

Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de ácido fólico adicionado em farinhas de trigo e milho

Determination of folic acid in enriched wheat and corn flour by means of high performance liquid chromatography

RIALA6/990

Juliana. A. LIMA², Rodrigo R. CATHARINO¹, Helena T. GODOY^{1*}

* Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
e-mail: helena@fea.unicamp.br

² Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologias, Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Rod. D. Pedro I, Km 136, Parque das Universidades, Campinas, CEP 13086-900, SP, Brasil.

Recebido: 18/08/2003 – Aceito para publicação: 06/10/2004

RESUMO

O enriquecimento de alimentos com ácido fólico tem se tornado uma prática comum em todo o mundo. Recentemente, no Brasil, a ANVISA publicou uma resolução (Resolução N°344) que obriga o enriquecimento de farinha de trigo e milho com essa vitamina. Dessa forma, metodologias analíticas capazes de avaliar ácido fólico nesses alimentos, tornam-se necessárias. O objetivo do trabalho foi a validação de uma metodologia para análise de ácido fólico em farinhas de trigo e milho enriquecidas, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O ácido fólico foi extraído das farinhas com solução de hidróxido de potássio e acetonitrila. Seguiu-se a etapa de purificação com ácido tricloroacético. Para a etapa cromatográfica utilizou-se como fase móvel um sistema gradiente composto por solução acidificada/acetonitrila e coluna de C₁₈ para separação e eluição da vitamina. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente com taxas de recuperação entre 92 e 98%, boa repetibilidade (CV 0,60 a 0,98%) e limites de detecção e quantificação de 1,3ng/g e 2,6ng/g, respectivamente.

Palavras-Chave. ácido fólico, cromatografia líquida de alta eficiência, farinha de trigo, farinha de milho.

ABSTRACT

Enrichment of foods with folic acid has turned out to be a common practice around the world. Recently, in Brazil, the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) has brought into public notice a resolution on mandatory enrichment of wheat and corn flour with folic acid. In the face of this, reliable analytical methodologies for to determinate folic acid in flours have to be established and standardized. The aim of the present study was to validate a methodology for folic acid analyses in enriched wheat and corn flour carried out by High Performance Liquid Chromatography. Folic acid was extracted from the flours using potassium hydroxide solution and acetonitrile. The extract was purified with trichloroacetic acid. For chromatographic separation a gradient system composed by acid solution/acetonitrile was used as mobile phase, and a C₁₈ column was employed for vitamin separation and elution. Folic acid detection was made at 290nm and its quantification was performed by external standardization. The evaluated method was efficient being the recovery rates between 92 and 98%; the method presented good repeatability (CV 0.60 to 0.98%), and detection and quantification limits were 1.3ng/g and 1.6ng/g, respectively.

Key Words. folic acid, high performance liquid chromatography, wheat flour, corn flour

INTRODUÇÃO

Os cientistas, hoje, estão convencidos que o ácido fólico é indispensável à dieta humana e animal, sendo considerado como a “vitamina do futuro”. O ácido fólico está amplamente distribuído nos alimentos, principalmente em verduras frescas, fígado, leveduras e algumas frutas^{15,16}, no entanto, nos dias atuais, a ingestão de uma dieta insuficiente em folatos tem levado à deficiência dessa vitamina²⁸.

Um dos possíveis efeitos diretamente ligados a dietas carentes de ácido fólico, e que tem surtido repercussão mundial, são as malformações congênitas com destaque para os defeitos no tubo neural de fetos, como a espinha bífida e a mielomeningocele, por exemplo^{10,11,19}. A preocupação com a carência de ácido fólico na alimentação de gestantes é tão grande nos EUA, que em 1998 foi criada uma campanha nacional de incentivo à ingestão de ácido fólico, cujo principal objetivo é a redução das malformações congênitas²⁶. Com esse mesmo propósito, um grande estudo epidemiológico está sendo realizado no Chile, onde a vitamina está sendo adicionada à farinha de trigo destinada à fabricação de pães (220µg/100g) e o consumo desse alimento enriquecido está sendo relacionado com a incidência de malformações congênitas daquele país^{5,8,18}.

Além disso, muitos estudos sugerem que o ácido fólico atua na prevenção de diversos tipos de câncer, anemia e doenças cardíacas^{2,9,10,12, 20,24,28,29,32}.

A indústria brasileira vem promovendo um grande aumento do emprego de vitaminas para o enriquecimento de vários alimentos⁴, entre elas, o ácido fólico. Sem dúvida, o processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções empregadas para resolver o problema da ingestão insuficiente de ácido fólico^{7,14,25,28,31}. São escolhidos preferencialmente os alimentos destinados ao público infantil e gestantes para o enriquecimento com esta vitamina. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)¹ divulgou uma resolução (Resolução 344 de 13 de dezembro de 2002) que determina que as indústrias de farinhas de trigo e de milho devem adicionar aos seus produtos 150µg de ácido fólico a cada 100g de farinha.

Em vários países está sendo realizado o enriquecimento de farinhas, entretanto os níveis de enriquecimento são um pouco diferentes. Estados Unidos, Canadá, Bolívia e Colômbia, por exemplo, utilizam 150µg de ácido fólico a cada 100g de farinha, já o Paraguai e o Equador adicionam 300µg e 60µg de ácido fólico a cada 100g de farinha, respectivamente¹³.

Embora cada vez mais aumente o número de alimentos que estão sendo enriquecidos com ácido fólico, o controle desses produtos é bastante dificultado pela ausência de metodologias rápidas, eficientes e adequadas. O método oficial¹⁰ para a determinação de ácido fólico e folatos em alimentos é um método microbiológico, utilizando *Lactobacillus casei*, que apresenta muitos inconvenientes, como baixa precisão, lentidão na análise e exatidão questionável^{16,17}. Recentemente, a literatura vem apresentando avanços nos métodos para a determinação

dessa vitamina, através de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão^{16,17,27,30}. A aplicação de CLAE na determinação de ácido fólico em alimentos ocorre de forma rápida, geralmente dependendo da otimização da extração da amostra, da purificação e dos métodos de detecção para cada tipo de análise requerida. Entretanto, a grande maioria dos métodos por CLAE encontrados na literatura internacional, incluem a etapa de extração complexa e demorada^{16,17}.

Métodos de extração em fase sólida utilizando colunas de troca iônica compostas por amina quaternária (SAX) foram largamente utilizados nos últimos anos, tanto para purificação como concentração de folatos e ácido fólico, além de etapas prévias de hidrólise enzimática^{22,27}.

Para a etapa cromatográfica fases móveis tamponadas, principalmente tampão fosfato, com ou sem modificador orgânico, foram utilizadas por Konnings²² e Osseyi et al²⁷. As colunas mais utilizadas para a separação de ácido fólico foram as de fase reversa de octadecilsilano (C₁₈)^{22,30}. O perfil do espectro de absorção obtido no detector de arranjo de diodos (DAD), além do tempo de retenção e da co-cromatografia, foram utilizados por Konnings²², para identificação dos folatos. Osseyi et al.²⁷ e Konnings²² fizeram a quantificação através da construção de curvas analíticas por padronização externa, utilizando a área ou a altura dos picos.

No caso especial de farinhas poucos trabalhos foram encontrados na literatura. Estudos realizados por Keagy et al.²¹ com o objetivo de avaliar o comportamento de folatos e ácido fólico durante o período de armazenamento da farinha de trigo, conduzido com a aplicação de método microbiológico, utilizando temperaturas entre 26 e 50°C e ausência de luz, indicaram perdas de 40% no teor de folatos após 12 semanas de estocagem, valor que permaneceu inalterado após 52 semanas. Os mesmos autores verificaram que farinhas fortificadas com ácido fólico (100 a 500µg/100g), tiveram altas taxas de retenção da vitamina, com baixas perdas, nas mesmas condições. Essas diferenças podem ser atribuídas, segundo ao autores, a maior instabilidade de folatos naturalmente presentes em alimentos, quando comparados ao ácido fólico adicionado. Lima et al.²³ avaliaram o efeito do processo de assamento de pães confeccionados com farinha de trigo enriquecida e determinaram 10% de perdas, utilizando método por CLAE. Para farinha de milho nenhum dado foi encontrado na literatura.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi a validação da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvida por Catharino et al.⁶, para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo e milho enriquecidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para a determinação da recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação, as farinhas de trigo e milho

comuns foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Campinas, já que o produto enriquecido ainda não estava disponível no mercado na época da realização deste estudo. Para o enriquecimento, em laboratório, foi escolhida uma marca apenas, para cada tipo de farinha. As farinhas foram analisadas para comprovar a ausência de ácido fólico e interferentes, antes do processo de enriquecimento.

As determinações foram realizadas em duplicatas, sendo o resultado final a média de 4 valores, já que as injeções de cada extrato no cromatógrafo também foram feitas em duplicatas.

Reagentes

O padrão de ácido fólico foi gentilmente cedido pela MCassab Comércio e Indústria Ltda -SP (Sigma cód. F-7876, lote 40H321). Os demais reagentes foram de grau analítico. A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis, antes de serem utilizadas, foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e HVLP 04700), com poros de 0,45µm de diâmetro.

Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo Hewlett Packard (HP) série 1100, com injetor automático com capacidade de 1 a 100µL, desgaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu análise da pureza do pico de interesse e o melhor tratamento dos dados. As colunas Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) e Nova Pak, ODS-2, 4µm, 150X2mm (Waters) foram utilizadas para o processo de separação cromatográfica, nas determinações de ácido fólico em farinha de trigo e farinha de milho, respectivamente, protegidas por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5µm, 10X4,6mm d.i (Varian).

Determinação do ácido fólico

Para a análise do ácido fólico nas farinhas de trigo e milho enriquecidas utilizou-se a metodologia desenvolvida por Catharino et al.⁶, adaptada para as matrizes analisadas nesse trabalho. O ácido fólico foi extraído, de 1,0g de farinha previamente homogeneizada, com 3,0mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e 1,0mL de acetonitrila, por 10 minutos em banho de ultra-som. No método original, a etapa de extração, para essa mesma determinação em leites, é feita apenas com hidróxido de potássio, os demais processos envolvidos na análise são exatamente os mesmos, conforme descrito a seguir. O extrato foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10mL, adicionando-se 2,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 3,0mL de tampão fosfato, composto por Na₂HPO₄ (0,25mol/L)/KH₂PO₄ (0,37mol/L), a pH neutro, e 500µL de ácido tricloroacético (TCA) (90%), aferindo-se o volume final com tampão fosfato. Seguiram-se então as etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a outra em membrana Durapore (HAWP01300 Millipore), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado, imediatamente, no cromatógrafo a líquido (100µL).

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com 90% de solução acidificada (SA: 0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L de hidróxido de potássio, a pH 2,8), e 10% de acetonitrila (ACN)(v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de SA e 24% de ACN a uma vazão de 0,5ml/min. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 10 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 padrão de ácido fólico analisado 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, através da curva analítica construída com 7 níveis de concentração do padrão dissolvido diretamente em tampão fosfato (0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,50; 1µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

Validação da metodologia

Para a validação da metodologia foram realizados testes de recuperação e repetibilidade, além do estabelecimento dos limites de detecção e quantificação para as matrizes analisadas nesse trabalho, já que a metodologia foi aplicada à matrizes diferentes e, portanto, sofreu algumas modificações em relação ao método original desenvolvido para leites.

Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se testes de recuperação de padrões adicionados às farinhas de trigo e milho, não enriquecidas, em dois níveis diferentes de concentração 170 e 250µg/100g. Os teores foram baseados no projeto que está sendo desenvolvido no Chile, 220µg de ácido fólico para cada 100g de farinha de trigo^{5, 8, 18} Para as análises foi utilizado 1,0g das farinhas de trigo e milho.

Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de cinco determinações, em dois níveis de concentração de ácido fólico adicionado às matrizes. A repetibilidade foi calculada de acordo com Caulcutt e Boddy³ através da equação:

$$r = t\sqrt{2.sr} \quad r = \text{repetibilidade}$$

sr = estimativa do desvio padrão
t = t de Student

Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção foram estimados pela adição de quantidades conhecidas de padrão às amostras. Foi considerado o limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal com uma amplitude três vezes maior que

a do ruído (3S/R). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas referentes a determinação de ácido fólico em amostras de farinha de trigo e milho estão apresentados na Figura 1. Neles, o pico do ácido fólico aparece isolado, com tempo de retenção de 7,9 minutos para a determinação em farinha de trigo e 8,3 minutos em farinha de milho, já que foram utilizadas colunas diferentes. A pureza dos picos foi verificada através dos parâmetros de pureza, fornecidos pelo software HP-Chemstation, que confirmou a eficiência do sistema cromatográfico.

O teor de ácido fólico foi avaliado por padronização externa, tendo a curva analítica apresentado boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas, com coeficiente de correlação de 0,9997 (Figura 2).

As taxas de recuperação obtidas estão apresentadas na Tabela 1. Os valores variaram entre 95 e 97% nos dois níveis de enriquecimento. As taxas de recuperação obtidas neste trabalho são superiores ao valor relatado por Konings²² que obteve níveis de recuperação de folatos de 90% para farinha e Osseyi et al²⁷ que relataram taxas de recuperação de 93 a 96% para a determinação de ácido fólico em cereais matinais. Esses valores indicam uma boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos presentes no produto enriquecido analisado.

A Tabela 2 apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre cinco determinações, em duplicata, em dois diferentes níveis de concentração de ácido fólico, para os dois tipos de farinhas. Desta forma, espera-se que valores fornecidos por determinações em duplicata difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada. Observou-se que a maior diferença entre os valores obtidos nas 5 determinações, nos dois níveis de enriquecimento, é menor que o valor de “r” calculado, comprovando a boa repetibilidade do método, quando aplicado às matrizes estudadas neste trabalho.

O limite de detecção para ácido fólico em farinhas de trigo e milho foi 1,3ng/g, e, portanto, o limite de quantificação foi 2,6ng/g. Os valores foram os mesmos obtidos por Catharino et al.⁶ que determinaram esses parâmetros em leite enriquecido e Konings²² que avaliou folatos em vegetais, leite enriquecido, fígado e farinha.

CONCLUSÕES

Pôde-se concluir que a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência aplicada neste trabalho, se mostrou bastante satisfatória e pode ser utilizada para análises de rotina de determinação de ácido fólico em farinhas de trigo e milho enriquecidas.

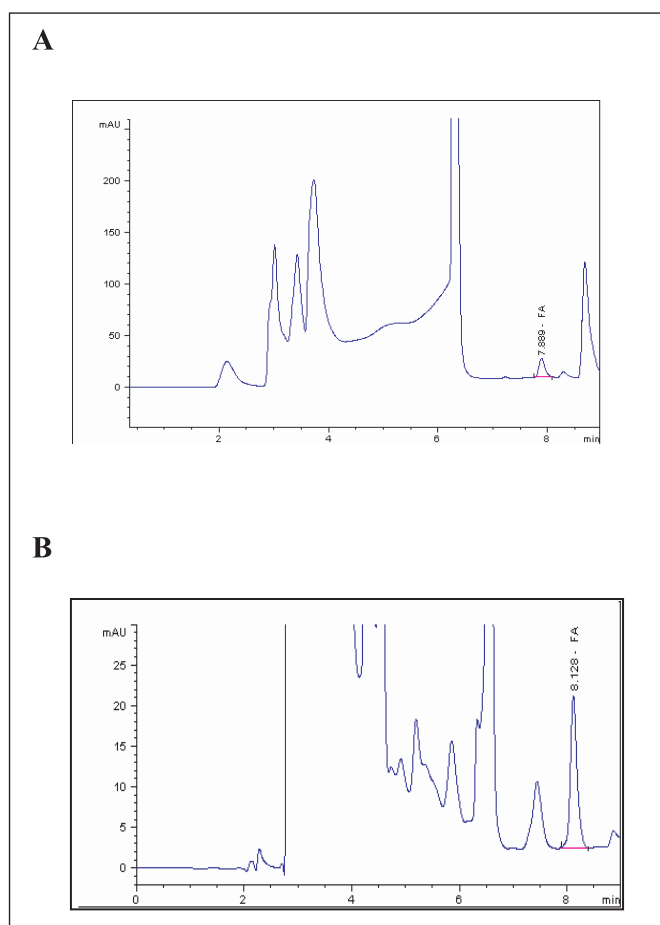


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato de farinha de trigo (A) e milho (B) enriquecidas com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm (A) e Nova pak, ODS-2, 4µm, 150X2mm (B). Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de solução acidificada (0,166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de solução acidificada (0,166mol/L) (v/v), mantendo-se as condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.

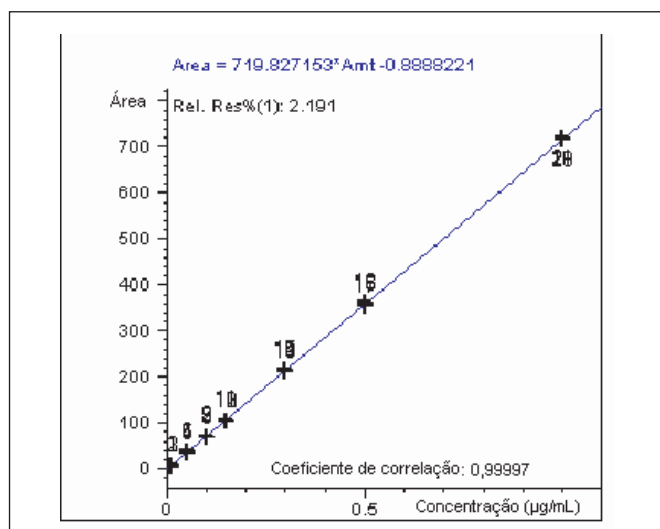


Figura 2. Curva analítica do ácido fólico obtida por padronização externa, traçada com média de triplicatas.

Tabela 1. Taxas de recuperação do padrão de ácido fólico adicionado em dois diferentes níveis de concentração às farinhas de trigo e milho

Produto	Nível I (µg/g)	Recuperação (%)	Nível II (µg/g)	Recuperação (%)
Farinha de milho	1,7	96 ± 1	2,5	97 ± 1
Farinha de trigo	1,7	95 ± 1	2,5	97 ± 1

Os resultados são médias de 10 determinações.

Tabela 2. Repetibilidade do ácido fólico adicionado às farinhas de trigo e milho em 2 diferentes níveis de concentração

Alimento	Concentração Nível I (µg/g)	Repetibilidade (r)	Concentração Nível II (µg/g)	Repetibilidade (r)
Farinha de trigo	2,027	0,60	1,691	0,47
	2,046		1,691	
	2,081		1,658	
	2,049		1,672	
	2,021		1,682	
*Média dos valores	2,05 ± 0,02		1,68 ± 0,01	0,60%
Farinha de milho	8,045	2,64	6,543	0,88
	8,037		6,535	
	8,087		6,565	
	8,046		6,589	
	8,068		6,567	
* Média dos valores	7,86 ± 0,45		6,58 ± 0,05	0,76%

Limite de confiança de 95% (t=2,78)

* Média dos valores: valor médio, estimativa do desvio padrão, coeficiente de variação (%).

Sugere-se que sejam realizados estudos que avaliem o comportamento da vitamina durante o período de estocagem de farinhas enriquecidas, já que esses produtos apresentam um grande prazo de validade, além de trabalhos que avaliem a estabilidade da vitamina adicionada a esses produtos após a fabricação de pães, mingaus, bolos, entre outros, já que essas farinhas são consumidas após processamento doméstico e/ou industrial.

REFERÊNCIAS

1. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. www.anvisa.org.br. Consulta em 20/04/2004.
2. Brody, T. Folic acid In: Machlin, L. J. **Handbook of vitamins**. 2ed. Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker Inc.; 1994. 595 p.
3. Caulcutt, R.; Brody, R. **Statistic for Analytical Chemists**. 1st. Chapman and Hall, Londres; 1983. 253p.
4. Carvalho, P. R. N. **Enriquecimento de Alimentos**. Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1994. p. 1-7.
5. Castilla, E. E. et al. ECLAMC Informs. **Frontiers in Fetal Health** 2(7):4-23, 2000. [www.sickkids.on.ca/ FrontiersinFetalHealth/ FFHJanuary2001.asp#Pastuszak](http://www.sickkids.on.ca/FrontiersinFetalHealth/FFHJanuary2001.asp#Pastuszak). Consulta em 10/03/2004.
6. Catharino, R. R.; Godoy, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 23(3):389-95, 2003.
7. Cort, W. M. et al. Nutrient stability of fortified cereal products. **Food Techn.** 30: 52-62, 1976.
8. Cortes, F. et al. Impact of wheat flour fortification with folic acid on preservation of neural tube defects (NTD) in Chile. 2001.<http://mail.medacad.or/www.ichg2001.org/abstracts/services.htm>. Consulta em 10/03/2004.
9. Crane, N. T. et al. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **Am. J. Pub. Health** 85(5): 660-6, 1995.
10. Cunniff, P. (Ed) **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17 ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland; 1997. p. 45.1 – 45.69.
11. Daly, S. et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**, 350(9092): 1666-9, 1997.
12. Devlin, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. Ed. Edgard Blücher; 1997. 1007p.
13. Flour Fortification. www.emro.who.int/nfs/FlourFortification.htm. Consulta em 10/02/2004.
14. Gassin, A. L. Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. **Cah. Nutrition diétics**, 26(1): 85-8, 1991.
15. Green, J.M. A practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal. Chem.** 68: 1197-1203, 1996.
16. Gregory III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Adv. Food Nutr. Res.**, 33: 1-101, 1989.
17. Hawkes, J. G.; Villota, R. Foliates in Foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. **Food Sci. Nutr.**, 28(6): 439-538, 1989.

18. Hirsch, S. et al. The Chilean Flour Folic Acid Fortification Program Reduces Serum Homocysteine Levels and Masks Vitamin B₁₂ Deficiency in Elderly People. **J. Nutr.**, 132: 289-91, 2002.
19. Iwatani, Y.; Arcot, J.; Shrestha, A. K., Determination of folate contents in some Australian vegetables. **J. Food Comp. Anal.**, 16: 37-48, 2003.
20. Katzung, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans; 1994. 755p.
21. Keagy, P. M.; Stokstad, L. R.; Fellers, D. A. Folacin stability during bread processing and family flour storage. **Cereal Chem.**, 52: 348-56, 1975.
22. Konings, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **J. AOAC Int.**, 82(1): 119-27, 1999.
23. Lima, J.A.; Catharino, R.R.; Godoy, H.T. HPLC methodology for folic acid determination in enriched wheat flour and bread. **Tec. Molitoria Intern.**, 55: 151-8, 2004.
24. Malinow, M. R. et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New Engl. J. Med.**, 338(15): 1009-15, 1998.
25. Maxwell, D. P. E. Cost-control implications of nutrients fortification. **Prep. Food** 87-8, 1990.
26. Moshfegh, A. J. et al. **Folate intakes**. Food Surv. Res. Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA. 1998.
27. Osseyi, E.S.; Wehling, R.L.; Albrecht, J.A. Liquid Chromatographic Method for Determining Added Folic Acid in Fortified Cereal Products. **J. Chromatogr. A**, 826(2): 235-40, 1998.
28. Ranum, P. Cereal enrichment. In: **Handbook of Cereals Science and Technology**. Ed. Lowrenz, New York, 1991, p.882.
29. Tsai, M. Y. et al. Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. **Atherosc.** 143: 163-165, 1999.
30. Vahteristo, L.T.; Ollilainen, V.; Varo, P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. **J. AOAC Int.**, 80 (2), 373-8, 1997.
31. Walter, P. Vitamin requirements and enrichment of foods. **Food Chem.** 49: 113-117, 1994.
32. Willcox, J.K.; Catignani, G.L.; Lazarus, S. Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.*, 43(1): 1-18, 2003.