu\text{g}$  de ácido fólico em 50 g de farinha de trigo fortificada. A amostra B, apresentou um teor de ácido fólico, maior que o declarado no rótulo, estando, porém de acordo com a legislação. O valor encontrado através da técnica de cromatografia de coluna para a amostra B foi de 82,7265  $\mu\text{g}$  de ácido fólico em 50 g de farinha de trigo fortificada.

A diferença entre os valores encontrados e o valor declarado no rótulo pode ser explicada por alguns fatores como erros operacionais, bem como erros de método. Além disso, segundo Cavalcante et al.,(2006),o ácido fólico sofre degradação de até 17 % de sua massa, quando exposto em presença de luz UV, por cerca de 120 minutos. O tempo gasto para cada análise foi de 3 a 4 horas. Neste período o ácido fólico esteve exposto à presença de luz, podendo ter sofrido fotodegradação.

## 9. CONCLUSÃO

A determinação de ácido fólico por cromatografia de coluna em sílica gel 60 apresentou dificuldades devido à instabilidade do ácido fólico. O ácido fólico degrada em presença de oxigênio e luz UV.

Apesar da fotodegradação do ácido fólico foi obtido um valor para a farinha B, próximo ao valor do rótulo.

São necessários melhores estudos para controlar os fatores responsáveis pela baixa concentração de ácido fólico obtido.

É necessário também, o uso de outro método quantitativo, como o método de cromatografia líquida de alta eficiência – método tradicional para determinação de ácido fólico – para comparar, discutir e validar os resultados obtidos neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINI, Tânia da Silveira. **Desenvolvimento de Metodologia para determinação simultânea por CLAE, das vitaminas B1, B2, B6, Ácido Nicotínico e Nicotinamida em alimentos enriquecidos.** 1996. 209p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, 1996.

ALABURDA, Janete; SHUNDO, Luzia. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, nº 66, 2007, p. 95-102.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **A Importância das farinhas fortificadas com ferro e ácido fólico.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/folder\\_farinha.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/folder_farinha.pdf)>. Acesso em: 27.jan.2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fortificação de farinhas.**

Brasília. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>>

Acesso em: 12.abril. 2011.

ANVISA. Ministério da Saúde. **Resolução-RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002.** Disponível em: Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm)>. Acesso em: 25. jan. 2012.

ARAÚJO, Michel Mozeika. **Efeito do processamento por ionização, calor e micro-ondas na degradação do ácido fólico**. 2012. 148p. Tese (Doutorado) - Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2012.

AZEVEDO, Juliana Lima-Pallone; CATHARINO, Rodrigo Ramos; GODOY, Helena Teixeira. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**, vol. 29, nº. 5, 2006, p. 972-976.

BARATIERI, S. M.; BASSO, N. R. S.; BORGES, R. M. R.; FILHO, J. B. R. Opinião dos estudantes sobre a experimentação em química no Ensino Médio. **Experiências em Ensino de Ciências**, v.3, 2008, p.19-31.

BOEN, Thaís Rezende; SOEIRO, Bruno Thiago; PEREIRA-FILHO, Edenir Rodrigues; LIMA-PALLONE, Juliana Azevedo. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por Componentes Principais (PCA). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, jul.-set, 2010, p. 618-624.

BORSOI, Maria Ângela. **Nutrição e Dietética: Noções Básicas**. 10. ed. São Paulo: Editora Senac, 2004.

BUFALINO, Andreia. **Análise da suplementação vitamínica e de polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico em mães de indivíduos com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas**. 2010. 96p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, 2010.

CAMPÊLO, Wilma Félix. **Efeito da adição de ferro e ácido fólico nas características da qualidade do bolo**. 2004.116p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2004.

CATHARINO, Rodrigo Ramos; GODOY, Helena Teixeira. Otimização da determinação de ácido fólico em leites enriquecidos através da análise de superfície de resposta. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, nº21, setembro-dezembro, 2001, p.326-329.

CAVALCANTE, Robson Alves Fernandes; SANTOS, Marcello Moreira; VASCONCELOS, Soraya Almeida; PACHECO, Wesley Luis. **Estudo da foto estabilidade do Ácido Fólico (AF) puro**. 29<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0013-1.pdf>>. Acesso em 24 out. 2012.

CREPALDI, Paulo Fernando. **Desenvolvimento e validação de metodologia por clae para o estudo da estabilidade do ácido fólico em arroz enriquecidos**. 2006. 132p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciência de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, 2006.

COLLINS, Carol. H; BRAGA, Gilberto. L; BONATO, Pierina. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7<sup>o</sup> Ed. Campinas, Editora da Unicamp, 1997.

DAMODARAM, Srinivasan; KIRK, L. Parkin; OWEN, R. Fennema. **Química de Alimentos de Fennema**. 4<sup>o</sup> Ed. Porto Alegre, Artmed, 2010.

DELVIN, Thomas M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 5<sup>o</sup> Ed. São

Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2003.

ELIAS, Elede Martins. **Ácido fólico e ferro em alimentos**. 2010. 192p. Tese (Doutorado) - Departamento de Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, 2010.

FARIAS; BASAGLIA; ZIMMERMANN. **A importância das atividades experimentais no Ensino de Química**. Congresso Paranaense de Educação Em Química. Disponível em: <http://www.uel.br/eventos/cpequi/CompletoSPagina/18274953820090622.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2012.

FERREIRA, Ana Flávia Stein. **Consumo de farináceos fortificados e de folatos por mulheres em idade fértil de Porto Alegre, RS, Brasil**. 87p. 2005. Dissertação – (Mestrado) –Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

GAMA, Fernanda Nunes; FERREIRA, Gedeon Alves. Percepção de gestantes quanto o ácido fólico e sulfato ferroso durante o pré-natal. **Revista Enfermagem Integrada**, n°.2, nov/dez, 2010, p.578-589.

GODOY, Helena Teixeira; AZEVEDO, Juliana Lima-Pallone; CATHARINO, Rodrigo Ramos. Determinação de folatos em espinafre – avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. **Sociedade Latinoamericana de Nutrição**, vol. 58 n° 1, 2008, p.81-86.

JUNIOR, Wilmo E. Francisco; FERREIRA, Luiz Henrique; HARTWING, Dácio

Rodney. Experimentação problematizadora: fundamentos teóricos e práticos para a aplicação em salas de aula de ciências. **Química Nova na Escola**, nº 30, novembro, 2008, p.34-41.

KIRA, Carmen Silva; BUZZO, Márcia Liane; CARVALHO, Maria de Fátima Henrique; DURAN, Maria Cristina; SAKUMA, Alice Momoyo. Avaliação dos teores de ferro em farinhas fortificadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, nº65, 2006, p.181-185.

LEHNINGER, Albert Lester. **Princípios de Bioquímica**. Tradução de W. R. Lodi; A.A. Simões. São Paulo: Editora Sarvier, 1984.

LIMA, Juliana Azevedo; GODOY, Helena Teixeira; CATHARINO, Rodrigo Ramos. Folatos em vegetais: importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. **Alim. Nutr**, v.14, n.1, 2003, p.131-137.

LUCINDO, Jefferson. **Utilização de kits: método facilitador para professores de química**. 2010. 80p. Trabalho de Conclusão de Curso - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, São Paulo, Assis, 2010

MAHAN, Kathelen L.; ESCOTT-STUMP, Sylvia. **Alimento, nutrição e dietoterapia**. Tradução Andréa Farano – São Paulo, 2005.

MARCONDES, Maria Eunice Ribeiro; SUART, Rita de Cássia. A manifestação de habilidades cognitivas em atividades experimentais investigativas no ensino médio de química. **Ciências & Cognição**, vol.14, 2009; p.50-74.



MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Editora Guanabara Koogan S.A., Barueri, 1999.

MORESCHI, Elaine Cristina Pinto. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos**. 2006. 222p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2006.

NASSER, Carina; NOBRE, Cássia; MESQUITA, Suely; RUIZ, José Gomes; CARLOS, Hosana Reis; PROUVOT, Lígia; YACUBIAN, Elza Márcia Targas. Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, 2005, p. 199-203.

NEVES, Amanda Porto; GUIMARÃES, Pedro Ivo Canesso; MERÇON, Fábio. Interpretação de rótulos de alimentos no ensino de Química. **Química Nova na Escola**, vol. 31 n° 1, fevereiro, 2008, p. 34-39.

OLIVEIRA, José Eduardo Dutra. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Editora Sorvier, 1998.

PANE, Daniela Queiroz. **Ácido Fólico em Achocolatados**. 2007. 192p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, 2007.

PLANTIER, Stéphanie Bragatto. **Avaliação do teor de ferro em farinhas enriquecidas**. 2010. 46p. Trabalho de conclusão de curso - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – Fundação Educacional do Município de Assis, São

Paulo, Assis, 2010.

PONDER, E. L.; FRIED, B; SHERMA, J. Thin-layer chromatographic analysis of hydrophilic vitamins in standards and from *Helisoma trivolvis* snails. **Acta chromatographica**, nº 14, 2004, p. 70- 82.

RAMOS, Silvia Cristina; MAGNONI, Daniel; CUKIER, Celso. **Ferro e Ácido Fólico**. Instituto de Metabolismo e Nutrição. Disponível em: <[http://www.amway.com.br/downloads/misc/Ferro e AcFolico IMEN.pdf](http://www.amway.com.br/downloads/misc/Ferro_e_AcFolico_IMEN.pdf)>. Acesso em: 21 Jul. 2012.

RIBEIRO, Elaine Maria Figueiredo; MAIA Juliana de Oliveira; WARTHA Edson José. As Questões Ambientais e a Química dos Sabões e Detergentes. **Química Nova na Escola**, vol. 32, nº 3, Agosto, 2010, p.169-175.

SAMPAIO, Camila Ramos Pinto. **Desenvolvimento e estudo das características sensoriais e nutricionais de barras de cereais fortificadas com ferro**. 2009. 88p. Dissertação (Mestrado) – Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, 2009.

SANCHO, Soraya de Oliveira; MAIA, Geraldo Arraes; FIGUEIREDO, Raimundo Wilane; RODRIGUES, Sueli; RABELO, Maria Cristiane. Avaliação da metodologia microbiológica para determinação de 5-metiltetrahidrofolato em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). In: **BOLETIM TÉCNICO**. Unicamp, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2010, 6 p.

SANTOS, Leonor Maria Pacheco; PEREIRA, Michelle Zanon. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Caderno de Saúde Pública**, vol. 23, jan, 2007, p.17-24.

SCURACHIO, Regina Spricigo. **Fotodegradação de folatos sensibilizados por flavinas**. 2010. 80p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Carlos, 2010.

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO BÁSICA. **Orientações curriculares para o ensino médio**. Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, 2006.

SENA Cristiane da Silva. **Estabilidade físico-química de ácido fólico em farinha de milho fortificada**. 2006. 98p. Dissertação (Mestrado) – Ciência de Alimentos - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Londrina, 2006.

SILVA, Sidnei Luis A.; FERREIRA, Geraldo Alberto L.; SILVA, Roberto Ribeiro. A procura da vitamina C. **Química Nova na Escola**, nº 2, novembro, 1995, p.31-32.

TORRES, Marco A. A.; SATO, Kazue; LOBO, Neil Ferreira; QUEIROZ, Suzana de Souza. Efeito do uso de leite fortificado com ferro e vitamina C sobre os níveis de hemoglobina e condição nutricional de crianças menores de 2 anos. **Revista Saúde Pública**, nº29, 1995, p.301-307.

TUMA, Rahilda Brito; YUYAMA, Lucia Kiyoko Ozaki; AGUIAR, Jaime Paiva Lopes; MARQUES, Hedylamar Oliveira. Impacto da farinha de mandioca fortificada com ferro aminoácido quelato no nível de hemoglobina de pré-escolares. **Revista Nutrição**, nº16, jan/mar, 2003, p. 29-39.

ZANCUL, Mariana de Senzi. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. **Revista Medicina**, v.37, jan.-jun, 2004, p. 45-50.

## **ANEXO 1 - REGULAMENTO TÉCNICO PARA FORTIFICAÇÃO DAS FARINHAS DE TRIGO E DAS FARINHAS DE MILHO COM FERRO E ÁCIDO FÓLICO.**

### **1. ALCANCE**

#### **1.1. Objetivo**

Tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico.

#### **1.2. Âmbito de Aplicação**

O presente Regulamento Técnico se aplica a obrigatoriedade da fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Excluem-se deste Regulamento, devido a limitações de processamento tecnológico, os seguintes produtos: farinha de bijú ou farinha de milho obtida por maceração; flocão; farinha de trigo integral e farinha de trigo durum.

### **2. DEFINIÇÕES**

2.1. Para efeito deste Regulamento Técnico entende-se por farinhas de milho: os fubás e os flocos de milho.

### **3. REFERÊNCIAS**

3.1. BRASIL. Decreto-Lei nº 986, de 12 de outubro de 1969. Institui Normas Básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 21 de outubro de 1966.

3.2. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - Definições, Classificação e Emprego. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de outubro de 1997.

3.3. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 27, de 14 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília 16 de janeiro de 1998.

3.4. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de março de 1998.

3.5. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Tabelas de Ingestão Diária Recomendada IDR. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

3.6. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 42, de 14 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário oficial da União, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

- 3.7. BRASIL. Resolução nº 23, de 15 de março de 2000. Regulamento Técnico sobre o Manual de Procedimentos Básicos para o Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de março de 2000.
- 3.8. BRASIL. Resolução- RDC nº 39, de 21 de março de 2001. Tabela de Valores de Referência para Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para fins de Rotulagem Nutricional. Diário oficial da União, Brasília, 22 de março de 2001.
- 3.9. BRASIL. Resolução- RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, 22 de março de 2001.
- 3.10. BRASIL. Resolução nº 385, de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que Aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 6- Cereais e Produtos de ou a Base de Cereais. Diário Oficial da União, Brasília, 09 de agosto de 1999.
- 3.11. ATA da I Reunião Ordinária da Comissão Interinstitucional de Condução e Implementação das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo e de Milho e seus Subprodutos. Brasília, 19 de Abril de 2002. Documento digitado.
- 3.12. BRASIL. Portaria - MS/GM nº 14, de 03 de janeiro de 2002. Institui a Comissão interinstitucional de Condução e Implementação das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo e de Milho e seus Subprodutos. Diário Oficial da União, Brasília, 08 de janeiro de 2002.
- 3.13. BRASIL. Portaria - MS nº 291, de 08 de fevereiro de 2002. Inclui no art. 2º da Portaria nº 14 MS/GM. Diário Oficial da União, Brasília, 13 de fevereiro de 2002.
- 3.14. Manual de fortificação de farinha de trigo com ferro. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2001, 56p. Documentos, ISSN 0103-6068; 46.
- 3.15. Manual de fortificação de fubá e flocos de milho com ferro. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2001, 56p. Documentos, ISSN 0103-6068; 47.
- 3.16. BRASIL. Portaria - MS nº 710, de 10 de junho de 1999. Aprova a Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de junho de 1999.
- 3.17. BRASIL. Resolução CNNPA nº 12 de 1978. Aprova os Padrões de Identidade e Qualidade para os alimentos (e bebidas) constantes desta Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de julho de 1978.
- 3.18. The Prevention of Neural Tube Defects with Folic Acid. Pan American Health Organization / World Health Organization, Division of Health Promotion and Protection, Food and Nutrition Program. Centers for Disease Control and Prevention, Birth Defects and Pediatric Genetics- CDC. p. 5-15.

3.19. Iron Fortification: Where Are We in Terms of Iron Compounds a PAHO/FNP/USAID Technical Consultation. Nutrition Reviews, v. 60, n. 7 (part II), jul. 2002. 61p.

#### 4. PRINCÍPIOS

4.1. É obrigatória a adição de ferro e de ácido fólico nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho pré-embaladas na ausência do cliente e prontas para oferta ao consumidor, as destinadas ao uso industrial, incluindo as de panificação e as farinhas adicionadas nas pré-misturas, devendo cada 100g de farinha de trigo e de farinha de milho fornecerem no mínimo 4,2 mg (quatro vírgula dois miligramas) de ferro e 150 mcg (cento e cinquenta microgramas) de ácido fólico.

4.2. As farinhas de trigo e as farinhas de milho fortificadas utilizadas como ingredientes em produtos alimentícios industrializados, onde comprovadamente o ferro e ou ácido fólico causem interferências, poderão ser isentas da adição de ferro e ou ácido fólico. A empresa deve manter a disposição do Órgão de Vigilância Sanitária, os estudos que comprovem essa interferência.

4.3. A escolha dos compostos de ferro para fortificação é de responsabilidade das indústrias, que devem garantir a estabilidade destes nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho dentro dos prazos de validade das mesmas.

4.4. As empresas devem assegurar que os compostos de ferro de grau alimentício sejam biodisponíveis.

4.5. As empresas poderão utilizar os seguintes compostos de ferro de grau alimentício: sulfato ferroso desidratado (seco); fumarato ferroso; ferro reduzido - 325 mesh Tyler; ferro eletrolítico - 325 mesh Tyler; EDTA de ferro e sódio (NaFeEDTA); e ferro bisglicina quelato. Podem ser usados outros compostos desde que a biodisponibilidade não seja inferior a dos compostos listados.

4.6. As empresas deverão utilizar o ácido fólico de grau alimentício, garantindo a estabilidade deste nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho dentro do prazo de validade das mesmas.

#### 5. ROTULAGEM

5.1. As farinhas de trigo e as farinhas de milho devem ser designadas usando-se o nome convencional do produto de acordo com a legislação específica, seguido de uma das seguintes expressões: fortificada(o) com ferro e ácido fólico ou enriquecida(o) com ferro e ácido fólico ou rica(o) com ferro e ácido fólico.

5.2. As farinhas de trigo e as farinhas de milho fortificadas usadas como ingredientes deverão ser declaradas na lista de ingredientes da rotulagem com as seguintes expressões: farinha de trigo fortificada ou enriquecida ou rica com ferro e ácido fólico; e farinha de milho fortificada ou enriquecida ou rica com ferro e ácido fólico.

5.3. Os produtos processados que contém como ingrediente as farinhas de trigo e ou as farinhas de milho fortificadas com ferro e ácido fólico e queiram usar as denominações citadas no item anterior, devem atender as disposições estabelecidas no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais.

## 6. ADITIVOS

É permitida a utilização dos aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia previstos legislação específica.