

Sâmya Silva Pacheco<sup>I</sup>

Cynthia Braga<sup>II,III</sup>

Ariani Impieri de Souza<sup>III</sup>

José Natal Figueiroa<sup>III</sup>

# Efeito da fortificação alimentar com ácido fólico na prevalência de defeitos do tubo neural

## Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects

---

### RESUMO

**OBJETIVO:** Analisar o efeito de alimentos fortificados com ácido fólico na prevalência de defeitos de fechamento do tubo neural entre nascidos vivos.

**MÉTODOS:** Estudo longitudinal de nascidos vivos do município de Recife (PE) entre 2000 e 2006. Os dados pesquisados foram obtidos do Sistema Nacional de Informações de Nascidos Vivos. Os defeitos de fechamento do tubo neural foram definidos de acordo com o Código Internacional de Doenças-10<sup>a</sup> Revisão: anencefalia, encefalocele e espinha bífida. Compararam-se as prevalências nos períodos anterior (2000-2004) e posterior (2005-2006) ao período mandatório à fortificação. Analisou-se a tendência temporal das prevalências trimestrais de defeitos do fechamento do tubo neural pelos testes de Mann-Kendall e Sen's Slope.

**RESULTADOS:** Não se identificou tendência de redução na ocorrência do desfecho (Teste de Mann-Kendall;  $p=0,270$ ; Sen's Slope= $-0,008$ ) no período estudado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as prevalências de defeitos do fechamento do tubo neural nos períodos anterior e posterior à fortificação dos alimentos com ácido fólico de acordo com as características maternas.

**CONCLUSÕES:** Embora não tenha sido observada redução dos defeitos do fechamento do tubo neural após o período mandatório de fortificação de alimentos com ácido fólico, os resultados encontrados não permitem descartar o seu benefício na prevenção desta malformação. São necessários estudos avaliando maior período e considerando o nível de consumo dos produtos fortificados pelas mulheres em idade fértil.

**DESCRIPTORIOS:** Alimentos para Gestantes e Nutrizes. Alimentos Fortificados. Ácido Fólico. Defeitos do Tubo Neural, prevenção & controle. Nutrição Pré-Natal. Avaliação de Resultado de Ações Preventivas.

<sup>I</sup> Curso de Graduação em Medicina. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade de Pernambuco. Recife, PE, Brasil

<sup>II</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz. Recife, PE, Brasil

<sup>III</sup> Programa de Pós Graduação em Saúde Materno Infantil. Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira. Recife, PE, Brasil

**Correspondência | Correspondence:**

Sâmya Silva Pacheco  
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP  
Departamento de Pesquisa  
Grupo Saúde da Mulher  
R. dos Coelhos, 300 – Boa Vista  
50070-550 Recife, PE, Brasil  
E-mail: samya\_spacheco@yahoo.com.br

Recebido: 31/01/2008

Revisado: 03/11/2008

Aprovado: 14/11/2008

---

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To analyze the effect of folic acid-fortified foods on the prevalence of neural tube defects in live newborns.

**METHODS:** Longitudinal study with newborns from the city of Recife, Northeastern Brazil, between 2000 and 2006. Data analyzed were obtained from the *Sistema Nacional de Informações de Nascidos Vivos* (National Information System on Live Births). Neural tube defects were defined in accordance with the International Classification of Diseases, 10th revision (ICD-10): anencephaly, encefalocele, and spina bifida. Prevalences from the periods before (2000-2004) and after (2005-2006) the mandatory fortification period were compared. Time trend of three-month prevalences of neural tube defects were analyzed using Mann-Kendall test and Sen's Slope estimator.

**RESULTS:** Tendency towards reduction in the occurrence of outcome (Mann-Kendall test;  $p=0.270$ ; Sen's Slope estimator=-0.008) was not identified in the period studied. The difference between prevalences of neural tube defects in the periods before and after food fortification with folic acid was not statistically significant, according to maternal characteristics.

**CONCLUSIONS:** Even though reduction in neural tube defects after the period of mandatory food fortification with folic acid was not observed, results found do not enable its benefit to prevent malformations to be ruled out. Studies assessing longer periods and considering the level of consumption of fortified products by women of fertile age are necessary.

**DESCRIPTORS:** Foods for Pregnants and Breastfeeding Mothers. Food, Fortified. Folic Acid. Neural Tube Defects, prevention & control. Prenatal Nutrition. Evaluation of Results of Preventive Actions.

---

## INTRODUÇÃO

Os defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) são malformações congênitas resultantes do fechamento incorreto ou incompleto do tubo neural entre a terceira e quarta semana do desenvolvimento embrionário e englobam a anencefalia, encefalocele e espinha bífida.<sup>3,19</sup>

Embora a prevalência destes defeitos congênitos varie conforme épocas e regiões, de maneira geral, se situa em torno de 1/1.000 nascidos vivos,<sup>1</sup> predominando os casos de anencefalia e espinha bífida.<sup>1,9,11</sup> No Brasil, estima-se que a taxa oscile em torno de 1,6/1.000 nascidos vivos,<sup>15</sup> porém ainda são escassas as publicações sobre o problema.<sup>19</sup>

A etiologia dos defeitos de fechamento do tubo neural ainda não está bem esclarecida, sendo considerada uma herança multifatorial decorrente da interação entre fatores genéticos e ambientais.<sup>1,3</sup> Os genes mais estudados no envolvimento desta malformação são os associados ao metabolismo do ácido fólico,<sup>3</sup> particularmente uma mutação no gene da enzima 5,10 metileno-tetra-hidrofolato-redutase.<sup>1,3</sup> Entre os fatores de risco maternos

para esta anomalia, citam-se: diabetes mellitus,<sup>7</sup> uso de ácido valpróico durante a gestação,<sup>5</sup> obesidade materna,<sup>18</sup> hipertermia<sup>14</sup> e deficiência de ácido fólico.<sup>4</sup>

Estudos relatam a importância do ácido fólico na prevenção dos DFTN, apesar do seu mecanismo de atuação ainda ser pouco compreendido.<sup>3</sup> Indicações de redução, em torno de 50% a 70%,<sup>4,8</sup> na ocorrência de tais defeitos congênitos após a suplementação periconcepcional deste nutriente têm feito várias organizações de saúde recomendarem a sua utilização.<sup>4,8</sup> O *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC), em 1992, recomendou a administração diária (três meses antes da concepção até o primeiro trimestre da gestação) de 0,4 mg de ácido fólico a mulheres em idade fértil, para a prevenção da primeira ocorrência de DFTN e de 4 mg, para redução do risco de recorrência.<sup>8</sup> Em 2000, o *Institute of Medicine of the National Academies*, nos Estados Unidos, estabeleceu a dose de 0,4 mg/dia para mulheres adultas não gestantes e 0,6 mg/dia para gestantes.<sup>8</sup> No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em sua publicação mais recente<sup>a</sup>

---

<sup>a</sup> Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Diário Oficial Uniao*. 23 set 2005.

elevou as recomendações nutricionais de ingestão diária de ácido fólico conforme o proposto pelo *Institute of Medicine of the National Academies*.<sup>8</sup>

Visando a garantir a ampla cobertura da estratégia de suplementação de ácido fólico à população de gestantes, 40 países<sup>19</sup> instituíram a medida da fortificação de alimentos consumidos em larga escala com ácido fólico para a prevenção da ocorrência de DFTN. Pesquisa realizada em 45 estados dos Estados Unidos e Washington DC<sup>11</sup> constatou redução de 19% na ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural após a implantação da medida. Na Ilha de Newfoundland, Canadá, observou-se redução de 78% na prevalência de DFTN após o período mandatório de fortificação com ácido fólico.<sup>12</sup> No Brasil, a Anvisa, considerando a recomendação da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e de milho com 150 mcg/100g de ácido fólico a partir de junho de 2004.<sup>19,a</sup> Porém, ainda não há estudos avaliando a efetividade desta medida sobre a prevalência de DFTN no País.

O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito de alimentos fortificados com ácido fólico na prevalência de defeitos de fechamento do tubo neural entre nascidos vivos.

## MÉTODOS

Foram estudados 161.341 nascidos vivos no período de 2000 a 2006, cujas mães residiam no município do Recife (PE). Os dados analisados foram obtidos no Sistema Nacional de Informações de Nascidos Vivos (SINASC), disponibilizado pela Secretária de Saúde Municipal do Recife.

Os defeitos de fechamento do tubo neural foram definidos de acordo com a classificação do Código Internacional de Doenças (CID-10), correspondentes a anencefalia (Q00.0), encefalocele (Q01) e espinha bífida (Q05). A prevalência do DFTN foi analisada segundo as características sociodemográficas maternas, número de consultas de pré-natal, tipo de parto e idade gestacional.

As prevalências de DFTN nos períodos anterior (2000-2004) e posterior (2005-2006) à obrigatoriedade da fortificação alimentar, implementada pela Anvisa, foram comparadas utilizando o teste de qui-quadrado de Pearson e exato de Fisher. Adotou-se um nível de significância de 5%. Os *softwares* utilizados foram Excel 2000, SPSS v8.0, Epi Info v3.3.2.

Realizou-se a análise da tendência temporal das taxas trimestrais de DFTN aplicando-se o teste seqüencial de Mann-Kendall, por ser um teste não paramétrico que permite a detecção de tendências em séries temporais.<sup>21</sup>

O método não paramétrico Sen's Slope foi utilizado para estimar o valor e o intervalo de confiança para a inclinação da série.<sup>20</sup>

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira.

## RESULTADOS

De 2000 a 2006, foram registrados 108 casos de DFTN, sendo a espinha bífida a anomalia mais freqüente (45,4%), seguida pela anencefalia (36,1%) e encefalocele (18,5%).

A Tabela apresenta as prevalências de DFTN segundo características sociodemográficas maternas, número de consultas de pré-natal, tipo de parto e idade gestacional, nos períodos anterior e posterior à fortificação. De 2000 a 2004, período anterior à fortificação de alimentos com ácido fólico, a prevalência de DFTN foi de 0,72 por 1.000 nascidos vivos (NV), enquanto que no período após a fortificação, de 2005 a 2006, a prevalência de DFTN foi de 0,51 por 1.000 NV, não sendo observada redução estatisticamente significativa do evento ( $\chi^2=1,96$ ;  $p=0,1596$ ).

A análise estratificada da prevalência de DFTN não constatou redução significativa da prevalência dos DFTN por idade e escolaridade materna, tipo de parto e idade gestacional no período após a fortificação (Tabela). Observou-se redução estatisticamente significativa na ocorrência do evento entre mulheres que realizaram mais de três consultas de pré-natal.

Ao serem analisados os coeficientes de prevalência de DFTN, por trimestre, não se observou tendência crescente ou decrescente na ocorrência da malformação (Teste de Mann-Kendall;  $p=0,270$ ; Sen's Slope=-0,008) (Figura).

## DISCUSSÃO

As prevalências de DFTN encontradas no município do Recife, de 0,72 e 0,51:1.000 NV, nos períodos pré e pós-fortificação, respectivamente, foram menores do que as taxas encontradas em levantamentos anteriores realizados no Brasil, que variaram entre 0,83:1.000 e 1,87:1.000 NV,<sup>10,15</sup> e em países da América Latina, onde observaram-se prevalências de 1,5:1.000 NV.<sup>10</sup> A prevalência de DFTN varia segundo épocas e regiões, sendo muito baixa na Finlândia (0,4/1000 nascimentos), alta no México (3,3/1000) e muito alta no Sul do País de Gales (até 12,5/1000).<sup>6,10</sup> Há ainda a possibilidade de essas freqüências estarem subestimadas quando se considera que muitas gestações são natural ou deliberadamente interrompidas.<sup>10</sup>

<sup>a</sup> Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. *Diário Oficial Uniao*. 18 dez 2002.

**Tabela.** Prevalência de defeitos de fechamento do tubo neural em nascidos vivos segundo características da gestante, do pré-natal e parto, nos períodos anterior e posterior à fortificação de alimentos com ácido fólico. Recife, PE, 2000-2006.

Variável	Pré-fortificação (2000-2004)			Pós-fortificação (2005-2006)			p
	Nascidos vivos	n	DFTN n/1.000	Nascidos vivos	n	DFTN n/1.000	
Idade (anos)							
10 a 19	27.653	20	0,72	7.750	7	0,90	0,6119 <sup>a</sup>
20 a 24	44.312	34	0,76	13.369	8	0,56	0,5257 <sup>a</sup>
25 a 29	27.861	13	0,46	9.463	1	0,10	0,0959 <sup>b</sup>
≥30	22.274	21	0,94	8.659	4	0,46	0,1815 <sup>a</sup>
Escolaridade (anos)							
0 a 3	11.067	8	0,72	2.341	1	0,42	0,5161 <sup>b</sup>
4 a 7	45.423	30	0,66	12.506	5	0,40	0,2935 <sup>a</sup>
8 a 11	62.631	30	0,79	23.739	14	0,58	0,5196 <sup>a</sup>
Nº consultas de pré-natal							
0-3	15.267	18	1,18	4.973	8	1,60	0,4520 <sup>a</sup>
4 e mais	105.270	70	0,66	33.832	12	0,35	0,0408 <sup>a</sup>
Tipo de parto							
Vaginal	68.481	38	0,55	19.773	6	0,30	0,1629 <sup>a</sup>
Cesáreo	53.568	50	0,93	19.453	14	0,71	0,3882 <sup>a</sup>
Duração da gestação (semanas)							
<37	9.303	37	3,98	3.552	9	2,53	0,2203 <sup>a</sup>
≥37	112.739	51	0,45	35.675	11	0,30	0,2459 <sup>a</sup>
Total	122.100	88	0,72	39.241	20	0,51	0,1596 <sup>a</sup>

Fonte: Sistema Nacional de Informações de Nascidos Vivos, 2000-2006. Secretaria Municipal de Saúde do Recife

DFTN: Defeitos de fechamento do tubo neural

<sup>a</sup> Teste de qui-quadrado

<sup>b</sup> Teste de Fisher

Em relação ao tipo de anomalia, observou-se que a distribuição seguiu o padrão descrito na literatura,<sup>1,9,11</sup> predominando os casos de espinha bífida e anencefalia. De acordo com dados do Atlas Mundial de Defeitos Congênitos publicado pela OMS em 2003,<sup>19</sup> o Brasil ocupa o quarto lugar quanto à prevalência de anencefalia e espinha bífida entre 41 países pesquisados.

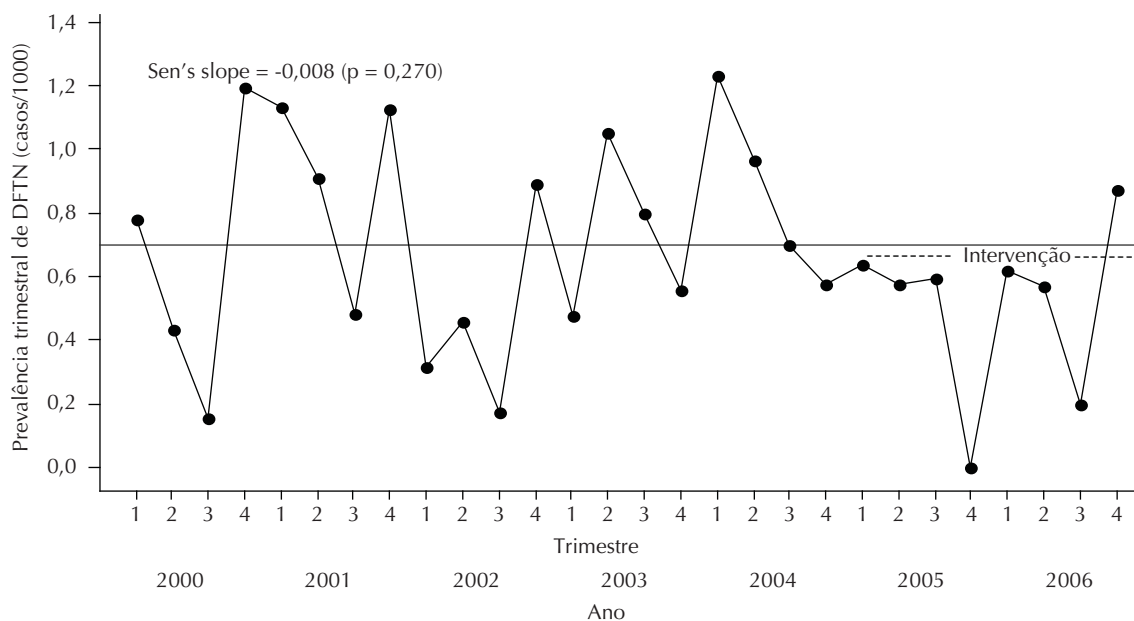
Não foi constatada redução na ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural após instituição de medida de fortificação de alimentos com ácido fólico na população estudada, tanto nas prevalências globais de DFTN entre os períodos pré e pós-fortificação quanto na tendência de redução do evento ao longo do período de estudo. Igualmente, não se constatou redução nas taxas de DFTN pós-fortificação quando foram considerados a idade e o nível de escolaridade materna, afastando a possibilidade de que algum desses grupos tenha se beneficiado com a fortificação.

O período de tempo de observação pode não ter sido suficiente para se observar a tendência de redução desta anomalia fetal após a adição de ácido fólico. Em estudos

anteriores que avaliaram a tendência de declínio dos DFTN, o período de acompanhamento pós- fortificação não foi superior a dois anos.<sup>11,16,22</sup>

Por outro lado, Honein et al<sup>11</sup> observaram redução de 19% na prevalência de DFTN, nos Estados Unidos, um ano após a instituição da medida de fortificação alimentar com ácido fólico. Neste caso, é importante considerar a defasagem de tempo entre a instituição da resolução e sua efetiva implantação no Brasil, visto que a regulamentação da adição de ácido fólico às farinhas de trigo e de milho pela Anvisa em 2004 não impede que os produtos fabricados antes desta data e com a sua validade dentro do prazo possam ter sido comercializados até o final do estoque, sem estar obrigatoriamente fortificados.

Igualmente, devido à baixa frequência do evento na população estudada que não permitiu a análise temporal da prevalência de DFTN em determinados estratos da população, não é possível afastar a possibilidade de que algum grupo específico de gestantes possa ter se beneficiado com a medida.



**Figura.** Prevalência trimestral de defeitos de fechamento do tubo neural em nascidos vivos. Recife, PE, 2000-2006.

Outra possibilidade é de que a estratégia de fortificação de alimentos consumidos em larga escala com ácido fólico não esteja sendo suficiente para garantir os níveis adequados de ingestão diária de 400 µg/dia de ácido fólico às gestantes para prevenção dos DFTN quando consumidos sem a associação de suplementação periconcepcional. Tanya et al,<sup>22</sup> analisando as mudanças no nível de ingestão de folato durante o período mandatório de fortificação, nos Estados Unidos, observaram aumento de apenas 100 µg/dia na ingestão de folatos na população. Ainda no referido estudo, houve aumento entre 26% e 38% de mulheres em idade fértil com o consumo mínimo de 400 µg/dia de folato necessário para prevenção dos DFTN, embora não tenha alcançado o percentual estimado de 50% de mulheres com o limiar desejado de consumo diário de ácido fólico durante o período mandatório de fortificação. Tem sido observada uma média de redução entre 20% e 32% na prevalência dos DFTN após a adoção de política de fortificação,<sup>11,22</sup> apesar do conhecido potencial de prevenção de 50% a 70%<sup>4,13</sup> desta malformação com a ingestão adequada de folato. Esses dados sugerem uma possível limitação da estratégia de fortificação de alimentos com ácido fólico, como medida isolada, para prevenção da anomalia. Diante desses achados, alguns autores<sup>16,19</sup> têm ponderado que, apesar das evidências de redução da ocorrência dos DFTN, o efeito protetor da fortificação de alimentos com ácido fólico na prevenção desses defeitos ainda está longe de ser alcançado e ressaltam a importância da adoção de diferentes estratégias de promoção do aumento da ingestão de folato durante a gestação, como a instituição da suplementação periconcepcional, a fortificação de alimentos e o estímulo

ao consumo das fontes naturais de ácido fólico para redução da ocorrência dessa malformação.

Outro fato a ser considerado na análise dos possíveis determinantes da não-redução dos DFTN na população estudada seria o consumo de quantidades insuficientes de alimentos fortificados por parte da população, decorrentes de hábitos alimentares regionais caracterizados pelo baixo consumo de farinhas de trigo e milho ou pelo baixo nível socioeconômico de considerável parcela da população. Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2002-2003)<sup>19</sup> mostrou uma aquisição domiciliar média de farinhas e derivados de 144 g/dia correspondente a 270 µg/dia de ácido fólico na região Sul em contraste com o Norte e Centro-Oeste cujas aquisições foram 70 g/dia com um aporte inferior a 100 µg/dia de ácido fólico ao considerar a fortificação regulamentada.

Embora menos provável, deve ser considerada a maior prevalência de doenças e outros fatores igualmente associados à ocorrência de DFTN na população de estudo, como diabetes mellitus,<sup>6</sup> uso de ácido valproico<sup>5</sup> e obesidade materna,<sup>18</sup> que poderiam ter contribuído para a não redução da prevalência da anomalia. Estudos<sup>17,22</sup> apresentam a variação do nível de folato na população por gênero, idade, raça/etnia no decorrer do período mandatório de fortificação, não se confirmando se a causa destas disparidades estaria relacionada a diferentes níveis de consumo de ácido fólico ou a uma resposta individual diferenciada a sua ingestão, sendo esta última influenciada por fatores genéticos ainda não esclarecidos ou pela presença de doenças associadas.

Quanto ao maior número de consultas de pré-natal ter estado relacionado à redução na ocorrência dos DFTN,

pode-se atribuir o fato à conscientização da necessidade do adequado acompanhamento gestacional diante do diagnóstico de malformação intra-uterino ou devido ao fato de estas mulheres terem sido encaminhadas ao pré-natal de alto risco cuja assistência se faz de forma mais vigiada.

Em síntese, embora não tenha sido observada tendência de redução na prevalência de DFTN, os resultados do presente estudo não permitem descartar o benefício de tal medida de saúde pública na prevenção desta malformação na população residente no Recife. Acredita-se que a associação das medidas de fortificação de alimentos com a suplementação periconcepcional

de ácido fólico possa suprir as necessidades deste micro-nutriente e evitar as possíveis falhas destas estratégias quando usadas isoladamente na prevenção dos DFTN. São necessários mais estudos avaliando o efeito da adição de ácido fólico nos alimentos, em um número maior de municípios e em um prazo maior da implantação da medida, verificando o nível de consumo dos produtos fortificados pelas mulheres em idade fértil.

#### **AGRADECIMENTO**

À Secretaria de Saúde Municipal do Recife pela disponibilização do banco de dados.

## REFERÊNCIAS

1. Aguiar MJB, Campos AS, Aguiar RALP, Lana AMA, Magalhães RL, Babeto LT. Defeitos de fechamento do tubo neural e fatores associados em recém-nascidos vivos e natimortos. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79(2):129-34. DOI: 10.1590/S0021-75572003000200007
2. Botto LD, Lisi A, Robert-Gnansia ER, Erickson JD, Volset SE, Mastroiacovo P, et al. International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendation: are the recommendations working? *BMJ*. 2005;330(7491):571. DOI: 10.1136/bmj.38336.664352.82
3. Boyles AB, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH, et al. Neural Tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ Health Perspect*. 2006;114(10):1547-52.
4. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*. 1992;327(26):1832-5.
5. Defoort EN, Kin PM, Winn LM. Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol*. 2006;69(4):1304-10. DOI: 10.1124/mol.105.017855
6. Dolk H, De Wals P, Gillerot Y, Lechat MF, Ayme S, Cornel M, et al. Heterogeneity of neural tube defects in Europe: the significance of site of defect and presence of other major anomalies in relation to geographic differences in prevalence. *Teratology*. 1991;44(5):547-59. DOI: 10.1002/tera.1420440508
7. Fine EL, Horal M, Chang TI, Fortin G, Loeken MR. Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes*. 1999;48(12):2454-62. DOI: 10.2337/diabetes.48.12.2454
8. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Folic Acid. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington: National Academy Press; 1998. p.193-305.
9. Green-Raleigh K, Carter H, Mulinare J, Prue C, Petrini J. Trends in Folic Acid Awareness and Behavior in the United States: The Gallup Organization for the March of Dimes Foundation Surveys, 1995-2005. *Matern Child Health J*. 2006;10(Sup 5):177-82. DOI: 10.1077/s10995-006-0104-0
10. Grillo E, Silva RJM. Defeitos do tubo neural e hidrocefalia congênita: Por que conhecer suas prevalências? *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79(2):105-6. DOI: 10.1590/S0021-75572003000200003
11. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA*. 2001;285(23):2981-6. DOI: 10.1001/jama.285.23.2981
12. Liu S, Roy W, Randell E, Longerich L, O'Connor KS, Scott H, et al. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2004;4(1):20. DOI: 10.1186/1471-2393-4-20
13. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Perconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001056.
14. Moretti ME, Bar-Oz B, Fried S, Koren G. Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*. 2005;16(2):216-9. DOI: 10.1097/01.ede.0000152903.55579.15
15. Nasser C, Nobre C, Mesquita S, Ruiz JG, Carlos HR, Prouvot L, et al. Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2005;11(4):199-203. DOI: 10.1590/S1676-26492005000400009
16. Persad VL, Van den Hofe MC, Dubé JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ*. 2002;167(3):241-45.
17. Rader JL, Schneeman BO. Prevalence of neural tube defects, folate status, and folate fortification of enriched cereal-grain products in the United States. *Pediatrics*. 2006;117(4):1394-9. DOI: 10.1542/peds.2005-2745
18. Ray JG, Wyatt PR, Vermeulen MJ, Meier C, Cole DE. Greater maternal weight and ongoing risk of neural tube defects after folic acid flour fortification. *Obstet Gynecol*. 2005;105(2):261-5.
19. Santos LMP, Pereira MZ. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Cad Saude Publica*. 2007;23(1):17-24. DOI: 10.1590/S0102-311X2007000100003
20. Sen PK. Estimates of the regression coefficient based on the Kendall's tau. *J Am Stat Assoc*. 1968;63(324):1379-89. DOI: 10.2307/2285891
21. Sneyers R. Sur l'analyse statistique des séries d'observations. Geneva: Organisation Météorologique Mondiale; 1975 (OMM Note Technique, 143).
22. Tanya GK, Willett WC, Weinstein MC, Kuntz KM. Population-level changes in folate intake by age, gender and race/ethnicity after folic acid fortification. *Am J Public Health*. 2006;96(11):2040-7. DOI: 10.2105/AJPH.2005.067371