

# ÁCIDO FÓLICO EM LEITE E BEBIDA LÁCTEA ENRIQUECIDOS – ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA<sup>1</sup>

Juliana. A. LIMA<sup>2</sup>, Rodrigo R. CATHARINO<sup>2</sup>, Helena T. GODOY<sup>2,\*</sup>

## RESUMO

O ácido fólico é uma vitamina, que desempenha funções importantes, o que justifica seu uso nos processos de enriquecimento dos alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade do ácido fólico, utilizado no enriquecimento, durante a vida-de-prateleira de amostras dos seguintes produtos: leites em pó, leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo. A determinação desta vitamina foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência. O ácido fólico foi extraído com solução básica e a limpeza do extrato foi realizada com ácido tricloroacético concentrado seguida de filtração. No processo cromatográfico utilizou-se coluna C<sub>18</sub>, sistema de eluição por gradiente, sendo a fase móvel composta por tampão acetato e acetonitrila. A detecção foi feita na região do ultravioleta, a 290nm, e a quantificação por padronização externa. Nas amostras de leites em pó durante o período de estocagem de um ano ocorreram perdas acentuadas desta vitamina (60% em média), enquanto nas de leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas as perdas foram, em média, de 25 e 29%, respectivamente, durante os quatro meses de estocagem.

**Palavras-chave:** ácido fólico; CLAE; leite em pó; leite esterilizado; bebida láctea achocolatada.

## SUMMARY

FOLIC ACID IN ENRICHED MILK AND MILK BEVEVERAGES – SHELF-LIFE STUDY. Folic acid is a vitamin which plays important roles, that justify its use in enriched foods. The aim of this work was to evaluate the stability of folic acid during the shelf-life of enriched samples of powdered milk, sterilized milk and ready-to-drink milk chocolate beverages. The determination was done by high performance liquid chromatography. Folic acid was extracted by a basic solution and the clean-up was carried out by the addition of trichloroacetic acid, followed by filtration. In the chromatographic process, a C<sub>18</sub> column and gradient elution were used. The mobile-phase consisted of acetate buffer and acetonitrile. Detection was carried out in the ultraviolet region, at 290nm, and quantification by external standardization. For powdered milk considerable losses of vitamin were observed (60% on average), after one year of storage. For the sterilized milk and ready-to-drink milk chocolate beverage, the losses of folic acid were 25 and 29%, respectively, during the four months of storage.

**Keywords:** folic acid; HPLC; powder milk; sterilized milk; chocolate beverages.

## 1 – INTRODUÇÃO

Muitos trabalhos científicos têm apresentado dados que apontam uma ingestão insuficiente de vários nutrientes por parte da população mundial como um todo. Para tentar amenizar esse quadro e atender as recomendações em relação aos teores de compostos responsáveis pela manutenção da saúde, que devem estar presentes em produtos novos lançados no mercado, além de atender a padrões de identidade e regulamentos referentes a alimentos já existentes, é que tem sido feito o enriquecimento de produtos alimentícios [5]. Produtos lácteos, leite, farinhas, cereais, biscoitos, enfim, produtos com expressivo consumo pela população em geral têm sido os mais utilizados para esse fim.

A baixa ingestão de ácido fólico tem sido apontada como possível causa de doenças graves que atingem o homem, como as doenças cardíacas, o câncer e as malformações congênitas [8, 9, 14]. Programas de enriquecimento de alimentos e políticas elucidativas sobre a importância dessa vitamina têm sido implantadas por

alguns governos. Nos Estados Unidos, o FDA (Food Drug Administration) determinou que o ácido fólico deveria ser adicionado (140µg/100g) em produtos como cereais, incluindo farinha, pão, cereais de refeição, arroz e macarrão, normativa, com efeito, a partir de janeiro de 1998 [5, 15].

O ácido fólico é a forma mais estável dentre os folatos, sendo a escolhida para o enriquecimento de alimentos [7], entretanto, durante os processos de fabricação e estocagem podem ocorrer perdas, até mesmo da vitamina adicionada.

Muito pouco se conhece a respeito da resistência do ácido fólico frente às condições de processamento e estocagem. Fatores como temperatura, luz, pH, presença de catalisadores e agentes oxidantes são responsáveis pela degradação do ácido fólico [1, 2, 3, 5, 16]. GREGORY [13] mostrou que os fatores que parecem ter alguma importância na avaliação do comportamento de folatos são a presença de oxigênio e ácido ascórbico, além do conteúdo de água presente. DONG & OACE [10], mostraram que leites submetidos a esterilização e subseqüente estocagem apresentaram variada taxa de retenção de folatos (0 – 80%), dependendo da raça e tipo de alimentação do animal, das condições do processo, da presença de vitamina C e da concentração de oxigênio durante e após o processo. FORD et al. [12], FAVIER et al. [11] e RENNER [17] relataram que a estabilidade de folatos, durante o período de estocagem de leites processados, depende principalmente das quantidades de ácido ascórbico e oxigênio presentes, sendo o ácido

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 02/10/2002. Aceito para publicação em 23/12/2003 (000996).

<sup>2</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Telefone: +55-19-37884024. FAX: +55-19-37882159. E-mail: helena@fea.unicamp.br

\*A quem a correspondência deve ser enviada.

ascórbico protetor e o oxigênio um agente que atua na degradação dos folatos.

Dessa forma, estudos sobre a estabilidade do ácido fólico em alimentos enriquecidos tornam-se bastante úteis, no sentido de garantir a qualidade dos produtos, assegurando até o final do seu prazo de validade o valor nutricional, além de orientar o produtor na sobredosagem necessária, para a produção, e das melhores condições de embalagem, transporte e armazenamento.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Produtos avaliados

Foram analisados quatro tipos de leite esterilizado (LLA, LLB, LLC e LLD), leite em pó (LPA, LPB, LPC e LPD) e bebida láctea achocolatada pronta para o consumo (BAA, BAB, BAC e BAD), todos enriquecidos com ácido fólico. As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas/SP. As determinações foram feitas em três diferentes lotes (1, 2 e 3), em duplicata, para cada amostra, diferenciados pelas datas de fabricação, com a preocupação de estarem com o menor tempo de fabricação possível. Cada lote foi formado por duas embalagens, que tiveram seu conteúdo homogeneizado antes da retirada da amostra. Todos os produtos analisados estavam sem danos aparentes. O estudo de vida-de-prateleira foi efetuado com a análise mensal de cada amostra, até o final do prazo de validade, com exceção das amostras de leite em pó que, por apresentarem maior prazo de validade, foram analisadas em intervalos de tempo maiores, 2 meses.

### 2.2 - Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (HEWLETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100µL. Para a separação do ácido fólico foi utilizada uma coluna cromatográfica Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150 X 4,6mm d.i. (Rainin Instrument Company), protegida por uma coluna de guarda Bondesil, C<sub>18</sub>, 5µm, 10 X 4,6mm d.i. (VARIAN). Utilizou-se um detector de arranjo de diodos (DAD) da marca HP, série 1100. Acoplado ao sistema o software HP-Chemstation que, além de monitorar todos os componentes, permitiu o melhor tratamento dos dados.

### 2.3 - Determinação do ácido fólico

A metodologia utilizada neste trabalho foi desenvolvida e validada para leites por CATHARINO & GODOY [6]. Para a análise, foram tomados 1mL das amostras líquidas e 1,0g das amostras de leites em pó, previamente homogeneizados. A água utilizada no preparo das amostras e das fases móveis foi purificada no sistema Mili-Q (Millipore). O ácido fólico foi extraído das matrizes alimentícias utilizando-se, aproximadamente, 3,0mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L, MERCK, Brasil), colocado em banho ultra-sônico por 10 minutos. Para a limpeza do extrato transferiu-se quantitativamente a solu-

ção para balão volumétrico de 10mL, adicionou-se 3,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L, MERCK, Brasil), 2,0mL de tampão fosfato, composto por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,25mol/L, MERCK, Brasil)/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,37mol/L, MERCK, Brasil) e 350µL de ácido tricloroacético (Synth, Brasil), completando-se o volume do balão com tampão fosfato. Após a homogeneização, seguiram-se duas etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a segunda em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45µm. Seguiu-se, então, a injeção de 100µL do extrato no cromatógrafo.

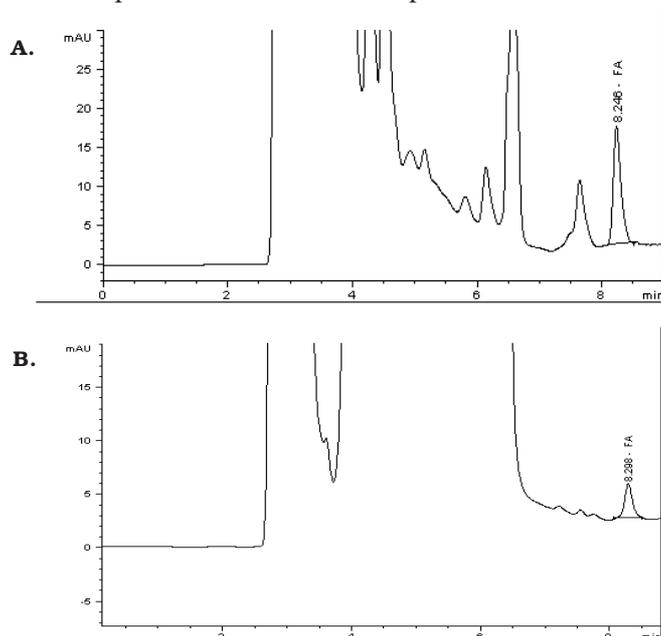
Utilizou-se sistema de eluição por gradiente para a separação do ácido fólico a vazão de 0,5mL/min, com 90% de tampão acetato (TPAC), contendo 0,166mol/L de ácido acético (MERCK, Brasil) e 0,01mol/L de hidróxido de potássio, a pH 2,8, e 10% de acetonitrila (ACN, MERCK, Brasil) (v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de TPAC e 24% de ACN (v/v), mantendo-se essa proporção até 9,0 minutos. Para as bebidas lácteas achocolatadas prontas para o consumo, o gradiente chegou em 10,5 minutos a 76% de TPAC e 24% de ACN (v/v), mantendo-se a proporção até 11,0 minutos. Para ambos os casos, as condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 7 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando-se o comprimento de onda de leitura a 290nm. A identificação da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos no DAD. A pureza do pico foi determinada pelo sistema *ploter* disponível no software HP-Chemstation. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, utilizando-se padrão SIGMA cód. F-7876, lote 40H321, sendo a curva analítica construída com 7 níveis de concentração (0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,50 e 1µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

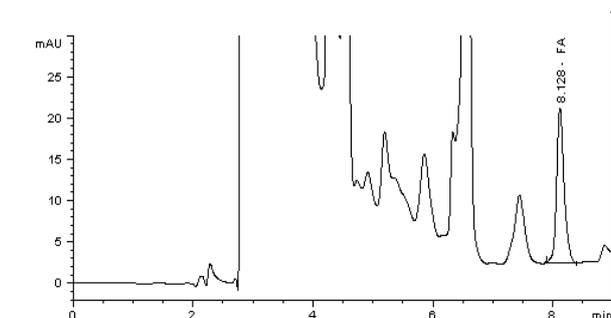
Nas Figuras 1 e 2 podem ser visualizados os perfis cromatográficos dos produtos enriquecidos analisados. O pico do ácido fólico aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 8,2 minutos. Para os achocolatados, em virtude da presença de interferentes, o gradiente de eluição teve que ser ligeiramente modificado. Desta forma, o interferente teve seu tempo de retenção deslocado, permitindo que o ácido fólico pudesse ser separado.

Os teores iniciais de ácido fólico encontrados nas amostras são apresentados na Tabela 1. Todas as amostras de leite em pó continham ácido fólico, mesmo aquelas de diferentes lotes, de acordo com o apresentado na embalagem do produto, com pequenas variações em relação a esses valores. Nos leites esterilizados, os da marca LLA apresentaram apenas 40% da quantidade especificada no produto, em todos os lotes. A situação mais alarmante foi com os leites LLB que apresentaram somente 7,6% do teor da vitamina. As outras duas

marcas tinham concentrações próximas às declaradas. Nas amostras de bebidas lácteas a situação foi a mesma dos leites esterilizados, em duas, (BAA e BAB) das quatro marcas analisadas, os teores não chegaram a 20% da quantidade declarada no produto.



**FIGURA 1.** Perfis cromatográficos dos extratos de leite em pó (A) e leite esterilizado (B) enriquecidos com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0,166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de tampão acetato (0,166mol/L), mantendo-se as condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.



**FIGURA 2.** Perfil cromatográfico do extrato de bebida láctea achocolatada enriquecida com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de tampão acetato (0,166mol/L) no início da corrida, chegando em 10,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de tampão acetato (0,166mol/L), mantendo-se as condições até 11,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.

Os resultados obtidos neste trabalho, em relação aos teores de ácido fólico inicialmente presentes nas matrizes analisadas, confirmaram as observações feitas por GREGORY [13] em relação à influência da atividade de água nos processos de degradação dos

folatos, o que justificaria as diferenças obtidas entre as amostras fluidas e em pó. Segundo o mesmo autor, quanto maior a atividade de água, menor a estabilidade da vitamina. No caso dos leites em pó, produtos com baixa atividade de água, os teores de ácido fólico encontravam-se próximos dos valores declarados nos rótulos.

**TABELA 1.** Teores de ácido fólico em leite em pó, leite esterilizado e bebida láctea enriquecida.

Amostras	Tipos/Lotes	Data de fabricação	PV (meses)	*Rótulo (µg/100g) ou (µg/100mL)	Data da Análise	Acido fólico (µg/100g) ou (µg/100mL)	
						M ± DP	CV(%)
Leite em pó	LPA1	11/10/99	12	140	24/01/00	142.3±0.5	0.3
	LPA2	17/10/99			24/01/00	143.7±0.5	0.3
	LPA3	29/10/99			24/01/00	145.4±0.4	0.3
Média entre lotes						144±1	0.7
Leite em pó	LPB1	07/12/99	12	46	25/03/00	51.7±0.6	1.2
	LPB2	03/12/99			25/03/00	53.4±0.5	0.9
	LPB3	02/12/99			25/03/00	54.1±0.6	1.1
Média entre lotes						53±1	1.9
Leite em pó	LPC1	22/12/99	12	140	25/03/00	132.4±0.7	0.5
	LPC2	03/12/99			25/03/00	133.4±0.9	0.7
	LPC3	05/11/99			25/03/00	146.0±1.0	0.7
Média entre lotes						137±6	4.4
Leite em pó	LPD1	17/11/99	24	78	24/02/00	75.3±0.8	1.0
	LPD2	18/11/99			24/02/00	75.8±0.5	0.7
	LPD3	16/11/99			24/02/00	77.6±0.7	0.7
Média entre lotes						76.2±0.9	1.2
Leite Esterilizado	LLA1	20/07/00	3	20	19/08/00	7.7±0.6	7.8
	LLA2	11/08/00			29/08/00	7.7±0.6	7.8
	LLA3	05/09/00			07/10/00	7.9±0.8	9.0
Média entre lotes						7.8±0.1	1.3
Leite Esterilizado	LLB1	23/06/00	3	300	27/07/00	22.9±0.6	2.6
	LLB2	17/07/00			18/08/00	22.5±0.9	4.0
	LLB3	13/07/00			12/08/00	24.4±0.7	2.9
Média entre lotes						23±1	4.3
Leite Esterilizado	LLC1	20/07/00	3	5.625	07/08/00	5.9±0.2	3.4
	LLC2	27/07/00			28/08/00	5.8±0.5	8.6
	LLC3	11/08/00			18/08/00	5.2±0.6	11.5
Média entre lotes						5.6±0.4	7.1
Leite Esterilizado	LLD1	27/06/00	4	32.5	25/07/00	35.8±0.5	1.4
	LLD2	07/07/00			14/08/00	30.5±0.5	1.6
	LLD3	04/08/00			24/08/00	26.4±0.4	1.5
Média entre lotes						31±5	15.2
Bebida Láctea Achocolatada	BAA1	13/09/00	6	300	18/10/00	45.6±0.9	2.0
	BAA2	12/07/00			20/08/00	45.6±0.2	0.4
	BAA3	13/07/00			20/08/00	56.6±0.8	1.4
Média entre lotes						49±6	12.8
Bebida Láctea Achocolatada	BAB1	13/09/00	6	300	18/10/00	48.5±0.6	1.2
	BAB2	12/07/00			20/08/00	52.3±0.6	1.1
	BAB3	13/07/00			20/08/00	44.9±0.5	1.1
Média entre lotes						49±4	7.6
Bebida Láctea Achocolatada	BAC1	29/07/00	6	30	12/08/00	44.0±0.8	1.8
	BAC2	15/07/00			12/08/00	48.6±0.2	0.4
	BAC3	19/09/00			16/10/00	38.1±0.7	1.8
Média entre lotes						44±5	12.2
Bebida Láctea Achocolatada	BAD1	09/08/00	6	30	19/09/00	36.2±0.6	1.7
	BAD2	06/08/00			19/09/00	40.3±0.2	0.5
	BAD3	07/08/00			19/09/00	37.8±0.6	1.6
Média entre lotes						38±2	5.5

PV- Prazo de validade, tempo em meses em que o produto pode ser consumido  
 \*Concentração de ácido fólico descrita na embalagem do produto  
 M ± DP média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicata  
 CV- Coeficiente de variação

Considerando que os produtores tenham realmente adicionado ácido fólico numa quantidade de pelo menos 100% a mais, o que é recomendado pelos fabricantes de "premix", as variações das diferenças entre os valores encontrados e dos apresentados nos rótulos, podem, ser explicadas pelas condições de processamento, concentração de oxigênio dissolvido durante e após o processo. Fatores como esses foram relatados anteriormente por BURTON et al. [4] e DONG & OACE [10]. De acordo com esses autores, quanto maior a quantidade de oxigênio incorporado ao alimento e maior a

temperatura durante o processamento industrial a que ele foi submetido, menor será a estabilidade desta vitamina. Provavelmente, os leites que apresentaram maior teor da vitamina, passaram por um processamento mais favorável à preservação do ácido fólico.

As Tabelas 2, 3 e 4 mostram os valores referentes à concentração de ácido fólico obtidos durante a estocagem de leite em pó, leite esterilizado e bebida láctea achocolatada, respectivamente, para cada lote de cada produto. Alguns lotes referentes à amostras de bebidas achocolatadas e leites esterilizados (BAA1, BAB1, BAC3, BAD1, LLB1, LLD1) foram perdidos durante a estocagem, devido ao estufamento das embalagens e, portanto, o estudo da estabilidade da vitamina não pôde ser realizado até o final do prazo de validade.

A Figura 3 ilustra o comportamento do ácido fólico nas amostras analisadas neste trabalho, durante o referido período de estocagem. Os pontos representam a média dos lotes.

**TABELA 2.** Concentrações de ácido fólico em leite em pó enriquecido, durante o período de estocagem.

Amostra / Lote	Ácido fólico(µg/100g)				
	M ± DP CV(%)				
	Período de estocagem				
	3 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
LPA1	142.3±0.5 0.3	94.3±0.2 0.2	87.3±0.3 0.3	84.3±0.5 0.6	79.9±0.5 0.6
LPA2	143.7±0.5 0.3	95.2±0.7 0.7	86.8±0.4 0.5	81.8±0.3 0.4	71.4±0.3 0.4
LPA3	145.4±0.4 0.3	94.3±0.3 0.3	87.9±0.5 0.6	84.1±0.5 0.6	70.9±0.4 0.6
Média entre lotes	144±1.0 0.7	94.6±0.5 0.5	87.3±0.7 0.8	83.4±1.4 1.7	74.1±5.0 6.7
LPB1	51.7±0.6 1.2	23.7±0.3 1.3	19.1±0.4 2.1	18.5±0.9 4.9	16.6±0.3 1.8
LPB2	53.4±0.5 0.9	20.9±0.6 2.9	20.7±0.6 2.9	19.0±0.9 4.7	15.2±0.2 1.3
LPB3	54.1±0.6 1.1	19.7±0.6 3.0	17.2±0.6 3.5	15.6±0.7 4.5	14.4±0.4 2.8
Média entre lotes	53±1.0 1.9	21.4±2.0 9.3	19.0±1.7 8.9	17.7±1.8 10.2	15.5±1.5 13.2
LPC1	132.4±0.7 0.5	66.1±0.5 0.8	59.5±0.2 0.3	59.1±0.5 0.8	54.2±0.2 0.4
LPC2	133.4±0.9 0.7	62.9±0.3 0.5	59.7±0.3 0.5	58.3±0.9 1.5	57.3±0.6 1.0
LPC3	146.0±1.0 0.7	64.4±0.9 1.4	59.0±0.4 0.7	58.2±0.3 0.5	—
Média entre lotes	137±6.0 4.4	64.5±1.6 2.5	59.4±0.4 0.7	58.5±0.5 0.8	55.7±2.2 3.9
LPD1	75.3±0.8 1.0	53.1±0.7 1.3	35.4±0.2 0.6	35.4±0.2 0.6	31.7±0.4 1.3
LPD2	75.8±0.5 0.7	50.7±0.4 0.8	37.8±0.2 0.5	34.9±0.2 0.6	31.3±0.9 2.9
LPD3	77.6±0.7 0.9	55.5±0.4 0.7	40.7±0.3 0.7	36.5±0.5 1.4	33.0±0.8 2.4
Média entre lotes	76.2±0.9 1.2	53.1±2.4 4.5	38.0±2.7 7.1	35.6±0.8 2.2	32.0±0.9 2.8

M ± DP- média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicata  
CV- coeficiente de variação

\* Amostra analisada 4 meses após fabricação.

Para os lotes de leite em pó analisou-se os produtos durante 12 meses, correspondente ao prazo de validade dos mesmos, exceto para a amostra LPB que apresentava prazo de validade de 2 anos. Para todas as amostras verificou-se uma diminuição do teor de ácido fólico, mais acentuada nos primeiros 6 meses. A porcentagem de perda média, após 12 meses, variou de 58 a 70,7% (Tabela 5). As curvas obtidas e apresentadas na Figura 3, sugerem que, provavelmente, a partir do quarto mês de estocagem, nenhum dos lotes de leite em pó continha o teor de vitamina declarado na embalagem. Este fato pode ser explicado, provavelmente, devido a maior exposição do ácido fólico, adicionado aos leites em pó, a processos de oxidação.

**TABELA 3.** Concentrações de ácido fólico em leite esterilizado, durante o período de estocagem.

Amostra / Lote	Ácido fólico (µg/100mL)			
	M ± DP CV (%)			
	Período de estocagem			
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
LLA1	7.7±0.6 7.8	7.4±0.3 4.0	7.0±0.4 5.7	—
LLA2	7.7±0.6 7.8	7.3±0.9 12.3	6.9±0.1 1.4	—
LLA3	7.9±0.8 9.0	7.2±0.5 6.9	6.1±0.2 3.3	—
Média entre lotes	7.8±0.1 1.3	7.3±0.1 1.4	6.5±0.6 9.2	—
LLB1	22.9±0.6 2.6	22.2±0.1 0.4	—	—
LLB2	22.5±0.9 4.0	22.4±0.5 2.2	—	22.1±0.9 4.1
LLB3	24.4±0.7 2.9	23.7±0.5 2.1	—	18.9±0.9 4.8
Média entre lotes	23.3±1.0 4.3	22.8±0.8 3.5	20.5±2.3 11.2	—
LLC1	5.9±0.2 3.4	5.8±0.2 3.4	5.4±0.3 5.6	—
LLC2	5.8±0.5 8.6	5.5±0.7 12.7	4.9±0.3 6.1	—
LLC3	5.2±0.6 11.5	4.8±0.9 18.7	4.2±0.5 11.9	—
Média entre lotes	5.6±0.4 7.1	5.4±0.5 9.3	4.8±0.6 12.5	—
LLD1	35.8±0.5 1.4	33.4±0.8 2.4	29.8±0.7 2.3	—
LLD2	30.5±0.5 1.6	28.6±0.2 0.7	23.1±0.6 2.6	20.3±0.9 4.4
LLD3	26.4±0.4 1.5	24.7±0.6 2.4	20.0±0.4 2.0	16.8±0.4 2.4
Média entre lotes	30.9±4.7 15.2	28.9±4.4 15.2	24.3±5.0 20.6	18.5±2.5 3.5

M ± DP- média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicata  
CV- coeficiente de variação

— lotes perdidos durante o período de estocagem.

**TABELA 4.** Concentrações de ácido fólico em bebida láctea achocolatada pronta para o consumo, durante o período de estocagem.

Amostra / Lote	Ácido fólico(µg/100mL)			
	M ± DP CV(%)			
	Período de estocagem			
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
BAA1	45.6±0.9 2.0	41.1±0.5 1.2	39.5±0.9 2.3	—
BAA2	45.6±0.2 0.4	44.9±0.9 2.0	39.4±0.8 2.0	32.8±0.5 1.5
BAA3	56.6±0.8 1.4	51.2±0.9 1.8	44.2±0.5 1.1	42.3±0.5 1.2
Média entre lotes	49.3±6.3 12.8	45.7±5.1 11.2	41.0±2.7 6.6	37.5±6.7 17.9
BAB1	48.5±0.6 1.2	43.8±0.7 1.6	40.1±0.9 2.2	—
BAB2	52.3±0.6 1.1	44.6±0.7 1.6	40.0±0.9 2.2	39.5±0.9 2.3
BAB3	44.9±0.5 1.1	35.2±0.5 1.4	30.1±0.6 2.0	29.7±0.5 1.7
Média entre lotes	48.6±3.7 7.6	41.2±5.2 12.6	36.7±5.7 15.5	34.6±6.9 19.9
BAC1	44.0±0.8 1.8	40.8±0.7 1.7	30.2±0.6 2.0	27.6±0.8 2.9
BAC2	48.6±0.2 0.4	40.2±0.9 2.2	29.8±0.4 1.3	27.8±0.6 2.2
BAC3	38.1±0.7 1.8	29.4±0.5 1.7	—	—
Média entre lotes	43.6±5.3 12.2	36.8±6.4 17.4	30.0±0.3 1.0	27.7±0.1 0.4
BAD1	36.2±0.6 1.7	29.8±0.8 2.7	28.8±0.4 1.4	—
BAD2	40.3±0.2 0.5	36.8±0.8 2.2	29.6±0.6 2.0	27.3±0.6 2.2
BAD3	37.8±0.6 1.6	37.3±0.8 2.1	30.0±0.7 2.3	28.6±0.8 2.8
Média entre lotes	38.1±2.1 5.5	34.6±4.2 12.1	29.5±0.6 2.0	27.9±0.9 3.2

M ± DP- média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicata  
CV- coeficiente de variação

— lotes perdidos durante o período de estocagem.

O comportamento do ácido fólico nos leites esterilizados e bebidas lácteas achocolatadas foi o mesmo

(Tabelas 3 e 4), devido à similaridade das características da matriz. Foram observadas perdas gradativas ao longo do período de validade (120 dias), variando de 20 a 29% para os leites e as bebidas achocolatadas, respectivamente (Tabela 5). No entanto, após 60 dias de estocagem, o teor de ácido fólico não correspondia ao teor declarado na embalagem em nenhum desses produtos. Os leites esterilizados foram analisados por um período de 90 dias, porém para LLD o prazo de validade era de 4 meses e, portanto, verificou-se os teores de ácido fólico por 120 dias nesse produto e verificou-se uma perda de 40%. A degradação do ácido fólico nessas matrizes pode ser explicada, provavelmente, pela atividade de água, que por ser maior nesses alimentos, proporcionaria a ocorrência de reações químicas que poderiam ocasionar a perda da vitamina.

**TABELA 5.** Porcentagem de perda de ácido fólico durante o período de estocagem, dos produtos analisados.

Amostra/ Lote	Perda média (%)
LPA	58,0
LPB	70,7
LPC	59,3
LPD	58,0
<b>Média entre os produtos</b>	<b>61,5 ± 6,2</b>
LLA	16,7
LLB	22,5
LLC	19,2
LLD	21,4
<b>Média entre os produtos</b>	<b>20,0 ± 2,6</b>
BLA	23,9
BLB	28,8
BLC	36,5
BLD	26,8
<b>Média entre os produtos</b>	<b>29,0 ± 5,4</b>

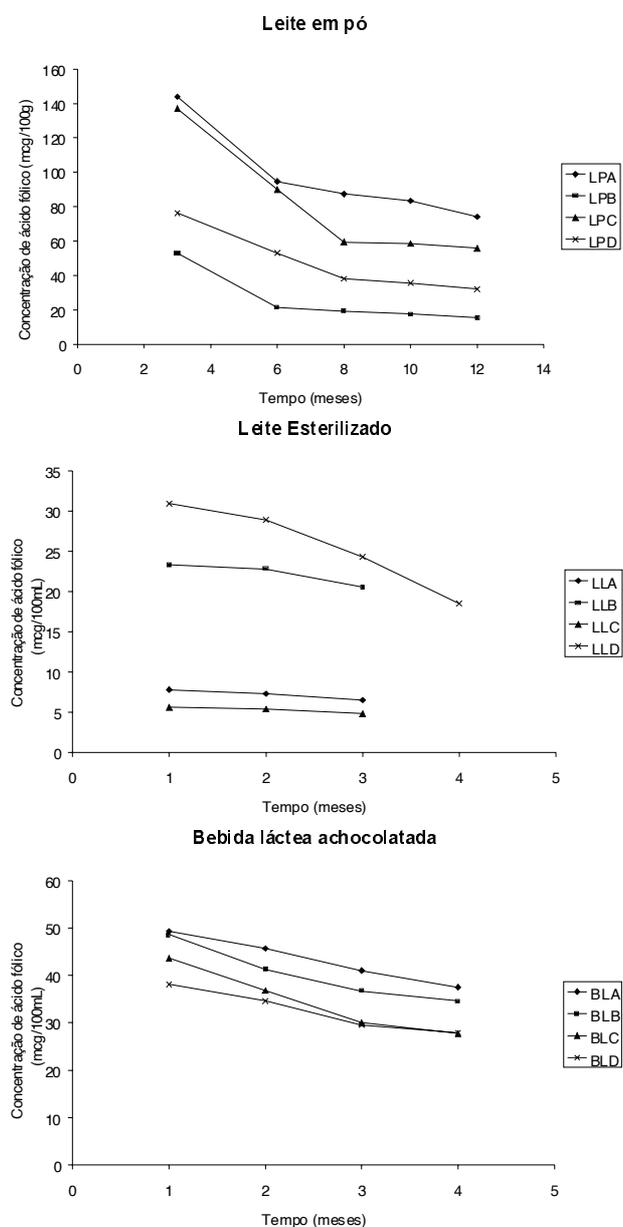
#### 4 - CONCLUSÕES

Observa-se pelos resultados obtidos, que o enriquecimento está sendo realizado, entretanto, em alguns produtos, mesmo pouco tempo após a fabricação, as concentrações de ácido fólico foram muito inferiores em relação às declaradas nos rótulos.

Durante o período de estocagem, verificou-se uma perda acentuada nos níveis de ácido fólico, dos leites em pó. Para os demais produtos, a perda da vitamina ocorreu, porém de forma menos drástica. Portanto, para que esses produtos estejam de acordo com as especificações do fabricante, até o final da vida-de-prateleira, se faz necessário um estudo para a verificação das melhores condições para estabilizar a vitamina durante esse prazo.

#### 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2ed. rev. and Expanded. New York: Marcel Decker, p.453-490, 1991.
- [2] BRUBACKER, G. MULLER-MULLOT, W., SOUTHGATE, D. A. T. Methods for the Determination of Vitamins in Food, Recommended by COST 91, Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1985.
- [3] BÜHLER, V. Vademecum for Vitamin Formulations, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1988.
- [4] BURTON, H., FORD, J.E., PERKIN, A.G., PORTER, J. W. G., SCOTT, K.J., THOMPSON, S.Y., TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J. D. Comparison of milks processed by the direct and indirect methods of ultra-high-temperature sterilization. **J. Dairy Res.** v. 37, p. 529-532, 1970.
- [5] CARVALHO, P.R.N. Estudos de vida-de-prateleira de Alimentos Enriquecidos. Segundo seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 5-18, 1996.
- [6] CATHARINO, R.R., GODOY, H. T. Optimization and validation of methodology for folic acid determination in enriched milk using high performance liquid chromatography. **J. Chrom. A** (enviado).
- [7] DANG, J., ARCOT, J. SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chem.**, v. 68, n. 3, p. 295-298, 2000.



**FIGURA 3.** Comportamento de ácido fólico durante a estocagem.

- [8] DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. 1ed. Ed. Edgard Blücher. 1186p, 1997.
- [9] DIERKES, J., KROESEN, M., PIETRIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International J. Vitam. Nutr. Res.** v. 68, p. 98-103, 1998.
- [10] DONG, F.M., OACE, S.M. Folate concentration and pattern in bovine milk. **J. Agric. Food Chem.** v. 23, n. 3, p. 534-542, 1975.
- [11] FAVIER, J. C., CHRISTIDES, J. P., POITER de COURCY, G., LÉGER, J. J. Folic acid content of foods. III. Folic acid content of different categories of milk. **Sci. des Alim.**, v. 7, n. 1, p. 23-40, 1987.
- [12] FORD, J.E.; PORTER, J.W.G.; THOMPSON, S.Y.; TOOTHILL, J.; EDWARDS-WEBB, J. Effects of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content in milk. **J. Dairy Res.**, v. 36, p. 447-452, 1969.
- [13] GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Advanc. Food Nutrit. Res.** v. 33, p. 1-101, 1969.
- [14] KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans. 755p., 1994.
- [15] MOSHFEGH, A.J., COOK, A.J., HO, J.M., FRIDAY, J.E. Folate intakes. Food surveys Research Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- [16] RANG, H.P., RITTER, J.M., DALE, M. M. Farmacologia. 3ed. Guanabara Koogan Rio de Janeiro. 692p., 1997.
- [17] RENNER, E. Micronutrients in milk and milk-based food products. Elsevier Science Publishing Co., New York. 311p., 1989.

## 6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro de Aperfeiçoamento de Pesquisadores (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado para Juliana A. Lima e Rodrigo R. Catharino.