

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR
CLAE PARA O ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO
EM ARROZES ENRIQUECIDOS**

Paulo Fernando Crepaldi
(Farmacêutico)

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Orientadora)

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos

**Campinas – SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C863d Crepaldi, Paulo Fernando
Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE para o estudo da estabilidade do ácido fólico em arrozes enriquecidos / Paulo Fernando Crepaldi /. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido fólico. 2. Alimentos enriquecidos. 3. Arroz. 4. Alimentos – Análise - Metodologia. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Development and validation of an HPLC method for the folic acid stability study in enriched rices

Palavras-chave em inglês (Keywords): Folic acid, Food enrichment, Rice, Food – Analysis - Methodology

Titulação: Mestrado em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy
Juliana Azevedo Lima
Marcelo Prado
Eliane Maria Ravasi Stefano Simionato

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Orientadora)

Profa. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato
(Membro)

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima
(Membro)

Prof. Dr. Marcelo Prado
(Membro)

Dedicatória

*Aos que não só acompanharam, mas também apoiaram,
Aos sempre presentes e aos que não estavam mais aqui,
Aos que com pequenos gestos fizeram tudo valer a pena,
É a vocês a quem ofereço este trabalho,
Minha grande e excepcional família.*

O justo confia em Deus

*Você que habita ao amparo do Altíssimo,
e vive à sombra do Onipotente,
diga a Javé: "Meu refúgio, minha fortaleza,
meu Deus, eu confio em ti!"*

*Ele livrará você do laço do caçador,
e da peste destruidora.*

*Ele o cobrirá com suas penas,
e debaixo de suas asas você se refugiará.
O braço dele é escudo e armadura.*

*Você não temerá o terror da noite,
nem a flecha que voa de dia,
nem a epidemia que caminha nas trevas,
nem a peste q devasta ao meio-dia.*

*Caiam mil ao seu lado
e dez mil à sua direita,
a você nada atingirá.*

*Basta que você olhe com seus próprios olhos,
para ver o salário dos injustos,
porque você fez de Javé o seu refúgio
e tomou o altíssimo como defensor.*

*A desgraça jamais o atingirá,
e praga nenhuma vai chegar à sua tenda,
pois ele ordenou aos seus anjos
que guardem você em seus caminhos.*

*Eles o levarão nas mãos,
para que seu pé não tropece numa pedra.*

*Você caminhará sobre cobras e víboras,
e pisará leões e dragões.*

*"Eu o livrarei, porque a mim se apegou.
Eu o protegerei, pois conhece o meu nome.
Ele me invocará, e eu responderei.*

*Na angústia estarei com ele.
Eu o livrarei e glorificarei.*

*Vou saciá-lo de longos dias
e lhe farei ver a minha salvação".*

Salmo 91

Das Utopias

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos se não fora
A mágica presença das estrelas!*

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter permitido a realização de um sonho.

Aos meus avós, **Olívio** (*em memória*) e **Olinda, José** (*em memória*) e **Cida** (*em memória*), pessoas simples e maravilhosas, anjos que olham por mim.

Aos meus pais, **Oswaldo** e **Conceição**, mãos amigas presentes em todas as épocas da minha vida. Meu orgulho, meu sangue, toda minha razão...

Ao meu irmão e melhor amigo **Gustavo Crepaldi**, companheiro fiel e querido, o maior de todos os são-paulinos. Impossível imaginar tudo isso sem você.

À minha noiva, namorada e eterna paixão **Michele Furlanetto**, responsável por um capítulo à parte nessa minha história.

Aos amigos **Deise** e **Luis Furlanetto**, minha segunda família, por todo apoio e companheirismo.

À minha professora, orientadora e amiga **Helena Godoy**, por todas as contribuições ao longo deste trabalho.

Aos amigos e membros da banca examinadora, **Profa. Eliane Simionato**, **Profa. Juliana Lima** e **Prof. Marcelo Prado**, pelas observações e sugestões que buscaram o aprimoramento desta dissertação.

Às competentes professoras e farmacêuticas **Rute Moura**, **Silvana Coradi** e **Eliane Simionato** pelas oportunidades confiadas no início da minha vida científica.

Ao **Prof. Rodrigo Catharino**, pela contribuição na qualificação deste projeto.

Ao farmacêutico, amigo e homeopata **Edécio de Araújo Júnior** por ter continuado a “fazer sua parte” mesmo que ausente.

Ao meu velho amigo e companheiro **Thiago Manzutti**, *expert* em assuntos computacionais e ponto de apoio para o bom andamento deste trabalho.

Ao competente amigo e parceiro de bancadas **Roger Wagner** pelo oportuno e essencial auxílio nos tratamentos estatísticos dos dados deste estudo.

Aos técnicos do laboratório e colegas **Cristina, Gislaine e Sr. Dirceu**, o meu muito obrigado.

Às minhas meninas de iniciação científica, **Ana Paula Dionísio e Carla Moratori**. Foi uma honra ter trabalhado com vocês.

Aos funcionários da **secretaria do Depto. de Ciência** e da **secretaria de Pós-Graduação** por todo auxílio prestado.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

Aos demais amigos e colegas agregados ao longo desses dois anos de FEA e a todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização desta dissertação: **Elizete, Betânia, Cláudia, Scherer, Giovana, Camila, Samanta, Lísia, Cíntia, Fábio, Cedenir, Éder, Talita, Milene**, entre tantos outros.

Minha sincera gratidão,

Paulo Fernando Crepaldi

ÍNDICE

RESUMO GERAL	01
GENERAL SUMMARY	02
INTRODUÇÃO GERAL	03
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	07

CAPÍTULO I

Ácido fólico e folatos na era da fortificação alimentar: Uma revisão	09
Resumo	11
Summary	12
Introdução	12
Química e cinética metabólica	14
Biodisponibilidade e bioeficácia	16
Significado nutricional	19
Toxicidade e segurança	23
Fortificação alimentar	25
A importância do arroz na fortificação alimentar	27
Reatividade e estabilidade química do ácido fólico e folatos	29
Referências Bibliográficas	34

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de ácido fólico em arroz enriquecido	45
Resumo	47
Summary	48
Introdução	49
Materiais e Métodos	52
Materiais	52
Reagentes	53
Equipamento	53

Método	53
Arroz tipo 1 polido	53
Arroz integral	54
Validação da Metodologia	55
Recuperação de padrões	55
Repetibilidade	55
Limites de detecção e quantificação	56
Resultados e Discussão	56
Validação da metodologia	56
Conclusões	62
Referências Bibliográficas	62

CAPÍTULO III

Aplicação da CLAE na determinação e avaliação da estabilidade do ácido fólico em arroz tipo 1 polido e integral enriquecidos	65
Resumo	67
Summary	68
Introdução	68
Materiais e Métodos	72
Materiais	72
Reagentes	73
Equipamento	74
Método	74
Arroz tipo 1 polido	74
Arroz integral	75
Resultados e Discussão	76
Avaliação da homogeneidade dos lotes e análise da estabilidade do ácido fólico nos arrozes submetidos a processamentos térmicos	79
Avaliação do processo de lavagem na estabilidade do ácido fólico em arrozes enriquecidos	82
Conclusões	84

Referências Bibliográficas	84
----------------------------------	----

CAPÍTULO IV

Estudo da estabilidade do ácido fólico durante a vida de prateleira do arroz

enriquecido	87
--------------------------	----

Resumo	89
--------------	----

Summary	90
---------------	----

Introdução	90
------------------	----

Materiais e Métodos	94
---------------------------	----

Materiais	94
-----------------	----

Reagentes	95
-----------------	----

Equipamento	96
-------------------	----

Método	96
--------------	----

Arroz tipo 1 polido	96
---------------------------	----

Arroz integral	97
----------------------	----

Resultados e Discussão	98
------------------------------	----

Conclusões	107
------------------	-----

Referências Bibliográficas	108
----------------------------------	-----

CONCLUSÕES GERAIS	111
--------------------------------	-----

ANEXOS	113
---------------------	-----

TABELAS

CAPÍTULO I

Ácido fólico e folatos na era da fortificação alimentar: Uma revisão

Tabela 1 - Necessidades diárias recomendadas de folatos	22
---	----

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de ácido fólico em arroz enriquecido

Tabela 1 - Taxas de recuperação do ácido fólico em dois níveis de concentração	56
Tabela 2 - Repetibilidade dos valores de concentração do ácido fólico adicionado em dois níveis aos dois tipos de arroz	57
Tabela 3 - Repetibilidade dos valores de concentração do ácido fólico adicionado em dois níveis às águas de lavagem	58

CAPÍTULO III

Aplicação da CLAE na determinação e avaliação da estabilidade do ácido fólico em arroz tipo 1 polido e integral enriquecidos

Tabela 1 - Análises de variância do arroz tipo 1 polido pelo teste de Tukey	80
Tabela 2 - Análises de variância do arroz integral pelo teste de Tukey	80
Tabela 3 - Porcentagem de perda de ácido fólico após processamentos térmicos do arroz tipo 1 polido e integral	81
Tabela 4 - Porcentagem de perda de ácido fólico após procedimento de lavagem do arroz	83
Tabela 5 - Análises de variância pelo teste de Tukey da perda do ácido fólico para as águas de lavagem	83

CAPÍTULO IV

Estudo da estabilidade do ácido fólico durante a vida de prateleira do arroz enriquecido

Tabela 1 -	Teores de ácido fólico em arrozes enriquecidos tipo 1 polido e integral, crus e cozidos	100
Tabela 2 -	Concentrações de ácido fólico em arroz tipo 1 polido, durante período de estocagem	101
Tabela 3 -	Concentrações de ácido fólico em arroz integral, durante período de estocagem	101
Tabela 4 -	Análises de variância do arroz tipo 1 polido pelo teste de Tukey durante o armazenamento da matriz	102
Tabela 5 -	Análises de variância do arroz integral pelo teste de Tukey durante o armazenamento da matriz	102
Tabela 6 -	Porcentagem de perda de ácido fólico durante o período de estocagem dos arrozes analisados	107

FIGURAS

CAPÍTULO I

Ácido fólico e folatos na era da fortificação alimentar: Uma revisão

Figura 1 -	Estrutura química do ácido fólico	15
Figura 2 -	Estruturas e nomenclaturas dos congêneres do ácido fólico	16
Figura 3 -	Absorção e distribuição dos derivados dos folatos	19
Figura 4 -	Funções bioquímicas do ácido fólico	20
Figura 5 -	Produtos de oxidação do ácido fólico	30

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de ácido fólico em arroz enriquecido

Figura 1 -	Perfil cromatográfico do extrato de arroz tipo I polido (A) e de arroz integral (B) enriquecidos com ácido fólico	60
Figura 2 -	Perfil cromatográfico da água de lavagem de arroz tipo I polido (A) e de arroz integral (B) enriquecidos com ácido fólico	61

CAPÍTULO III

Aplicação da CLAE na determinação e avaliação da estabilidade do ácido fólico em arroz tipo 1 polido e integral enriquecidos

Figura 1 -	Perfil cromatográfico do extrato do arroz tipo 1 polido cru (A), cozido (B) e da água de lavagem (C) enriquecidos com ácido fólico	77
Figura 2 -	Perfil cromatográfico do extrato do arroz integral cru (A), cozido (B) e da água de lavagem (C) enriquecidos com ácido fólico	78

CAPÍTULO IV

Estudo da estabilidade do ácido fólico durante a vida de prateleira do arroz enriquecido

Figura 1 -	Perfil cromatográfico do extrato do arroz tipo 1 polido cru (A) e cozido (B) enriquecidos com ácido fólico	98
------------	--	----

Figura 2 -	Perfil cromatográfico do extrato do arroz integral cru (A) e cozido (B) enriquecidos com ácido fólico	99
Figura 3 -	Comportamento do ácido fólico durante as estocagens do arroz tipo 1 polido	103
Figura 4 -	Comportamento do ácido fólico durante as estocagens do arroz integral	104

RESUMO GERAL

O ácido fólico, vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B, ganhou nos últimos anos a atenção do público em geral devido às suas propriedades em prevenir problemas do tubo neural. Hoje em dia, a maioria dos países desenvolvidos e o Brasil praticam a fortificação alimentar com o ácido fólico voluntariamente ou mesmo através de exigências legais. Visto que a estabilidade do ácido fólico é amplamente afetada pelas condições de processamento, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação do ácido fólico em arroz enriquecido polido e integral e em suas águas de lavagem, assim como avaliar a estabilidade dessa vitamina durante o processamento térmico e armazenamento dos arrozes. As análises por CLAE para arroz e suas águas de lavagem foram conduzidas usando coluna C_{18} como fase estacionária e solução acidificada com ácido acético/acetonitrila como fase móvel em 20 minutos de corrida e detecção por UV. No processamento térmico dos arrozes, três diferentes procedimentos de cozimento foram tomados para o arroz polido e dois para o arroz integral. Para se avaliar a perda do ácido fólico pela lavagem, uma xícara de arroz foi lavado manualmente por duas porções de 500mL de água durante 5 minutos para cada porção. Foi também verificada a degradação do ácido fólico durante a vida de prateleira dos arrozes expostos ou não à luz natural. Nas análises cromatográficas, a porcentagem de recuperação do ácido fólico esteve entre 92 e 101% e com boa repetibilidade. Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente 0,1 μ g/g e 0,2 μ g/g para ambos os tipos de arroz e 0,06 μ g/ml e 0,12 μ g/ml para suas águas de lavagem. As perdas de ácido fólico durante o cozimento foram menores para o arroz polido (21%) do que para o arroz integral (42%), entretanto, o arroz polido refogado em óleo antes do cozimento foi o que mostrou menores perdas da vitamina (16,1%). As maiores perdas ocorreram durante os processos de lavagem, 87% para o arroz polido e 93% para o arroz integral. Após os seis meses de armazenamento consideráveis perdas da vitamina foram percebidas (18,3% para o arroz integral e 34,6% para o arroz polido, em média). Sob exposição à luz, as perdas durante o armazenamento foram 31,4% e 39,1% para o arroz integral e polido crus, respectivamente, e 5,2% e 30,1% para arroz integral e polido crus estocados em proteção à luz. As perdas de ácido fólico nos cozimentos após ambas condições de armazenamento foram menores para o arroz integral (13,9%) do que para o arroz polido (26%), no entanto, o arroz integral armazenado em proteção à luz e cozido durante 20 minutos não mostrou qualquer perda da vitamina.

GENERAL SUMMARY

Folic acid, a complex B hydrosoluble vitamin, has got general public attention because its ability on neural tube defects' prevention. Nowadays, most of the developed countries around the world and Brazil practice mandatory or voluntary fortification with folic acid. Since folic acid is highly sensitive to such parameters as temperature, oxygen, light, etc., its stability is largely affected by processing conditions. The objective of this work was to develop a HPLC method for measuring added folic acid in fortified milled and brown rices and in their wash-waters as well as evaluating the stability of this vitamin during the thermal processing and storage of rices. The HPLC analyses for milled rice and its wash-water were carried through using a C₁₈ stationary phase with a mobile-phase of acetate buffer/acetonitrile in 20 minutes of run and UV detection. In the thermal processing of rices, three distinct procedures of cooking were used for milled rice (10 minutes cooking, 20 minutes cooking and fried with oil before cooking) and two for brown rice (20 minutes cooking and 30 minutes cooking). To evaluate the washing losses of folic acid one cup of milled rice (188g) and brown rice (213g) were manually washed using two portions of 500mL of water for 5 minutes each one. It was also verified the degradation of the folic acid during the shelf-life of the products exposed or not on natural light. The parameters evaluated for validation were established for each analysed matrix. In the chromatographic analyses, the percentage of recovery of the folic acid was between 92 and 101% and nice repeatability. The limits of detection and quantification were 0,1µg/g and 0,2µg/g for both kinds of rice, and 0,06µg/mL and 0,12µg/mL for their wash-water. The losses of folic acid in cooking were lower in milled rice (21%) than in brown rice (42%), therefore, the milled rice fried with oil before cooking showed the minor losses of the vitamin (16,1%). The highest losses occurred during the washing processes, 87% for milled rice and 93% for brown rice. Nevertheless, after six months of storage, considerable losses of vitamin were noticed (18,3% for brown rice and 34,6% for milled rice, on average). Under light conditions, the losses during storage was 31,4% and 39,1% for brown and milled crude rices, respectively, and 5,2% and 30,1% for brown and milled crude rices stored in absence of the light. The losses of folic acid in cooking after both storage conditions were lower in brown rice (13,9%) than in milled rice (26%), therefore, the brown rice stored in absence of light and cooked in 20 minutes showed no loss of the vitamin.

INTRODUÇÃO GERAL

A alimentação constitui fonte de cerca de 40 nutrientes para os seres humanos. Classicamente, 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) (GOODMAN e GILMAN, 2004).

As vitaminas apesar de sua composição química diversa podem ser definidas como substâncias orgânicas, que devem ser supridas em pequenas quantidades pelo ambiente, através da dieta (exceção à síntese da vitamina D feita sob influência da luz UV), uma vez que não podem ser sintetizadas novamente no organismo humano ou devido ao fato de sua síntese ser inadequada para manutenção da saúde (LEHNINGER, 1993).

Ao serem consumidas, muitas vitaminas não são biologicamente ativas e exigem processamento *in vivo*. No caso de várias vitaminas hidrossolúveis, a ativação inclui fosforilação e também podem exigir acoplamento a nucleotídeos de purina ou piridina. Nas suas principais ações conhecidas, as vitaminas hidrossolúveis atuam como co-fatores de enzimas específicas, enquanto pelo menos duas vitaminas lipossolúveis, as vitaminas A e D, comportam-se mais como hormônios e interagem com receptores intracelulares específicos em seus tecidos-alvo (GOODMAN E GILMAN, 2004).

A estreita relação entre dieta e saúde fez com que aumentasse a preocupação dos consumidores em ingerir alimentos nutritivos ou de alta qualidade, como, por exemplo, os enriquecidos. No entanto, a adição desses micronutrientes tem sido utilizada principalmente em estratégias de “marketing”.

O ácido fólico, também conhecido como vitamina B₉, B₁₁, B_c e M, apresentava, até poucos anos atrás, funções pouco conhecidas. Hoje, os folatos e o ácido fólico são conhecidamente essenciais 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 (FOKKEMA et al., 2005; KALTER, 2001; MUSKIET, 2005). Os folatos participam da formação de produtos intermediários do metabolismo, estão envolvidos na conversão da homocisteína em metionina, conversão da serina em glicina, síntese de timidato e purinas, metabolismo da histidina e na utilização ou geração de formato (DEVLIN, 1997; GOODMAN E GILMAN, 2004).

Uma ingestão de folato inferior à quantidade adequada também pode resultar em elevações dos níveis plasmáticos de homocisteína, dado que a hiperhomocisteinemia causa lesões nos vasos sanguíneos, podendo levar a aterosclerose (DIERKS et al., 1998; PARODI, 1997).

As principais fontes de folatos são os vegetais folhosos, carnes, fígados, rins, frutas, cereais, leguminosas, leveduras e cerveja (BRODY, 1991; CATHARINO e GODOY, 2004). Porém há muitos fatores que podem levar à deficiência dessa vitamina, incluindo a absorção e metabolismo deficientes, demanda aumentada e, principalmente, a ingestão inadequada (DEVLIN, 1997).

A dieta norte-americana padrão fornece 50-500 µg de folato absorvível por dia, para o adulto normal a ingestão diária recomendável é de 400 µg, enquanto que as mulheres grávidas ou durante lactação podem necessitar de 500-600 µg/dia ou mais (Food and Nutrition Board – NRC, 1989).

A fortificação com o ácido fólico, em um ou mais itens, mais consumidos na dieta é hoje considerado o melhor método para garantir o aumento da ingestão da vitamina a fim de reduzir o risco de surgimento de defeitos no tubo neural fetal na gestação. Nos Estados Unidos, através do Food and Drug Administration (FDA), a adição do ácido fólico tornou-se obrigatória para todos os fabricantes de produtos a base de cereais do país a partir de 1º de Janeiro de 1998. A faixa geral de enriquecimento dada pelo FDA é de 100-300 µg por 100g de todos os tipos de produtos cereais (HOFFPAUER et al., 1998). A maioria dos países desenvolvidos, hoje praticam voluntariamente a fortificação com ácido fólico.

No Brasil, a observação da tendência mundial de adição do ácido fólico aos alimentos e dos potenciais benefícios de um enriquecimento alimentar com a vitamina, aliada aos altos índices de anemia e de doenças causadas pela

deficiência de ácido fólico na população brasileira levaram o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através da publicação da Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, a partir de junho de 2004. Cada 100g de farinha de trigo e de milho deverá conter 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (ANVISA, 2005). A tendência é a extensão dessa regulamentação à outros produtos cereais, a exemplo do que ocorre em outros países.

A princípio, o arroz pode ser considerado um alimento ideal para a fortificação com o ácido fólico pois é a base da dieta de mais da metade da população mundial além de ser, quando beneficiado, uma das mais pobres fontes de folato e outras vitaminas hidrossolúveis dentre os cereais (JULIANO, 1990; MARSHALL et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 2005; MCKEVITH, 2004).

O brasileiro destina cerca de 22% do seu orçamento em alimentação, sendo o arroz ainda o principal produto da cesta básica. O consumo médio de arroz no Brasil varia de 74 a 76 Kg/habitante/ano, tomando-se por base o grão em casca (EMBRAPA, 2005).

No país, o arroz é mais consumido na forma polida, mas tem sido observado um aumento na demanda pelo arroz integral e pelas suas formas enriquecidas e de valor-agregado devido à reputação de excelência nutricional e por apelos de marketing (HEINEMANN et al., 2005).

O arroz beneficiado é uma das mais pobres fontes de folato e outras vitaminas hidrossolúveis. O concentração média de folato em arroz polido varia muito nas publicações da área, fenômeno que pode ser relacionado ao tipo de análise empregada, variedade da espécie e fatores ambientais e de cultivo. Para o arroz polido os valores de ácido fólico relatados variam de 3 a 32,3 µg/100g de produto (KONINGS et al., 2001; MARSHALL et al., 1994) e para o arroz integral as concentrações encontradas variam de 5 a 56 µg/100g (KONINGS et al., 2001; RADER, WEAVER e ANGYAL, 2000; RYCHLIK, 2004; United States Department of Agriculture, 2003).

O valor nutricional do arroz pode se tornar ainda menor como resultado do método usado em seu preparo para o consumo tal como os processos de lavagem e cozimento (RADER, WEAVER e ANGYAL; 2000; SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

A maioria dos métodos de enriquecimento para o arroz usam ácidos que fazem deles inapropriados devido à instabilidade da vitamina nessas condições (BRAMALL, 1986; JOSEPH, LIUZZO e RAO, 1990; MICKUS, 1955; MISAKI e YASUMATSU, 1985). Outro fator importante para uma fortificação bem sucedida com o ácido fólico é que o método utilizado tenha a capacidade de prevenir a lixiviação da vitamina durante o processo de lavagem e mantenha a estabilidade dessa durante o cozimento.

Estudos sobre o comportamento do ácido fólico frente aos diversos processos industriais e domésticos e da sua estabilidade nas matrizes adicionadas durante o armazenamento são muito importantes, tanto para oferecer ao consumidor um alimento seguro e nutritivo, como para orientar o produtor na sobredosagem necessária, para a produção, além das melhores condições de embalagem, transporte e armazenamento (CARVALHO, 1994).

Assim, o objetivo principal desse trabalho foi adaptar e validar a metodologia desenvolvida por CATHARINO e GODOY (2000) para a análise de ácido fólico em arroz enriquecido tipo 1 polido e integral, além de determinar a estabilidade dessa vitamina frente aos diferentes processamentos pelo qual o alimento pode passar em seu preparo doméstico e durante a estocagem da matriz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fortificação de Farinhas.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 12/2005.
2. BRAMALL, L.D. A novel process for fortification of rice. **Food technology in Australia**, 38: 281-284, 1986.
3. BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins.** 2 ed. Rev and Expanded. New York: Marcel Decker, 1991.
4. CARVALHO, P.R.N. Enriquecimento de Alimentos. **Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1-7, 1994.
5. CATHARINO, R.R., GODOY, H.T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para a análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 2000.
6. DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas.** 1 ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
7. DIERKES, J. KROESEN, M., PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B6 supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International Journal of Vitamin and Nutrient Research**, 68: 98-103,1996.
8. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Consumo, mercado e comercialização de arroz no Brasil.** Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz>. Acesso em 11/2005.
9. FOKKEMA, M.R., MEIJER, W.M., DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W., Benefits and concerns regarding folic acid fortification. **Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde**, 30(3): 218-223, 2005.
10. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.
11. HEINEMANN, R.J.B., FAGUNDES, P.L., PINTO, E.A., PENTEADO, M.V.C., LANFER-MARQUEZ, U.M. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, 18: 287-296, 2005.
12. HOFFPAUER, D.W. Enrichment update on folic acid. **Cereal Foods World**, 4: 365-367, 1998.
13. JOSEPH, E.W., LIUZZO, J.A., RAO, R.M. Development of wash and cook-proof methods for vitamin enrichment of rice grains. **Journal of Food Science**, 55: 1102-1107, 1990.
14. KALTER, H. Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. **Reproductive Toxicology**, 14: 463-476, 2000.
15. KONINGS, E.J.M., ROOMANS, H.H.S., DORANT, E., GOLDBOHM, R.A. SARIS, W.H.M. Folate intake of the dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73: 765-776, 2001

16. LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2 ed. Worth Publishers, 1993.
17. MARSHALL, W.E., WADSWORTH, J.I. **Rice science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1994.
18. MARTÍNEZ, A.B., BERRUEGO, G.R., CAVA, M.J.B, GRACIÁ, C.M., CASTÓN, M.J.P. Folate and folic acid intake estimation and food enrichment requirements. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 55(1): 5-14, 2005.
19. MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. **Nutrition Bulletin**, 29(2): 111-142, 2004.
20. MICKUS, R.R. Seal enriching additives on white rice. **Food Engineering**, 27: 91-160, 1955.
21. MISAKI, M., YASUMATSU, K. Rice fortification and enrichment. **The American Association of Cereal Chemists**, 38: 289-402, 1985.
22. MUSKIET, F.A.J. The importance of early folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 20(3): 403-410, 2005.
23. NAS-NCR. National Research Council, National Academy of Sciences. **Recommended Dietary Allowances**. 10ed. National Academic Press, Washington, 283p, 1989.
24. PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. **The Australian Journal of Dairy Technology**, 52: 109-118, October, 1997.
25. RADER, J.I., WEAVER, C.M., ANGYAL, G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. **Food Chemistry**, 70: 275-289, 2000.
26. RYCHLIK, M. Revised folate content of foods determined by stable isotope dilution assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17: 475-483, 2004.
27. SHRESTHA, A.K., ARCOT, J., PATERSON, J.L. Edible coating materials – their properties and use in the fortification of rice with folic acid. **Food Research International**, 36: 921-928, 2003.
28. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic>. Acesso em 11/2005.

Artigo a ser submetido à publicação no Boletim da SBCTA

CAPÍTULO I - ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS NA ERA DA FORTIFICAÇÃO ALIMENTAR: UMA REVISÃO

CREPALDI, P.F. e GODOY, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Departamento de Ciência de Alimentos
C.P. 6121 CEP 13083-970
crepaldi_bauru@yahoo.com.br

RESUMO

As deficiências nutricionais têm se tornado, cada vez mais, em um dos maiores problemas mundiais. A carência de folatos é a mais comum causa de anemia megaloblástica e está também direta ou indiretamente ligada à síntese deficiente de ácidos nucleicos. Essa deficiência ocorre mais freqüentemente em recém-nascidos, resultante de uma ingestão inadequada durante a gestação, levando provavelmente a um retardo mental. Este grupo de vitaminas hidrossolúveis é um dos mais importantes, bioquímica e fisiologicamente, para o desempenho normal do metabolismo humano, sendo que a ingestão adequada dos folatos é associada a uma menor incidência de defeitos do tubo neural, mal de Alzheimer e de alguns tipos de câncer. A adição do ácido fólico em alimentos no Brasil e em muitos países do mundo, tem levado a um aumento do *status* nutricional dos folatos na população e reduzido à incidência de defeitos no tubo neural e diversas outras doenças. Contrariando esse sucesso, muitas questões a respeito da biodisponibilidade de folatos naturais e adicionados continuam sem resposta. Visto que os folatos naturais e o ácido fólico são altamente sensíveis a parâmetros tais como temperatura, oxigênio, luz, etc., suas estabilidades são altamente afetadas pelas condições de processamento. O interesse na fortificação de alimentos com o ácido fólico está se tornando uma importante área de estudo de interesse direto para 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 e/ou pelas variáveis de processamento encontradas no dia-a-dia, seja em escala doméstica ou industrial.

SUMMARY

Nutritional deficiencies are increasingly becoming a major worldwide concern. The deficiency of folate is the more common cause of megaloblastic anemia and is either directly or indirectly responsible for the defective synthesis of nucleic acids. Folate deficiencies are found to be occurring most frequently in newborn infants, resulting from a deficiency during gestation, with a probable result of mental retardation. This group of water-soluble vitamins has been found to be one of the most important, physiologically and biochemically, for the normal metabolic functions of man, since the adequate intake of folate is associated with a lower incidence of neural tube defects, Alzheimer's disease and some kinds of cancer. The addition of folic acid to foods in Brazil and several other countries has yielded improve folate nutritional status and reduced the incidence of neural tube defects and some other diseases. In spite of this success, a number of questions remain regarding the bioavailability of natural and added folates. Since most naturally occurring folate and folic acid are highly sensitive to such parameters as temperature, oxygen, light, etc., their stability is largely affected by processing conditions. The interest in fortification of foods with folic acid is becoming an important area of study for food manufacturers in terms of compatibility of the nutrient with the base components of the matrix and their chemical stability as affected by storage and/or processing variables encountered during everyday standard food preparation either at home or on an industrial scale.

INTRODUÇÃO

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B que funciona como uma coenzima nas reações de transferência de carbono envolvidas no metabolismo de aminoácidos e sínteses de S-adenosilmetionina e de ácidos

nucléicos. Dentre suas várias formas bioquímicas, o ácido pteroilmonoglutâmico é encontrado em suplementos alimentares e em alimentos fortificados, enquanto que os isômeros do ácido pteroilpoliglutâmico são folatos naturalmente encontrados em alimentos como vegetais verdes folhosos, suco de laranja, legumes e fígado (DEVLIN, 1997; TAMURA e STOKSTAD, 1973).

Além da ingestão através dos alimentos e de suplementos, o *status* individual da vitamina depende da disponibilidade de cofatores necessários tais como as vitaminas B₆ e B₁₂, uso concomitante de agentes farmacológicos, forma química e matriz na qual está contida, além da variabilidade individual do fator metabólico. Detalhes a respeito das reações bioquímicas envolvendo a ação de folatos como coenzimas e suas importâncias no funcionamento celular já foram bem relatados (JOHANSSON, WITTHOFT, BRUCE e JÄGERSTAD, 2002; PFEIFFER et al., 1997).

Evidências epidemiológicas, metabólicas e investigações laboratoriais têm mostrado que a função do ácido fólico vai além da prevenção da anemia megaloblástica e de outras síndromes clássicas da deficiência (BROWE et al., 2001; GOODMAN e GILMAN, 2004; SMULDERS e STEHOUWER, 2005). Existem dados substanciais que dão suporte ao importante papel do ácido fólico na prevenção de defeitos do tubo neural, doença vascular, alguns tipos de câncer, doenças neurológicas tais como Mal de Alzheimer, função cognitiva e desordens afetivas (FOKKEMA et al., 2005; KALTER, 2001; MUSKIET, 2005).

Em Janeiro de 1998, a United States Food and Drug Administration (FDA) implementou um programa visando fortificar todos os produtos farináceos, cereais e de origem cereal com ácido fólico a um nível médio de 140µg/100g de produto, objetivando a prevenção primária de defeitos do tubo neural fetal durante a gestação das norte-americanas (FDA, 1996). Nos anos seguintes, programas similares foram introduzidos em diversos países do mundo de forma mandatária ou mesmo voluntária (EICHHOLZER, 2001).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da RDC nº 344 tornou obrigatória, a partir de junho de 2004, a fortificação das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico em concentrações de 4,2 mg e 150 µg por

100g de produto, respectivamente (ANVISA, 2005). A medida tem como objetivo diminuir os altos índices de anemia e de doenças causadas pela deficiência de ácido fólico na população brasileira, e hoje, a tendência é a extensão dessa regulamentação à outros produtos cereais de grande consumo, como o arroz, a exemplo do que já ocorre em outros países.

A adição do ácido fólico aos alimentos torna necessário estudos da estabilidade da vitamina diante dos diversos processos industriais e domésticos pelo qual o alimento será submetido durante a produção, armazenamento e preparo para o consumo (FAVIER et al., 1987; FORD et al., 1969; LIMA e GODOY, 2001; VIBERG et al., 1997). Esse monitoramento objetiva, principalmente, oferecer ao consumidor um alimento seguro e nutritivo, além de elucidar o produtor quanto às melhores condições de embalagem, transporte, armazenamento e sobredosagem da vitamina.

QUÍMICA E CINÉTICA METABÓLICA

As principais porções da molécula do ácido fólico incluem um anel de pteridina ligado por uma ponte de metileno ao ácido para-aminobenzóico, que é unido ao ácido glutâmico por uma ligação amídica (**Figura 1**). Também conhecido como ácido pteroilglutâmico, o ácido fólico é a forma farmacêutica comum dessa vitamina e comumente utilizado no enriquecimento alimentar, no entanto, não é o congênere do folato encontrado naturalmente nos alimentos nem a coenzima ativa para o metabolismo intracelular.

Os folatos presentes no alimento encontram-se, em grande parte, na forma de poliglutamatos reduzidos (TAMURA e STOKSTAD, 1973), e a absorção requer o transporte e a ação de uma pteroil- γ -glutamil carboxipeptidase associada às membranas das células da mucosa (ROSENBERG, 1976). O folato é absorvido na forma reduzida, após a metilação, pela diidrofolato redutase encontrada na mucosa intestinal.

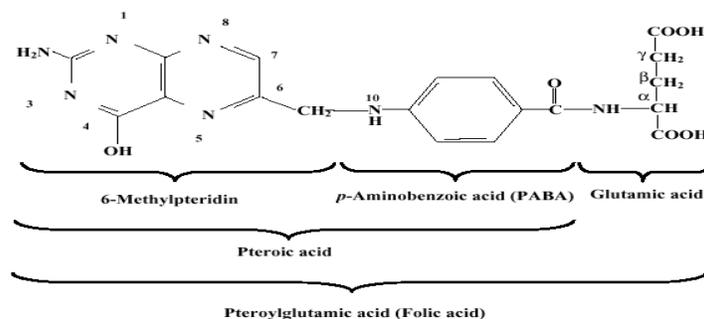


Figura 1. Estrutura química do ácido fólico

Fonte: BÜHLER, 1998.

Uma vez absorvido, o folato é rapidamente transportado até os tecidos na forma de metiltetraidrofolato e seu suprimento é mantido de forma constante através dos alimentos e pelo ciclo enterohepático (STEINBERG et al., 1979).

Após o processo de filtração glomerular, parte da vitamina circulante é eliminada através da urina. Já a vitamina não absorvida dos alimentos e mesmo parte daquela que perfaz o ciclo enterohepático é excretada nas fezes (BRODY, 1994; DEVLIN, 1997; GOODMAN e GILMAN, 2004).

De certa forma, os folatos naturais tornam-se significativamente menos biodisponíveis que o ácido fólico adicionado ao alimento (BROWE et al., 2001; MCNULTHY e PENTIEVA, 2005). É o que demonstra, por exemplo, o estudo de HANNON-FLETCHER et al. (2004) no qual os folatos contidos no espinafre apresentaram um potencial de biodisponibilidade em torno de 30% quando comparado à mesma quantidade de ácido fólico. Já WRIGHT e FINGLAS (2005) sugerem que essa relação ainda não está bem definida. Os principais folatos encontrados naturalmente nos alimentos e seus congêneres estão apresentados na **Figura 2**.

No entanto, comparando a farmacocinética da administração oral de suplemento alimentar de ácido fólico e de 5-metiltetraidrofolato em pacientes coronariopatas, o último apresentou maior biodisponibilidade (WILLEMS et al., 2004).

Uma grande parte da população, especialmente subgrupos com alta demanda, aparenta possuir necessidades distintas das formas químicas dos

folatos (STANGER, 2002). Essa percepção sugere que o critério para se definir “deficiência de folato” deve ser repensado.

A biodisponibilidade depende também diretamente da matriz, a absorção do ácido fólico a partir do arroz e do pão fortificados mostrou ser metade do valor observado para a absorção da vitamina em solução aquosa simples (COLMAN, 1975).

No caso do leite pasteurizado enriquecido, que possui proteínas de ligação com o ácido fólico, a vitamina apresenta em torno de 74% de biodisponibilidade quando comparado ao leite UHT cujo processo de tratamento leva suas proteínas à desnaturação (DE JONG et al., 2005). Tanto o ácido fólico quanto o 5-metiltetraidrofolato apresentam dificuldade de absorção e transporte intestinal quando ligados às proteínas naturalmente presentes nos alimentos em que se encontram (VERWEI et al., 2005).

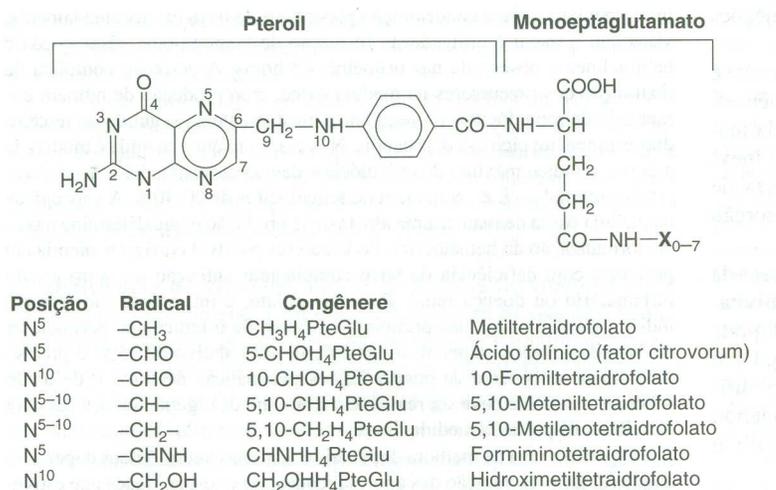


Figura 2. Estruturas e nomenclaturas dos congêneres do ácido fólico

Fonte: GOODMAN e GILMAN, 2004.

BIODISPONIBILIDADE E BIOEFICÁCIA

A biodisponibilidade é um importante, mas sempre nebuloso conceito associado à eficiência de absorção e à utilização metabólica de um nutriente

ingerido. Diversos estudos têm mostrado uma conexão entre a biodisponibilidade dos folatos com a saúde humana, em sua maioria representada pela função gastrointestinal alterada. Exemplos incluem a má absorção dos folatos na gastrite atrófica (RUSSELL et al., 1986), doença celíaca (HALSTED, REISENAUER, SHANE e TAMURA, 1978) e raras síndromes metabólicas da absorção dos folatos (ZITTOUN, 1995).

A biodisponibilidade de folatos de fontes naturais tem sido causa de discussão desde que os estudos clássicos de TAMURA e STOKSTAD (1973) demonstraram a incompleta biodisponibilidade dos folatos naturais além das grandes diferenças notadas entre diversos alimentos. Já o ácido fólico parece ser, em geral, bem absorvido de alimentos fortificados (JOHANSSON, WITTHOFT, BRUCE e JÄGERSTAD, 2002; PFEIFFER et al., 1997).

Buscando compensar a diferença entre as biodisponibilidades dos folatos naturais e do ácido fólico, o United States Institute of Medicine (2000) determinou que a compensação diária recomendável da vitamina passaria a ser expressa como equivalentes dietéticas de folato, a qual foi ajustada devido a aparente maior biodisponibilidade do ácido fólico sintético quando comparado à mesma quantidade de folato naturalmente presente nos alimentos. O fator de ajuste levou em consideração a assumida biodisponibilidade de 85% de ácido fólico consumido na presença de alimento (PFEIFFER et al., 1997) e a assumida biodisponibilidade de 50% de folato consumido em uma dieta mista (SAUBERLICH et al., 1987).

Entretanto, em estudo de BROUWER et al. (1999), a biodisponibilidade dos folatos de vegetais e frutas cítricas variou de 60-98%. O ácido fólico de pães, macarrão e arroz enriquecidos também apresenta alta biodisponibilidade (PFEIFFER et al., 1997), achados similares também foram reportados com o ácido fólico ingerido a partir de cereais matinais fortificados (JOHANSSON et al., 2002). Estes dois últimos trabalhos contradizem estudos anteriores que demonstraram a eficácia mas também a incompleta biodisponibilidade do ácido fólico adicionado a grãos cereais nativos da África do Sul (COLMAN, 1982).

Uma grande variedade de fatores podem contribuir para a incompleta biodisponibilidade dos folatos, incluindo variáveis pré e pós-absortivas. Dentre as

variáveis pré-absortivas estão, entre outros fatores, as estruturas celulares vegetais que impedem a liberação dos folatos (CASTENMILLER, VAN DE POLL, WEST, BROUWER, THOMAS e VAN DUSSELDORP, 2000; VAN HET HOF, TIJBURG, PIETRZIK e WESTSTRATE, 1999) e a instabilidade gástrica dos folatos naturalmente presentes nos alimentos (SEYOUM e SELHUB, 1998). No entanto, a maior preocupação quanto a biodisponibilidade envolve a incompleta desconjugação intestinal dos poliglutamil folatos o que levaria a sua incompleta absorção (GREGORY et al., 1991; MELSE-BOONSTRA et al., 2004). Um polimorfismo no gene carboxipeptidase II que codifica a enzima pteroilpoliglutamato hidrolase, é indicado como responsável indireto pela reduzida biodisponibilidade dos poliglutamil folatos ingeridos na dieta normal (DEVLIN et al., 2000).

Os papéis dos processos fisiológicos e metabólicos pós-absortivos na biodisponibilidade dos folatos também não podem ser ignorados. De grande importância na era da fortificação alimentar, o polimorfismo do gene humano diidrofolato redutase, aparentemente está associado à reduzida expressão da enzima DHFR, responsável pela redução química do ácido fólico em dois níveis após sua absorção (COWARD, PARAMESWARAN, CASHMORE e BERTINO, 1974), o que tem sido associado ao aumento do risco de surgimento de defeitos do tubo neural em crianças geradas por mães portadoras de tal deleção genética (JOHNSON et al., 2004).

Muitos outros fatores pós-absortivos podem afetar a bioconversão ou o transporte dos folatos e, portanto, devem ser considerados relevantes na avaliação de suas biodisponibilidades. É o caso do polimorfismo do gene responsável pela produção da metiltetraidrofolato redutase (MTHFR), associado à reduções nos níveis séricos e eritrocitários dos folatos (SHELNUTT et al., 2003), além de aumento da concentração da homocisteína plasmática (BRATTSTROM et al., 1998; JACQUES et al., 1996; KAUWELL et al., 2000). Recentemente foi relatado que autoanticorpos contra o receptor de folato são comuns em parturientes cujos filhos apresentaram defeitos do tubo neural, sugere-se, dessa forma, que um processo autoimune também pode interferir na disponibilidade dos

folatos para o adequado desenvolvimento do embrião (ROTHENBERG et al., 2004). A **Figura 3** mostra um esquema simplificado da absorção e da distribuição da vitamina.

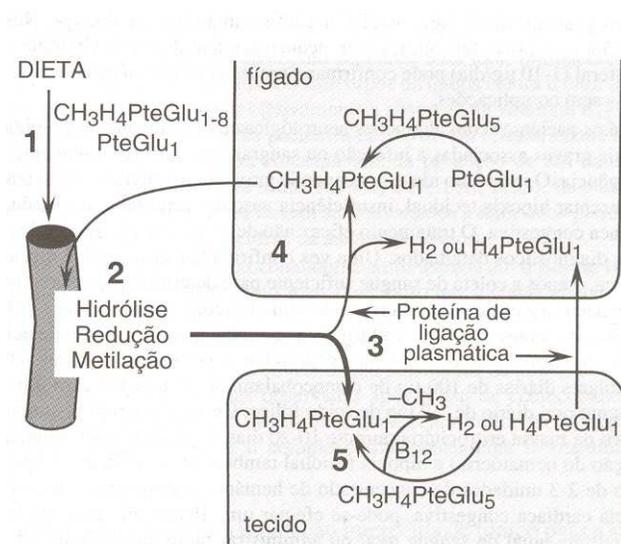


Figura 3. Absorção e distribuição dos derivados dos folatos.

Fonte: GOODMAN e GILMAN, 2004.

SIGNIFICADO NUTRICIONAL

Após absorção, o ácido pteroilglutâmico é rapidamente reduzido na posições 5, 6, 7 e 8 a ácido tetraidrofólico, que passa a atuar como acceptor de várias unidades de um carbono. Essas unidades ligam-se a posição 5 ou 10 do anel pteridina e podem fazer uma ponte entre esses átomos para formar um novo anel de 5 membros, sendo que cada coenzima sintetizada desempenha um papel específico no metabolismo intracelular (GOODMAN e GILMAN, 2004).

Dentre as principais funções bioquímicas atribuídas aos folatos, podemos citar: conversão da homocisteína em metionina, conversão da serina em glicina, síntese de timidilato, metabolismo da histidina, síntese de purinas, utilização ou geração de formato. É basicamente envolvido com a metilação, a síntese de nucleotídeos e à diminuição da homocisteína plasmática (BROUWE et al., 2001;

GOODMAN e GILMAN, 2004; SMULDERS e STEHOUWER, 2005). Um resumo das funções bioquímicas do ácido fólico é apresentado na **Figura 4**.

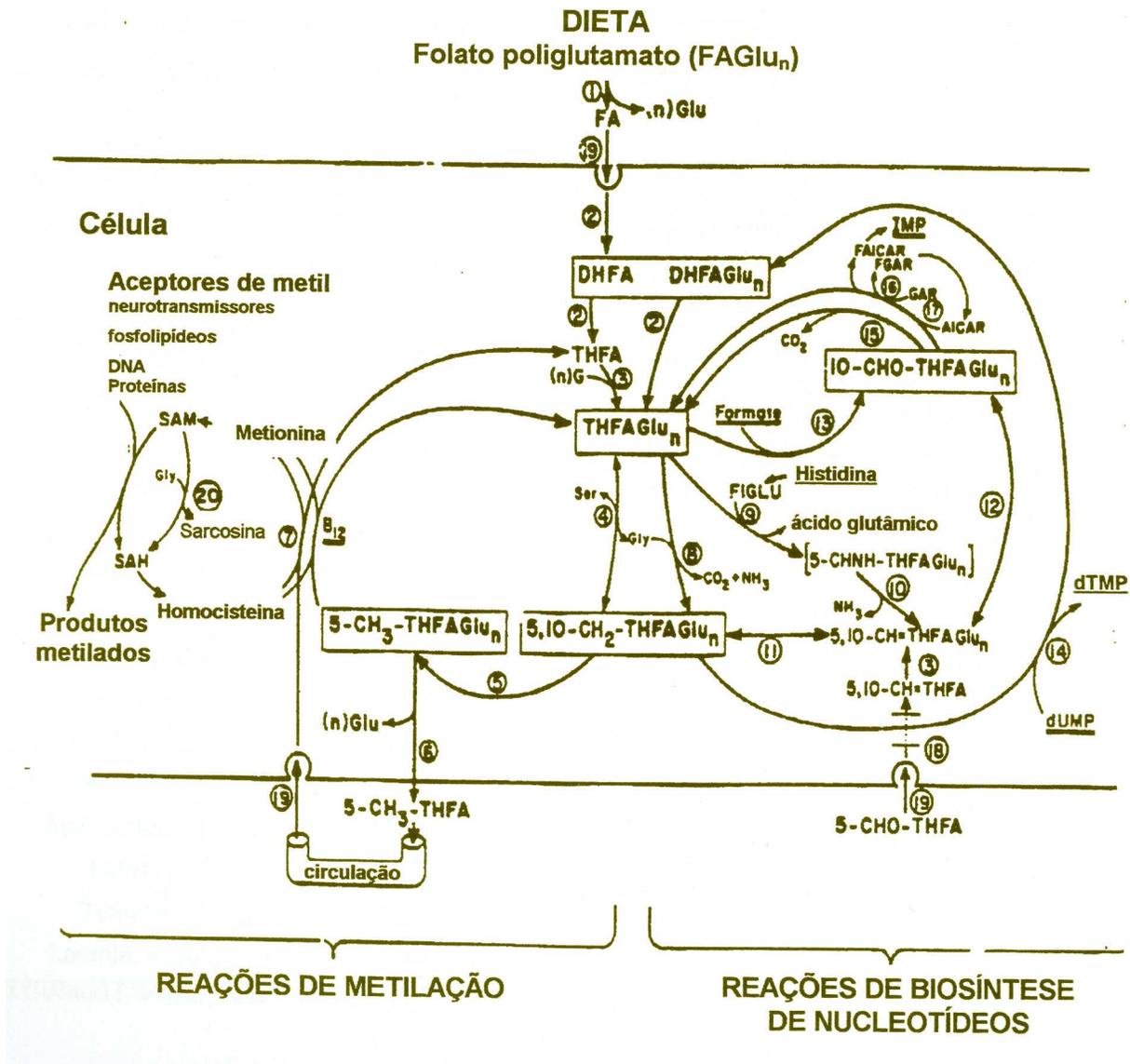


Figura 4. Funções bioquímicas do ácido fólico.

Fonte: LIMA e GODOY, 2001.

Os folatos e o ácido fólico são, portanto, essenciais 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 (BOLHEIMER et al., 2005; FOKKEMA et al., 2005; KALTER, 2001; MUSKIET, 2005).

O consumo de alimentos fortificados nos EUA foi relacionada à queda de 60% nos índices de neuroblastoma em recém nascidos (FRENCH et al., 2003) além de diminuir os índices de severidade dos defeitos no tubo neural em crianças e de câncer colorretal em adultos (BOLHEIMER et al., 2005; COTTER e DALLY, 2005).

A suplementação alimentar com folatos está sendo considerada em pacientes com níveis plasmáticos elevados de homocisteína. VILLA et al. (2005) mostrou que a suplementação diária, ao longo de 8 semanas, com 7,5 mg de ácido fólico em mulheres pós-menopausa levou a uma diminuição nos níveis plasmáticos de homocisteína, além de aumentar o metabolismo lipídico e insulínico.

Para alcançar resultados similares PINTÓ et al. (2005) tratou duas populações de homens com hiperhomocisteinemia e doença coronariana através de uma dieta baseada em 500 µg/dia de folato e 500 µg/dia de ácido fólico sintético através de suplementação farmacêutica. A pesquisa mostrou que uma dieta rica em folato é tão efetiva quanto as cápsulas de ácido fólico na diminuição de homocisteína e na prevenção de doença cardiovascular.

A hiperhomocisteinemia também está diretamente relacionada aos sintomas da depressão, sendo que um fornecimento dietético com base em 800 µg/dia de ácido fólico pode auxiliar no tratamento desse distúrbio psiquiátrico (COPPEN e BOLANDER-GOUAILLE, 2005).

Muitos alimentos são ricos em folatos, especialmente os vegetais verdes frescos, o fígado, a levedura e algumas frutas (CHO, JOHNSON e SONG, 2002; FOKKEMA, 2005; GOODMAN e GILMAN, 2004; RYCHLIK, 2004). O cozimento prolongado pode destruir até 90% do conteúdo de folato desses alimentos. Em geral a dieta americana padrão fornece 50-500 µg de folato absorvível por dia, sendo que os indivíduos com alto consumo de vegetais frescos e carnes possam ingerir até 2 mg/dia. Os cereais matinais enriquecidos são as maiores fontes de folatos nos EUA (CHO, JOHNSON e SONG, 2002).

Para o adulto normal a ingestão diária recomendável é de 400 µg, enquanto as mulheres grávidas ou durante a lactação e os pacientes com alta taxa de renovação celular podem necessitar de 500-600 µg/dia ou mais. Para a prevenção de defeitos do tubo neural recomenda-se uma ingestão diária de pelo menos 400 µg de folato nos alimentos ou na forma de suplementos, começando um mês antes da gravidez e prosseguindo durante pelo menos o primeiro trimestre (BOUSHEY et al., 2001; GOODMAN e GILMAN, 2004). Esse índice seria capaz de reduzir a cerca de 36% o risco de surgimento de defeitos no tubo neural fetal, enquanto que a suplementação com 5mg de ácido fólico/dia reduziria o risco a cerca de 85% (PULIKKUNNEL e THOMAS; 2005; WALD et al., 2001). As necessidades diárias de folatos, segundo a Food and Nutrition Board – INSTITUTE OF MEDICINE (1998), estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Necessidades diárias recomendadas de folatos.

Categoria	Grupo Etário	Folato (µg/dia)
Lactentes	0-6 meses	65
	7-12 meses	80
Crianças	1-3 anos	150
	4-8 anos	200
Homens	9-13 anos	300
	14-18 anos	400
	19-30 anos	400
	31-50 anos	400
	51-70 anos	400
	> 70 anos	400
Mulheres	9-13 anos	300
	14-18 anos	400
	19-30 anos	400
	31-50 anos	400
	51-70 anos	400
	> 70 anos	400
Gravidez	< 18 anos	600
	19-30 anos	600
	31-50 anos	600
Lactação	< 18 anos	500
	19-30 anos	500
	31-50 anos	500

Fonte: Institute of Medicine (1998).

No entanto, o consumo da vitamina em doses inferiores às preconizadas pode atingir 87% da população de mulheres em idade fértil nos EUA (LEWIS et al., 1999). Um questionário aplicado a 56 mulheres sino-americanas indica que a quantidade de ácido fólico média ingerida por essa população é de 373 µg/dia (TSENG e HERNÁNDEZ, 2005). Um estudo com mulheres croatas mostra que apenas 14% das mulheres em idade fértil ingerem folatos nas doses apropriadas embora 72% conheçam os benefícios da vitamina (GJERGJA et al., 2005).

Na Austrália 65% dos idosos consomem 320 µg/dia e apenas 0,4% dessa população consome mais que nível de segurança de 1000 µg/dia de folatos (FLOOD et al., 2001). Já no Japão a ingestão média de folatos é de 491,7 µg/dia, sendo que mais da metade desse valor é proveniente do consumo do arroz enriquecido (TAGUCHI et al., 2004).

TOXICIDADE E SEGURANÇA

O ácido fólico em sua forma oral, em geral não é tóxico, até mesmo com altas doses de até 15 mg/dia, não há relatos comprovados de efeitos colaterais (CORNEL, SMIT e BERG, 2005; GOODMAN e GILMAN, 2004).

Buscando avaliar a toxicidade dessa vitamina, um estudo realizado no estado do Texas, mostrou que de 1998 até 2003 apenas cerca de 650 chamadas relacionadas ao ácido fólico foram feitas para os centros de intoxicação e envenenamento do estado norte-americano, ainda assim, a maioria dos casos de exposição foram ligados a apenas efeitos adversos de menor importância (FORRESTER, 2005).

Ainda que o ácido fólico seja considerado livre de toxicidade e seguro, existem dúvidas quanto à sua capacidade em mascarar os sintomas da deficiência da vitamina B₁₂, cuja carência é estimada entre 10-15% da população acima dos 60 anos de idade, fato que levaria à uma progressão dos sintomas neurológicos (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998; MCCARTHY, 1997). Na população feminina canadense a fortificação alimentar foi responsável pelo aumento da folemia

enquanto que a deficiência da vitamina B₁₂ persistiu desde que a lei nacional de suplementação foi instituída (RAY et al., 2003).

A indicação de consumo do ácido fólico como suplemento alimentar entre os epiléticos tem sido cada vez mais comum, já que o uso prolongado de drogas antiepiléticas está ligada ao aumento da homocisteinemia e, conseqüentemente, ao risco de arteriosclerose (HAMED e NABESHIMA, 2005). No entanto, especula-se que a vitamina em grandes quantidades pode anular o efeito antiepilético do fenobarbital, da fenitoína e da primidona e aumentar a frequência de convulsões em crianças suscetíveis (REYNOLDS, 1968).

No Canadá, os níveis plasmáticos de fenitoína foram avaliados na população epilética usuária do medicamento após a implementação da lei de fortificação alimentar com o ácido fólico. Concluiu-se que a exposição desses pacientes aos níveis encontrados nos alimentos não alteraram significativamente a concentração e a meia-vida plasmática do anticonvulsivante (RAY, LANGMAN, MAMDANI e COLE; 2005).

As publicações que relacionam a suplementação com o ácido fólico durante a gravidez ao risco de aborto são poucos e inconsistentes (GEORGE et al., 2002; HOOK e CZEIZEL, 1997). Um grande estudo na China envolvendo 23.806 nascimentos não mostrou evidências de que a suplementação tenha qualquer influência no risco de aborto (GINDLER et al., 2001).

Outros estudos sugerem a possibilidade de um aumento na ocorrência de nascimentos múltiplos. Segundo levantamento de KÄLLÉN (2004), houve um aumento nos índices do nascimento de gêmeos dizigóticos na população sueca consumidora do ácido fólico em forma de suplemento alimentar quando comparada à população não consumidora. Outros autores também relacionam a implementação da fortificação alimentar a alterações na frequência do nascimento de gêmeos (SHAW et al., 2003; WALLER et al., 2003).

Os folatos sempre foram vistos como protetores bioquímicos do desenvolvimento de câncer em pessoas sem lesões malignas pré-existentes ou focos de neoplasias, hoje já existem sinais que os folatos podem aumentar o desenvolvimento e a progressão de lesões malignas, pré-malignas não

diagnosticadas e também as já existentes (KIM, 2004; WRIGHT, FINGLAS e SOUTHON, 2001).

Embora estudos oficiais não tenham corroborado essas afirmações, o FDA recomendou que os comprimidos orais de ácido fólico sejam limitados a uma concentração de 1 mg ou menos (GOODMAN e GILMAN, 2004).

FORTIFICAÇÃO ALIMENTAR

Em março de 1996 a FDA publicou uma regulamentação determinando que a todos os cereais e produtos de origem cereal, incluindo arroz, farinhas, cereais matinais, macarrão, entre outros, fossem adicionados em média 140 µg de ácido fólico por 100g do produto (FDA, 1996). O objetivo dessa regulamentação foi aumentar a ingestão do ácido fólico por mulheres em idade fértil a fim de diminuir a incidência de defeitos no tubo neural fetal. A regulamentação tornou-se efetiva somente a partir de Janeiro de 1998.

Uma regulamentação similar foi implantada no Canadá em 1997 (JACQUES et al., 1999) e na maioria dos países europeus nos anos seguintes (EICHHOLZER, 2001).

No Brasil, os altos índices de anemia e de doenças causadas pela deficiência de ácido fólico na população brasileira levaram o Ministério da Saúde e a ANVISA, através da publicação da Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, a partir de junho de 2004. Cada 100g de farinha de trigo e de milho deve conter 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (ANVISA, 2005). A tendência é a extensão dessa regulamentação à outros produtos cereais, a exemplo do que ocorre em outros países.

Em geral, a fortificação nesses países foi capaz de diminuir ligeiramente os níveis de homocisteína em pacientes cardiopatas, embora a diminuição do risco cardiovascular desses indivíduos continue dependente da suplementação farmacêutica (ANDERSON et al., 2004; BRILAKIS et al., 2002).

A diminuição dos níveis de homocisteína, após a regulamentação americana de 1998, aparentemente está mais relacionada a jovens caucasianos enquanto que a população idosa negra americana mostra um aumento nos níveis de folatos circulantes sem que os níveis de homocisteína tenham se alterado nesse período (WILLIS et al., 2000).

Levando-se em consideração que, em muitos países, menos de 50% da população feminina tomam suplemento de ácido fólico durante a gravidez, a fortificação em alimentos-base da dieta normal traz vantagens práticas (RAY, SINGH e BURROWS, 2004). Os resultados da fortificação alimentar no Canadá já mostram uma pronunciada redução no surgimento de diversos problemas congênitos, incluindo a spina bífida (RAY et al., 2002).

Nos Estados Unidos, a fortificação com ácido fólico foi bem sucedida na redução do surgimento de neuroblastoma, spina bífida, problemas orofaciais e na diminuição da severidade de acometimento dos defeitos no tubo neural em recém nascidos (COTTER e DALLY, 2005; FRENCH et al., 2003; KALTER, 2000; LAWRENCE et al., 2003).

A estimativa, nos EUA, é que com a fortificação a ingestão diária recomendável de 400 µg da vitamina para mulheres em idade fértil seja alcançada somente com a dieta, sem que haja a necessidade de uma suplementação com pílulas de ácido fólico (FIRTH et al., 1998; KOMAROMY-HILLER, 1999; OAKLEY, 1997). A contribuição dessa fortificação alimentar no *status* nutricional dos norte-americanos resultou num aumento médio de 200 µg de ácido fólico/dia/pessoa (GREGORY III, 2004).

Embora essa quantidade de vitamina possa evitar problemas no tubo neural, a ingestão de 200 µg/dia seria igualmente efetiva, no entanto, mais segura para a população em geral (DALY et al., 1997). Visto que o excesso de ácido fólico pode mascarar a deficiência da vitamina B₁₂, o ideal seria a diminuição nos níveis de enriquecimento ou mesmo a adição dessa aos alimentos hoje fortificados (RAY, COLE e BOSS, 2000).

Lamentavelmente, não existem programas governamentais que avaliem o *status* da vitamina e seus reais benefícios e prejuízos à população a partir da obrigatoriedade da fortificação alimentar (NEUHOUSER e BERESFORD; 2001).

A IMPORTÂNCIA DO ARROZ NA FORTIFICAÇÃO ALIMENTAR

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o mais importante cereal para a nutrição humana, consumido por 2/3 da população global e base da dieta da população de 15 países na Ásia e no Pacífico, 10 países na América Latina e no Caribe e 8 países na África (FAO, 1999).

Nas nações em desenvolvimento, o arroz é fornecedor de 715 kcal/capita/dia, 27% do suprimento dietético de energia, 20% das proteínas e de 3% dos lipídios (FAOSTAT; 2001). No Brasil, é responsável pelo suprimento de 12% do total de proteínas e por 14% do total de energia fornecidos pela dieta base do brasileiro (IRRI, 2003).

Pesquisas sobre a ingestão dietética no Brasil mostraram um consumo per capita de 39,2 Kg de arroz beneficiado no ano 2000, menor do que o consumo asiático (81 Kg/ano), mas maior do que o sul e norte-americanos, estimados em 31,1 e 11,2 Kg/ano, respectivamente (IRRI, 2004).

O brasileiro destina cerca de 22% do seu orçamento em alimentação, sendo o arroz ainda o principal produto da cesta básica. O consumo médio de arroz no Brasil varia de 74 a 76 Kg/habitante/ano, tomando-se por base o grão em casca (EMBRAPA, 2005).

No país, o arroz é mais consumido na forma polida (arroz integral destituído de sua casca), mas tem sido observado um aumento na demanda pelo arroz integral e pelas suas formas enriquecidas e de valor-agregado devido à reputação de excelência nutricional e por apelos de “marketing” (HEINEMANN et al., 2005).

Dentre esses, o arroz parboilizado é prezado por sua vida-de-prateleira maior em comparação com o arroz integral, levado pela inativação de suas enzimas (JULIANO e BECHTEL, 1985). O arroz polido que passa pelo processo de parboilização (aquecimento do arroz a uma umidade controlada) apresenta um

valor nutricional maior em relação ao arroz tão somente polido, principalmente devido à retenção de minerais e vitaminas hidrossolúveis (AMATO et al., 2002; JULIANO, 1985; NUNES et al., 1991). Ao menos teoricamente, a maior retenção de micronutrientes no arroz parboilizado tem sido atribuída à solubilização e migração para o centro do grão e pela fixação durante o processo de gelatinização do amido (AMATO et al., 2002; JULIANO, 1985; PEDERSEN et al., 1989).

Os valores de folato naturalmente presente no arroz variam entre as publicações e estão diretamente relacionados a fatores climáticos e ao solo do cultivar, ao tipo de arroz e mesmo à metodologia usada para a quantificação (HEINEMANN et al., 2005; RYCHLIK, 2004).

O concentração média de folato em arroz polido, segundo MARSHALL et al. (1994), varia de 3 a 14 $\mu\text{g}/100\text{g}$, já para KONINGS et al. (2001) o valor médio encontrado foi de 21 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Para o arroz integral, RYCHLIK (2004) de encontrou 8 a 32,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$, segundo pesquisa de RADER, WEAVER e ANGYAL (2000) o valor médio variou de 36 a 56 $\mu\text{g}/100\text{g}$, para KONINGS et al. (2001) a média encontrada foi de 5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e, finalmente, para a United States Department of Agriculture (2003), a concentração encontrada nesse arroz é de 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de produto.

O valor nutricional do arroz pode se tornar ainda menor como resultado do método usado em seu preparo para o consumo tal como os processos de lavagem e cozimento (RADER, WEAVER e ANGYAL, 2000; SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

A princípio, o arroz pode ser considerado um alimento ideal para a fortificação com o ácido fólico pois é a base da dieta de mais da metade da população mundial além de ser, quando beneficiado, uma das mais pobres fontes de folato e outras vitaminas hidrossolúveis dentre os cereais (JULIANO, 1990; MARSHALL et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 2005; MCKEVITH, 2004).

REATIVIDADE E ESTABILIDADE QUÍMICA DO ÁCIDO FÓLICO E FOLATOS

As vitaminas são compostos considerados bastante lábeis. Vários são os fatores que influenciam as perdas desses nutrientes em alimentos processados, como pH, oxigênio, luz, temperatura, concentrações de sal e açúcares, atividade de água, presença de catalisadores metálicos, agentes antioxidantes e tipo de embalagem (VARSANYI e SOMOGYI, 1983).

O ácido fólico possui considerável solubilidade em água (0,1 mg/ml à 0°C; 0,5 mg/ml à 100°C) e baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos. Já seus sais de sódio são mais solúveis (15 mg/ml à 0°C), (BÜHLER, 1988).

Sob condições anaeróbicas, o ácido fólico é estável à álcalis, no entanto, verificou-se que uma pequena porção de pterato poderia se formar, e que, sob longo período de tempo, ocorre uma abertura do anel de pirimidina formando 2-pirazina ácido carboxílico. Na presença de condições aeróbicas, a hidrólise alcalina do ácido fólico rompe a cadeia lateral da molécula formando ácido p-aminobenzoilglutâmico mais ácido pterina-6-carboxílico. A hidrólise ácida do ácido fólico na presença de oxigênio da origem à 6-metilpterina (GREGORY, 1989).

As soluções de ácido fólico são sensíveis à luz o que pode levar à fotodecomposição em ácido p-aminobenzoilglutâmico e pterina (LOWRY, BESSEY e CRAWFORD (1949). Em pesquisa envolvendo a fotodegradação pela luz ultravioleta da solução de ácido fólico sob condições aeróbicas foram encontrados indícios de que a molécula da vitamina é clivada em ácido p-aminobenzoil-L-glutâmico e 6-formil pterina quando exposta a radiação, com a continuação esta última molécula é degradada a ácido pterina-6-carboxílico (OFF et al., 2005). Essas moléculas formadas sensibilizam a fotodegradação do ácido fólico, de qualquer forma, experimentos conduzidos com água pesada indicam que a geração de oxigênio singlete provavelmente não é a explicação para a fotosensibilização da vitamina.

Estudos realizados por GREGORY (1989), mostraram que alguns fatores como oxigênio, ácido ascórbico e atividade de água parecem ter grande influência na avaliação do comportamento dos folatos. A instabilidade dos folatos expostos

ao calor, na ausência e presença da vitamina C as perdas foram mais baixas. Já o contato com o oxigênio resultou em perdas mais acentuadas. Os principais produtos das reações de oxidação do ácido fólico são mostrados na **Figura 5**.

ARCOT, SHRESTHA e GUSANOV (2002) mostraram que durante a extração do ácido fólico de alimentos fortificados a presença do ácido ascórbico no meio oferece melhor proteção contra a oxidação da vitamina.

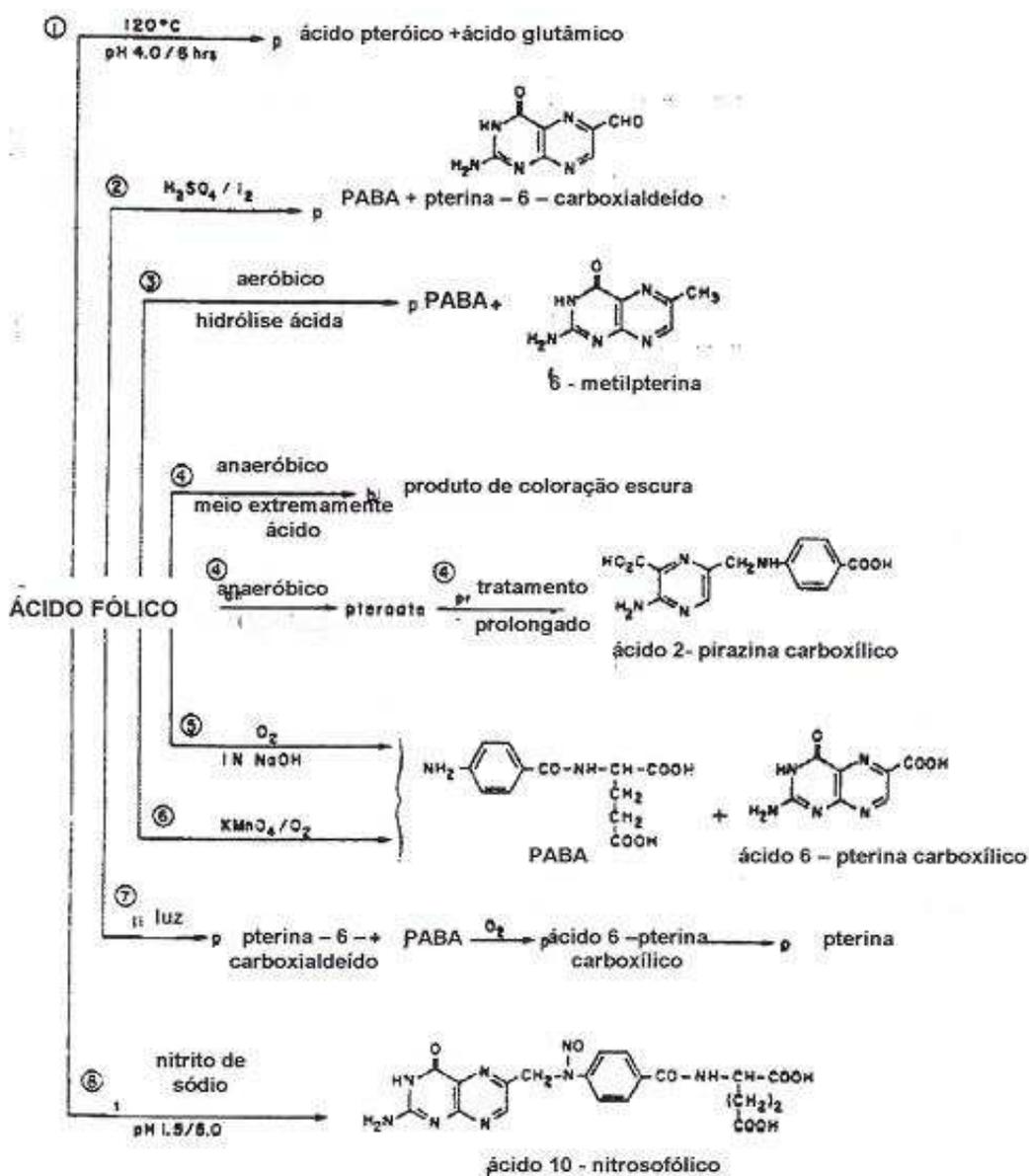


Figura 5. Produtos de oxidação do ácido fólico.

Fonte: LIMA e GODOY, 2001.

O ácido fólico presente em soluções para nutrição parenteral aparentam a mesma sensibilidade à fotodegradação, ao pH e à temperatura de armazenamento quando comparado a diversos alimentos (ALMODÓVAR et al., 1991; SMITH, CANHAM e WELLS, 1988).

NGUYEN, INDRAWATI e HENDRICKX (2003) estudaram a estabilidade do ácido fólico e do ácido 5-metiltetraidrofolico em tampão fosfato submetidos à tratamento térmico (acima de 65°C) e tratamento térmico combinado à alta pressão (acima de 800 Mpa). Percebeu-se que a estabilidade do ácido fólico submetido às duas condições foi muito maior do que a estabilidade do ácido 5-metiltetraidrofolico.

A estabilidade térmica do ácido fólico em estado sólido utilizando-se infravermelho foi alvo de trabalhos que indicam que o fragmento de ácido glutâmico é o primeiro a ser perdido, evidenciado pela perda ácida e pelo aumento de amida. A vitamina é então finalmente degradada em fragmentos de carbono (VORA et al., 2002; VORA et al., 2004).

A estabilidade do 5-metiltetraidrofolato em frutas e vegetais frescos congelados a -60°C foram avaliados durante 12 meses de armazenamento e nenhuma alteração nos níveis desse folato foi detectado nesse período (PHILLIPS et al., 2005).

Alguns dados mostram uma relativa boa estabilidade do ácido fólico, frente aos diferentes estágios do processamento de pães feitos a partir de farinha de trigo enriquecida, incluindo fermentação e assamento (OSSEY, WEHLING e ALBRECHT, 2001). Já em outro estudo o efeito do processamento de pães feitos a partir de farinhas fortificadas de centeio e trigo enriquecidos mostrou um decréscimo na quantidade de ácido fólico comparando-se ambas farinha aos pães assados. As perdas totais variaram de 12 a 21%, dependendo do processo de assamento (GUJSKA e MAJEWSKA, 2005).

No preparo de rocamboles, o processo de assamento é responsável pela perda de 20-25% do ácido fólico produzidos com farinha fortificada, no entanto,

nenhuma perda significativa na concentração do ácido fólico foi notada em 90 dias de armazenamento dos pães à 20°C (JOHANSSON et al., 2002).

Muitos autores relatam que a estabilidade dos folatos, durante o período de estocagem dos alimentos, depende principalmente da quantidade de antioxidantes e de oxigênio presentes além da exposição direta do produto à luz (FAVIER et al., 1987; FORD et al., 1969; LIMA e GODOY, 2001; VIBERG et al., 1997). Em um ensaio, onde leites esterilizados foram deixados em atmosfera inerte e estocados no escuro e na presença de luz, nenhuma redução significativa dos folatos foi notada nas amostras estocadas na ausência de luz, porém nas amostras expostas à luz houve degradação de 10% (SCOTT et al., 1984).

O uso de gomas de alginato e pectina são indicados como bons promotores da estabilidade do ácido fólico em produtos lácticos. O ácido fólico encapsulado com a mistura de alginato e pectina mostrou-se cerca de 3 vezes mais estável do que a mesma quantidade de ácido fólico livre em queijo Cheddar durante um período de 3 meses (MADZIVA, KAILASAPATHY e PHILLIPS, 2006). O efeito pode ser atribuído ao contato diminuído com a água do sistema no qual a vitamina está inserida.

LIMA e GODOY (2001) avaliaram a estabilidade do ácido fólico adicionado a leites frente ao processo ao processo de esterilização e concluíram que a vitamina é bastante estável ao processo térmico, mostrando perdas inferiores a 10%. O estudo da estabilidade durante o aquecimento doméstico, onde se realiza a fervura do leite, também apontou para a resistência da vitamina, com perdas inferiores a 1%.

Os folatos, por serem vitaminas hidrossolúveis, são sujeitos a lixiviação, principalmente durante os processos de cozimento, em adição às reação químicas de degradação (GREGORY, 1989). Alguns resultados sugerem ser a extração aquosa, e não a degradação térmica o maior responsável pelas perdas de folatos resultantes do processo de cozimento (HURDLE et al., 1968; LEICHTER et al., 1978).

DANG et al. (2000) observaram maior índice de retenção de folatos (62,1%) para legumes submetidos a cozimento sob pressão quando comparado ao

cozimento normal em água (52,6%). A diferença foi relacionada à menor exposição ao calor e ao oxigênio durante o cozimento.

No caso do arroz, a maioria dos métodos utilizados para a fortificação utilizam ácidos (BRAMALL, 1986; JOSEPH, LIUZZO e RAO, 1990; MICKUS, 1955; MISAKI e YASUMATSU, 1985) o que fazem deles métodos inapropriados para a fortificação com o ácido fólico, já que a vitamina é instável sob condições ácidas (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003). Outro fator importante para uma boa fortificação com o ácido fólico é que o método utilizado tenha a capacidade de prevenir a lixiviação da vitamina durante o processo de lavagem e mantenha a estabilidade do nutriente durante o cozimento.

Alguns estudos têm mostrado que alguns polímeros de revestimento ajudam a reter micronutrientes adicionados ao arroz fortificado durante os processos de lavagem e cozimento (CORT et al., 1976; PEIL et al., 1981; SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

A diminuição do valor nutricional do arroz durante a lavagem e o cozimento já foi bem documentada em muitas pesquisas. A lavagem do arroz polido é responsável pela perda média de 22-59% de tiamina, 11-26% de riboflavina e de 20-60% de niacina (JULIANO, 1985).

SHRESTHA, ARCOT e PATERSON (2003) relataram a perda de 73% do ácido fólico adicionado ao arroz polido fortificado sem o uso de polímeros de revestimento. Os autores, após avaliação de diversos materiais de revestimento e de combinações entre esses, concluíram que a etilcelulose proporcionou o melhor revestimento seguido pela pectina, cada qual levando a uma perda média de 2 e 9% de ácido fólico, respectivamente. A natureza relativamente hidrofóbica da etilcelulose e da pectina é responsabilizada pela baixa perda da vitamina durante a lavagem.

Durante o cozimento em excesso de água durante 20 minutos, o arroz polido fortificado com o ácido fólico sem o uso de qualquer revestimento perdeu quase a totalidade da vitamina adicionada enquanto que outros arrozes revestidos tiveram uma perda entre 61-93% para a água de cozimento. A perda pelo cozimento foi menor com o uso da etilcelulose no revestimento, provavelmente

devido à impermeabilidade do filme à água (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

Embora os derivados da metilcelulose sejam reportados como insolúveis na água quente (NISPEROS-CARRIEDO, 1994; ZECHER e GERRISH, 1999) há, durante o cozimento, uma perda maior que 70% do ácido fólico no arroz revestido com metilcelulose mais hidroxipropilmetilcelulose (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

Em estudos similares PEIL et al. (1981) observou perdas de 82, 82 e 79% de tiamina, niacina e de riboflavina, respectivamente, em arroz revestidos com metilcelulose mais hidroxipropilmetilcelulose cozidos na mesma maneira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMODÓVAR, M.J., HERNANDEZ, M.V., LEÓN-SANZ, M., ORTUÑO, B., ESTENOZ, J. Stability of folic acid and vitamin B12 in TPN. **Nutrition Hospitalaria**, 6(4): 249-253, 1991.
2. AMATO, G.W., CARVALHO, J.L.V., SILVEIRA, F.S. Em: LENZ, R. **Arroz porboiled: tecnologia limpa, produto nobre**. Porto Alegre, Brasil, 2002.
3. ANDERSON, J.L., JENSEN, K.R., CARLQUIST, J.F., BAIR, T.L., HORNE, B.D., MUHLESTEIN, J.B. Effect of folic acid fortification of food on homocysteine-related mortality. **American Journal of Medicine**, 116: 158-164, 2004.
4. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fortificação de Farinhas**. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 12/2005.
5. ARCOT, J., SHRESTHA, A.K., GUSANOV, U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. **Food Control**, 13: 245-252, 2002.
6. BOUSHEY, C.J., EDMONDS, J.W., WELSHINER, K.J. Estimates of the effects of folic acid fortification and folic acid bioavailability for women. **Nutrition**, 17: 873-879, 2001.
7. BRAMALL, L.D. A novel process for fortification of rice. **Food technology in Australia**, 38: 281-284, 1986.
8. BRILAKIS, E.S., MCCONNELL, J.P., BALLMAN, K.V., KLEE, G.G., BERGER, P.B. Lack of association between plasma homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of fortification of cereal grain flour with folic acid. **Atherosclerosis**, 165: 375-381, 2002.

9. BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. United Kingdon. Honolulu, Hawai: Academic Press Limited, 1994.
10. BROWER, I.A., VAN DUSSELDOR, M., WES, C.E., MEYBOOM, S., THOMAS, C.M., DURAN, M. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. **Journal of Nutrition**, 129: 1135-1139, 1999.
11. BROWE, I.A., VAN DUSSELDOR, M., WES, C.E., STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. **Nutrition Research Reviews**, 14(2): 267-293, 2001.
12. BÜHLER, V. **Vademecum for vitamin formulations**. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1998.
13. CASTENMILLER, J.J., VAN DE POLL, C.J., WEST, C.E., BROWER, I.A., THOMAS, C.M., VAN DUSSELDORP, M. Bioavailability of folate from processed spinach in humans. Effect of food matrix and interaction with carotenoids. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 44: 163-169, 2000.
14. CHO, S., JOHNSON, G., SONG, W.O. Folate content of foods: Comparison between databases compiled before and after new FDA fortification requirements. **Journal of Food Composition and Analysis**, 15: 293-307, 2002.
15. COLMAN, N. Prevention of folate deficiency by food fortification. **American Journal of Clinical Nutrition**, 28(5): 459-464, 1975.
16. COLMAN, N. Addition of folic acid to stable foods as a selective nutrition intervention strategy. **Nutrition Reviews**, 40: 225-233, 1982.
17. COPPEN, A., BOLANDER-GOUAILLE, C. Treatment of depression: Time to consider folic acid and vitamin B12. **Journal of Psychopharmacology**, 19(1): 59-65, 2005.
18. CORNEL, M.C., SMIT, D.J., JONG-VAN DEN BERG, L.T.W. Folic acid – the scientific debate as a base for public health policy. **Reproductive Toxicology**, 20: 411-415, 2005.
19. CORT, W.M., BORENSTEIN, B., HARLEY, J.H., OSADCA, M., SCHEINER, J. Nutrient stability of fortified cereal products. **Food Technology**, 30: 52-62, 1976.
20. COTTER, A.M., DALY, S.F. Neural tube defects: is a decreasing prevalence associated with a decrease in severity? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 119: 161-163, 2005.
21. COWARD, J.K., PARAMESWARAN, K.N., CASHMORE, A.R., BERTINO, J.R.. 7,8-Dihydropteroyl oligo-gamma-L-glutamates: Synthesis and kinetic studies with purified dihydrofolate reductase from mammalian sources. **Biochemistry**, 13: 3899-3903, 1974.
22. DALY, S., MILLS, J.L., MOLLOY, A.M., CONLEY, M., LEE Y., KIRKE, P.N., WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**, 350: 1666-69, 1997.
23. DANG, J., ARCOT, J., SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chemistry**, 68(3): 295-298, 2000.

24. DE JONG, R.J., VERWEI, M., WEST, C.E., VAN VLIET, T., SIEBELINK, E., VAN DEN BERG, H., CASTENMILLER, J.J.M. Bioavailability of folic acid from fortified pasteurized and UHT-treated milk in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, 59(8): 906-913, 2005.
25. DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 1 ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.
26. DEVLIN, A.M., LING, E.H., PEERSON, J.M., FERNANDO, S., CLARKE, R., SMITH, A.D. Glutamate carboxypeptidase II: A polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. **Human Molecular Genetics**, 9: 2837-2844, 2000.
27. EICHHOLZER, M. Micronutrient deficiencies in Switzerland: causes and consequences. **Journal of Food Engineering**, 56: 171-179, 2003.
28. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Consumo, mercado e comercialização de arroz no Brasil**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz>. Acesso em 11/2005.
29. FAO. **The state of food insecurity in the world**. Roma, Itália: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999.
30. FAOSTAT. **FAO statistical databases**. Roma, Itália. Disponível em: <http://apps.fao.org>. Acesso em 11/2005.
31. FAVIER, J.C., CHRISTIDES, J.P., POITER, G., LÉGER, J.J. Folic acid content of foods. III.. Folic acid content of different categories of milk. **Science des Aliments**, 7(1): 23-40, 1987.
32. FDA. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. **Federal Register**, 61: 8781-8791, 1996.
33. FIRTH, Y., MURTAUGH, M.A, TANGNEY, C.C. Estimation of individual intakes of folate in women of childbearing age with and without simulation of folic acid fortification. **Journal of the American Dietetic Association**, 98: 985-988, 1998.
34. FLOOD, V.M., WEBB, K.L., SMITH, W., MITCHELL, P., BANTICK, J.M., MACINTYRE, R., SINHUSAKE, D., RUBIN, G.L. Folate fortification: potential impact on folate intake in an older population. **European Journal of Clinical Nutrition**, 55(9): 793-800, 2001.
35. FOKKEMA, M.R., MEIJER, W.M., DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W., Benefits and concerns regarding folic acid fortification. **Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde**, 30(3): 218-223, 2005.
36. FORD, J.E., PORTER, J.W.G., THOMPSON, S.Y., TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J. Effects of ultra-high-temperature processing and of subsequent storage on the vitamin content in milk. **Journal of Dairy Research**, 36: 447-449, 1969.
37. FORRESTER, M.B. Folic acid calls to poison centers in Texas, 1998-2003. **Human and Experimental Toxicology**, 24(8): 423-427, 2005.
38. FRENCH, A.E., GRANT, R., WEITZMAN, S., RAY, J.G, VERMEULEN, M.J., SUNG, L., GREENBERG, M., KOREN, G. Folic acid fortification

- is associated with a decline in neuroblastoma. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, 74: 288-294, 2003.
39. GEORGE, L., MILLS, J.L., JOHANSON, A.L., NORDMARK, A. OLANDER, B., GRANATH, F. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. **JAMA**, 288: 1867-1873, 2002.
 40. GJERGJA, R., STIPOLJEV, F., HAFNER, T., TEZAK, N., LUZAR-STIFFLER, V. Knowledge and use of folic acid in croatian pregnant women – a need for health care education initiative. **Reproductive Toxicology**, 2005 (submetido).
 41. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.
 42. GREGORY, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. **Advances in Food and Nutritional Research**, 33: 1-101, 1989.
 43. GREGORY, J.F., BHANDARI, S.D., BAILEY, L.B., TOTH, J.P., BAUMGARTNER, T.G., CERDA, J.J. Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, 53: 736-740, 1991.
 44. GREGORY III, J.F. Dietary folate in a changing environment: bioavailability, fortification and requirements. **Journal of Food Science**, 69(1), 2004.
 45. GUINDLER, J., LI, Z., ZHENG, J., CORREA, A., SUN, X., WONG, L. Folic acid supplements during pregnancy and risk of miscarriage. **Lancet**, 288: 1867-1873, 2002.
 46. GUJSKA, E., MAJEWSKA, K. Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. **Plant Foods for Human Nutrition**, 60(2): 37-42, 2005.
 47. HALSTED, C.H., REISENAUER, A.M., SHANE, B., TAMURA, T. Availability of monoglutamyl and polyglutamyl folates in normal subjects and in patients with coeliac sprue. **Gut**, 19: 886-891, 1978.
 48. HAMED, S.A. NABESHIMA, T. The high atherosclerotic risk among epileptics: the atheroprotective role of multivitamins. **Journal of Pharmacological Sciences**, 98(4): 340-353, 2005.
 49. HANNON-FLETCHER, M.P., ARMSTRONG, N.C., SCOTT, J.M., PENTIEVA, K., BRADBURY, I., WARD, M., STRAIN, J.J., DUNN, A.A., MOLLOY, A.M., KERR, M.A., MCNULTY, H. Determining bioavailability of food folates in a controlled intervention study. **American Journal of Clinical Nutrition**, 80(4): 911-918, 2004.
 50. HEINEMANN, R.J.B., FAGUNDES, P.L., PINTO, E.A., PENTEADO, M.V.C., LANFER-MARQUEZ, U.M. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, 18: 287-296, 2005.
 51. HOOK, E.B. CZEIZEL, A.E. Can terathanasia explain the protective effect of folic-acid supplementation on the birth defects? **Lancet**, 350: 513-535, 1997.

52. HURDLE, A.D., BARTON, D., SEARLES, I.H.. A method for measuring folate in foods and its applications to a hospital diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, 21: 1202-1207, 1968.
53. INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington, USA: National Academic Press, 1998.
54. IRRI. **A compendium of facts and figures from the world of rice**. Disponível em: <http://www.riceweb.org>. Acesso em 11/2005.
55. IRRI. **Rice supply/utilization balances, by country and geographical region, selected years**. Tabela 17. Disponível em: <http://www.irri.org/science/ricestat/pdfs/Table%2017.pdf>. Acesso em 11/2005.
56. JACQUES, P.F., BOSTOM, A.G., WILLIAMS, R.R., ELLISON, R.C., ECKFELDT, J.H., ROSENBERG, I.H. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, 93: 7-9, 1996.
57. JACQUES, P.F., SELHUB, J., BOSTOM, A.G., WILSON, P.W.F., ROSENBERG, I.H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **New England Journal of Medicine**, 340: 1449-1454, 1999.
58. JOHANSSON, M., WITTHOFT, C.M., BRUCE, A., JÄRGERSTAD, M. Study of wheat breakfast rolls fortified with folic acid. The effect on folate status in women during a 3-month intervention. **European Journal of Nutrition**, 41: 279-286, 2002.
59. JOSEPH, E.W., LIUZZO, J.A., RAO, R.M. Development of wash and cook-proof methods for vitamin enrichment of rice grains. **Journal of Food Science**, 55: 1102-1107, 1990.
60. JOHNSON, W.G., STENROOS, E.S., SPYCHALA, J.R., CHATKUPT, S., MING, S.X., BUYSKE, S. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): A risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? **American Journal of Medical Genetics**, 124A: 339-345, 2004.
61. JULIANO, B.O. Rice properties and processing. *Food Reviews International*, 1(3): 432-445, 1985.
62. JULIANO, B.O., BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. Em: JULIANO, B.O. *Rice Chemists and Technology*. 2 ed. Miami, USA: **The American Association of Cereal Chemists**, 1985.
63. JULIANO, B.O. Rice grain quality: problems and challenges. **Cereal Foods World**, 35: 245-253, 1990.
64. KÄLLÉN, B. Use of folic acid supplementation and risk for dizygotic twinning. **Early Human Development**, 80: 143-151, 2004.
65. KALTER, H. Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. **Reproductive Toxicology**, 14: 463-476, 2000.
66. KAUWELL, G.P., WILSKY, C.E., CERDA, J.J., HERLINGER-GARCIA, K., HUTSON, A.D., THERIAQUE, D.W. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677CT) negatively influences plasma

- homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. **Metabolism**, 49: 1440-1443, 2000.
67. KIM, Y.I. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? **American Journal of Clinical Nutrition**, 80: 1123-1128, 2004.
 68. KOMAROMY-HILLER, G. Folic Acid fortification. **Lancet**, 354: 2167-2168, 1999.
 69. KONINGS, E.J.M., ROOMANS, H.H.S., DORANT, E., GOLDBOHN, R.A. SARIS, W.H.M. Folate intake of the dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73: 765-776, 2001.
 70. LAWRENCE, J.M., WATKINS, M.L., ERSHOFF, D., PETITTI, D., CHIU, V., ERICKSON, D. Design and evaluation of interventions promoting periconceptional multivitamin use. **American Journal of Preventive Medicine**, 25(1): 17-24, 2003.
 71. LEICHTER, J., SWITZER, V.P., LANDYMORE, A.F. Effect of cooking on folate content of vegetables. **Nutr. Rep. Int.**, 18(4): 475-482, 1978.
 72. LEWIS, C.J., CRANE, N.T., WILSON, D.B., YETLEY, E.A. Estimated folate intakes: Data updated to reflect food fortification, increased bioavailability, and dietary supplement use. **American Journal of Clinical Nutrition**, 70(2): 198-207, 1999.
 73. LIMA, J.A., GODOY, H.T. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 93p., 2001.
 74. LOWRY, O.H., BESSEY, O.A., RAWFORD, E.J. Photolytic and enzymatic transformations of pteroylglutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, 180(1): 389, 1949.
 75. MADZIVA, H., KAILASAPATHY, K., PHILLIPS, M. Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. **Food Science and Technology**, 39(2): 146-151, 2006.
 76. MARTÍNEZ, A.B., BERRUEGO, G.R., CAVA, M.J.B., GRACIÁ, C.M., CASTÓN, M.J.P. Folate and folic acid intake estimation and food enrichment requirements. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 55(1): 5-14, 2005.
 77. MARSHAL, W.E., WADSWORTH, J.I. **Rice science and technology**. New York, USA: Marcel Dekker, 1994.
 78. MCCARTHY, M. On the balance, folic acid fortification benefits elderly. **Lancet**, 349: 35, 1997.
 79. MCNULTY, H., PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proceedings of the Nutrition Society**, 63(4): 529-536, 2004.
 80. MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. **Nutrition Bulletin**, 29(2): 111-142, 2004.
 81. MELSE-BOONSTRA, A., WEST, C.E., KATAN, M.B., KOK, F.J., VERHOEF, P. Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in health adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79: 424-429, 2004.
 82. MICKUS, R.R. Seal enriching additives on white rice. **Food Engineering**, 27: 91-160, 1955.

83. MISAKI, M., YASUMATSU, K. Rice fortification and enrichment. **The American Association of Cereal Chemists**, 38: 289-402, 1985.
84. MUSKIET, F.A.J. The importance of early folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 20(3): 403-410, 2005
85. NEUHOUSER, M.L., BERESFORD, S. Folic acid: are current fortification levels adequate? **Nutrition**, 17: 868-872, 2001.
86. NGUYEN, M., INDRAWATI, T., HENDRICKX, M. Model studies on the stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(11): 3352-3357, 2003.
87. NISPEROS-CARRIEDO, M.O. Edible coatings and films based on polysaccharides. Em: KROCHTER, J.M., BALDWIN, E.A., NISPEROS-CARRIEDO, M.O. **Edible films to improve food quality**. Lancaster, USA: Technologic Publishing, 1994.
88. NUNES, G.S., GOMES, J.C., CRUZ, R., JORDAO, C.P. Enriquecimento mineral do arroz por tratamentos hidrotérmicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 34: 571-582, 1984.
89. OAKLEY, G.P.J. Doubling the number of women consuming vitamin supplement pills containing folic acid: an urgently needed birth defect prevention complement to the folic acid fortification of cereal grains. **Reproductive Toxicology**, 11(4): 579-581, 1997.
90. OFF, M.K., STEINDAL, A.E., POROJNICU, A.C., JUZENIENE, A., VOROBAY, A., JOHNSON, A. MOAN, J. Ultraviolet photodegradation of folic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 80(1), 47-55, 2005.
91. OSSEY, E.S., WEHLING, R.L., ALBRECHT, J.A. HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chemistry**, 78(4): 375-378, 2001.
92. PEDERSEN, B., KNUDSEN, K.E., EGGUM, B.O. Nutritional values of cereal products with emphasis on the effect of milling. **World Review of Nutrition and Dietetics**, 60: 1-91, 1989.
93. PEIL, A., BARRET, F., RHA, C., LANGER, R. Retention of micronutrients by polymer coatings used to fortify rice. **Journal of Food Science**, 47: 260-262, 1981.
94. PFEIFFER, C.M., ROGERS, L.M., BAILEY, L.B., GREGORY, J.F. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined using a dual-label stable-isotope protocol. **American Journal of Clinical Nutrition**, 47: 183-189, 1997.
95. PHILLIPS, K.M., WUNDERLICH, K.M., HOLDEN, J.M., EXLER, J., GEBHARDT, S.E. Stability of 5-methyltetrahydrofolate in frozen fresh fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 92(4): 587-595, 2005.
96. PINTÓ, X., VILASECA, M.A., BALCELLS, S., ARTUCH, R., CORBELLA, E., MECO, J.F., VILA, R., PUJOL, R., GRINBERG, D. Folate-rich diet is as effective as folic acid from supplements in decreasing plasma

- homocysteine concentrations. **International Journal of Medical Sciences**, 2(2): 58-63, 2005.
97. PULIKKUNNEL, S.T., THOMAS, S.V. Neural tube defects: pathogenesis and folate metabolism. **Journal of Association of Physicians of India**, 53: 127-135, 2005.
 98. RADER, J.I., WEAVER, C.M., ANGYAL, G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. **Food Chemistry**, 70: 275-289, 2000.
 99. RAY, J.G., COLE, D.E.C., BOSS, S.C. An ontario-wide study of vitamin B12, serum folate, and red cell folate levels in relation to plasma homocysteine: is a preventable public health issue on the rise? **Clinical Biochemistry**, 33(5): 337-343, 2000.
 100. RAY, J.G., LANGMAN, L.J., MAMDANI, M.M., COLE, D.E.C. Absence of effect of folic acid flour fortification on anticonvulsant drug levels. **The American Journal of Medicine**, 18(4): 444-445, 2005.
 101. RAY, J.G., MEIER, C., VERMEULEN, M.J., BOSS, S., WYATT, P., COLE, D.E.C. Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. **Lancet**, 360: 2047-2048, 2002.
 102. RAY, J.G., SINGH, G., BURROWS, R.F. Evidence for suboptimal use of periconceptional folic acid supplements globally. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, 111(5): 399-408, 2004.
 103. REYNOLDS, E.H. Mental effects of anticonvulsivants and folic acid metabolism. **Brain**, 91: 197-214, 1968.
 104. RYCHLIK, M. Revised folate content of foods determined by stable isotope dilution assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17: 475-483, 2004.
 105. ROSENBERG, I.H. Absorption and malabsorption of folates. **Clinical Haematology**, 5: 589-618, 1976.
 106. ROTHENBERG, S.P., DA COSTA, M.P., SEQUEIRA, J.M., CRACCO, J., ROBERTS, J.L., WEEDON, J. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by neural-tube defect. **New England Journal of Medicine**, 350: 134-142, 2004.
 107. RUSSEL, R.M. KRASINSKI, S.D., SAMLOFF, I.M., JACOB, R.A., HARTZ, S.C., BROVENDER, S.R. Folic acid malabsorption in atrophic gastritis. **Gastroenterology**, 91: 1476-1482, 1986.
 108. SAUBERLICH, H.E., KRETSCH, M.J., SKALA, J.H., JOHNSON, H.L., TAYLOR, P.C. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. **American Journal or Clinical Nutrition**, 46: 1016-1028, 1987.
 109. SCOTT, K.J., BISHOP, D.R., ZECHALCO, A., EDWARDS-WEBB, J.D. Nutrient content of liquid milk. II. Content of vitamin C, riboflavin, folic acid, thiamin, vitamins B12 and B6 in pasteurized milk as delivered to the home and after storage in the domestic refrigerator. **Journal of Dairy Research**, 51(1): 51-54, 1984.

110. SEYOUM, E., SELHUB, J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. **Journal of Nutrition**, 128: 1956-1960, 1998.
111. SHAW, G.M., CARMICHAEL, S.L., NELSON V., SELVIN S., SCHAFFER D.M., Food fortification with folic acid and twinning among californian infants. **American Journal of Medical Genetics**, 119(A): 137-140, 2003.
112. SHELNUTT, K.P., KAUWELL, G.P., CHAPMAN, C.M., GREGORY, J.F., MANEVAL, D.R., BROWDY, A.A. Folate status response to controlled folate intake is affected by the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-> T polymorphism in young women. **Journal of Nutrition**, 133: 4107-4111.
113. SHRESTHA, A.K., ARCOT, J., PATERSON, J.L. Edible coating materials – their properties and use in the fortification of rie with folic acid. **Food Research International**, 36: 921-928, 2003.
114. SMULDERS, Y.M., STEHOUWER, C.D.A. Folate metabolism and cardiovascular disease. **Seminars in Vascular Medicine**, 5(2): 87-97, 2005.
115. SMITH, J.L., CANHAM, J.E., WELLS, P.A. Effect of phototherapy light, sodium bisulfite and pH on vitamin stability in total parenteral nutrition admixtures. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 12(4): 394-402, 1988.
116. STANGER, O. Physiology of folic acid in health and disease. **Current Drug Metabolism**, 3(2): 211-223, 2002.
117. STEINBERG, S.E., CAMPBELL, C.L., HILMAN, R.S. Kinetics of the normal folate enterohepatic cycle. **Journal of Clinical Investigation**, 64: 83-88, 1979.
118. TAGUCHI, H., KOBAYASHI, M., YOSHINO, N., HOSOKAWA, K. Do japanese take more folate from traditional japanese dish than is conventionally estimated? Actual folate contents in hospital diets and marketed lunch boxes. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 5(4): 374-378, 2004.
119. TAMURA, T; STOKSTAD, E.L. The availability of food folate ein man. **Britain Journal of Haematology**, 25: 513-532, 1973.
120. TSENG, M., HERNÁNDEZ, T. Comparison of Intakes of US chinese women based on food frequency and 24-hour recall data. **Journal of the American Dietetic Association**, 105: 1145-1148, 2005.
121. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic>. Acesso em 11/2005.
122. UNITED STATES INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine**. Washington, D.C: National Academic Press, 196-305, 1998.
123. VAN HET HOF, K.H., TIJBURG, L.B., PETRZIK, K., WESTSTRATE, J.A. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. **British Journal of Nutrition**, 82: 203-212, 1999.

124. VARSANYI, I., SMOGYI, L. Determination of the shelf life of food products. **Acta Alimentaria**, 12(2): 73-100, 1983.
125. VERWEI, M., VAN DEN BERG, H., HAVENAAR, R., GROTEN, J.P. Effect of folate-binding protein on intestinal transport of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate across Caco-2 cells. **European Journal of Nutrition**, 44(4): 242-249, 2005.
126. VIBERG, U., JÄGERSTAD, M., ÖSTE, R., SJÖHOLM, I. Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen. **Food Chemistry**, 59(3): 381-386, 1997.
127. VILLA, P., PERRI, C., SURIANO, R., CUCINELLI, F., PANUNZI, S., RANIERI, M., MELE, C., LANZONE, A. L-folic acid supplementation in healthy postmenopausal women: Effect on homocysteine and glycolipid metabolism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 90(8): 4622-4629, 2005.
128. VORA, A., RIGA, A., DOLLIMORE, D., ALEXANDER, K.S. Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, 302-393: 209-220, 2002.
129. VORA, A., RIGA, A., DOLLIMORE, D., ALEXANDER, K. Thermal stability of folic acid in the solid-state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 75(3): 709-717, 2004.
130. ZECHER, D., GERRISH, T. Cellulose derivatives. Em: IMESON, A. **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd., 2000.
131. ZITTOUN, J. Congenital errors of folate metabolism. **Baillieres Clinics in Haematology**, 8: 603-616, 1995.
132. WALD, N.J., LAW, M.R., MORRIS, J.K., WALD, D.S. Quantifying the effect of folic acid. **Lancet**, 358: 2069-2073, 2001.
133. WALLER, D.K., TITA, T.N., ANNEGERS, J.F. Rates of twinning before and after fortification of foods in the US with folic acid, Texas, 1996-1998. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, 17: 378-383, 2003.
134. WILLEMS, F.F., BOERS, G.H.J, BLOM, H.J., AENGEVAEREN, W.R.M., VERBEUGT, F.W.A. Pharmacokinetic study on the utilisation of 5-methyltetrahydrofolate and folic acid in patients with coronary artery disease. **British Journal of Pharmacology**, 141(5): 825-830, 2004.
135. WILLIS, F.B., GRAFF-RADFORD, N., LUCAS, J., PARFITT, F. Effect of folic acid fortification on serum folate levels in african american elderly. Poster Session: **Epidemiology and Risk Factors of Alzheimer's Disease**, P3: 391-392, 2000.
136. WRIGHT, A.J.A., FINGLAS P.M., SOUTHON, S. Proposed mandatory fortification of the UK diet with foli acid: have potential risks been underestimated? **Trends of Food Science and Technology**, 12: 313-321, 2001.
137. WRIGHT, A.J.A., FINGLAS, P.M. Differential kinetic behavior and distribution of pteroylglutamic acid and reduced folates. **Journal of Nutrition**, 135: 619-623, 2005.

Artigo a ser submetido à publicação na Revista da SBCTA

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO EM ARROZ ENRIQUECIDO

CREPALDI, P.F. e GODOY, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Departamento de Ciência de Alimentos
C.P. 6121 CEP 13083-970
crepaldi_bauru@yahoo.com.br

RESUMO

Nos últimos anos, o interesse na fortificação alimentar com o ácido fólico tem crescido, em resposta principalmente aos achados de estudos epidemiológicos que relacionam a deficiência de folatos a defeitos no tubo neural, doença coronariana e anemia megaloblástica, entre outros. A fortificação com o ácido fólico em um ou mais itens mais comumente consumidos na dieta é hoje considerado o melhor método para garantir o aumento no consumo da vitamina. A maioria dos países desenvolvidos e o Brasil praticam a fortificação com o ácido fólico voluntariamente ou através do uso de leis. O arroz é considerado um alimento ideal para a fortificação por ser a base da dieta de mais da metade da população mundial além de ser uma das mais pobres fontes de folatos. Para se garantir a qualidade, para propósitos legais ou mesmo para se conhecer a estabilidade da vitamina sob as condições de estocagem e processamento do alimento, o uso de um método analítico rápido e confiável é necessário já que os métodos existentes são complexos ou não são específicos à matriz. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método por CLAE para a quantificação do ácido fólico em arroz enriquecido cru polido, integral e em suas águas de lavagem. Para o arroz polido e arroz integral, o ácido fólico foi extraído de 1g da amostra com 3,0mL de solução de hidróxido de potássio 0,1mol/L e 3,0mL de acetonitrila em banho ultrassônico por 10 minutos, seguida por etapa de limpeza com 3,5mL de tampão fosfato 0,1mol/L e 500μL de ácido tricloroacético

concentrado. Os mesmos procedimentos foram tomados para a extração do ácido fólico contidos em 2mL das águas de lavagem, tanto do arroz polido quanto do arroz integral. No processo cromatográfico para o arroz e sua água de lavagem utilizou-se coluna C₁₈ e solução acidificada com ácido acético/acetonitrila (95:5) (v/v) como fase móvel no início do processo, chegando a razão 80:20 em 20 minutos de corrida. No processo cromatográfico para o arroz integral e sua água de lavagem utilizou-se coluna C₁₈ e solução acidificada com ácido acético /acetonitrila (95:5) (v/v) como fase móvel no início do processo, chegando a razão 76:24 em 20 minutos de corrida. O tempo de acondicionamento da coluna foi de 10 minutos tanto para o arroz integral como para arroz branco e suas respectivas águas de lavagem. A detecção foi feita espectrofotometricamente em detector UV a 290nm e a quantificação por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente com taxas de recuperação entre 92 e 101%, boa repetibilidade e limites de detecção e quantificação de 0,1µg/g e 0,2µg/g para ambos os tipos de arroz e 0,06µg/ml e 0,12µg/ml para as águas de lavagem.

SUMMARY

In recent years, interest in the fortification of foods with folic acid has increased, largely in response to the findings of epidemiological studies that link folate with neural tube defects, coronary heart disease and megaloblastic anemia. Fortification of folic acid in the one or more of the commonly consumed dietary items is now regarded as the best method to ensure increasing in the folate intake. Most of the developed countries and Brazil practice mandatory or voluntary fortification with folic acid. Rice is an ideal food for micronutrient fortification because it is a staple diet for more than half of the world's population besides it is one of the poorest sources of folate. For quality assurance, regulatory purposes or simply to know the stability of the vitamin under food's storing and processing conditions, rapid and reliable methods are needed since the existing methods for measuring folates in foods are complex and not specific at matrix variations. The goal of this work was to develop a HPLC method for measuring added folic acid in

raw fortified brown and milled rice and their wash-water. For raw brown and milled rice, the folic acid was extracted from 1g sample using 3,0mL potassium hydroxide (0,1mol/L) and 3,0mL acetonitrile with ultrasonic vibration, followed by a clean-up step with 3,5mL of phosphate buffer (0,1mol/L) and 500 μ L of trichloroacetic acid. The same proceedings were used to extract the folic acid from 2mL brown and milled rice wash-water. In the milled rice and its wash-water chromatographic process a C₁₈ column was used with a mobile-phase of acetate buffer/acetonitrile (95:5) (v/v), changing to acetate buffer and acetonitrile (80:20) (v/v) after 20 minutes of run. In the brown rice and its wash-water chromatographic process a C₁₈ column was used with a mobile-phase of acetate buffer/acetonitrile (95:5) (v/v), changing to acetate buffer and acetonitrile (76:24) (v/v) after 20 minutes of run. The column re-equilibration time for all samples was 10 minutes. Detection was obtained using an UV detector (290nm) and quantified using external standards. The method was efficient with recuperation rate between 92 and 101% and nice repeatability. The limits of detection and quantification being 0,1 μ g/g and 0,2 μ g/g for both kinds of rice, and 0,06 μ g/ml and 0,12 μ g/ml for their wash-water.

INTRODUÇÃO

Folatos ou ácido fólico são os termos mais comumente usados para se referir a uma família de vitaminas com relacionadas atividades biológicas. Nos últimos anos, o interesse na fortificação de alimentos com o ácido fólico tem aumentado, principalmente em resposta aos achados de estudos epidemiológicos que ligam a ingestão insuficiente de folatos a defeitos do tubo neural, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, certos tipos de câncer e anemia megaloblástica (FOKKEMA et al., 2005; KALTER, 2001; MUSKIET, 2005; SMULDERS e STEHOUWER, 2005).

A fortificação com o ácido fólico em um ou mais itens comumente consumidos na dieta populacional é hoje considerado o melhor método para garantir que as mulheres aumentem sua ingestão de folatos a fim de reduzir o risco de terem uma gravidez responsável por defeitos no tubo neural do feto.

A United States Food and Drug Administration (FDA – EUA) regulamentou, de forma mandatária, para todos os fabricantes de produtos cereais do país a adição do ácido fólico para o enriquecimento de seus produtos a partir de janeiro de 1998. O índice geral de enriquecimento dado pelo FDA é de 100 a 300 µg por 100g para todos os tipos de produtos cereais (FDA, 1996). Hoje, a maioria dos países desenvolvidos já praticam a fortificação de seus produtos com o ácido fólico, seja de forma voluntária ou através de publicações legais (EICHHOLZER, 2001).

No Brasil, os altos índices de anemia e de doenças causadas pela deficiência de ácido fólico na população brasileira levaram o Ministério da Saúde e a Anvisa, através da publicação da Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, a partir de junho de 2004. Cada 100g de farinha de trigo e de milho deve conter 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (ANVISA, 2005). A tendência atual é a extensão dessa regulamentação à outros produtos cereais de grande consumo, a exemplo do que ocorre em outros países.

Diversos fatores tornam o arroz um alimento ideal para a fortificação com o ácido fólico. O cereal é a base da dieta de mais da metade da população mundial (JULIANO, 1990) e uma das mais pobres fontes de folato e outras vitaminas hidrossolúveis. A concentração média de folato em arroz varia muito nas publicações da área, fenômeno que pode ser relacionado ao tipo de análise empregada, variedade da espécie e fatores ambientais e de cultivo (HEINEMANN et al., 2005; RYCHLIK, 2004).

O brasileiro destina cerca de 22% do seu orçamento em alimentação, sendo o arroz ainda o principal produto da cesta básica. O consumo médio de arroz no Brasil varia de 74 a 76 Kg/habitante/ano, tomando-se por base o grão em casca (EMBRAPA, 2005).

No país, o arroz é mais consumido na forma polida, mas tem sido observado um aumento na demanda pelo arroz integral e pelas suas formas enriquecidas, com o ácido fólico e outras vitaminas hidrossolúveis, e de valor

agregado devido à reputação de excelência nutricional e mesmo devido aos apelos de “marketing” (HEINEMANN et al., 2005).

Visto o aumento no número de alimentos fortificados disponíveis no mercado e sua importância na saúde da população em geral, torna-se necessário o desenvolvimento de um método confiável, rápido e barato que permita quantificar o ácido fólico nos cereais, e em especial no arroz.

O desenvolvimento de uma metodologia analítica específica para o arroz é de grande interesse para a garantia da qualidade do produto e para propósitos legais, permitiria conhecer a correta quantidade de ácido fólico adicionado ao arroz e seria arma útil em fiscalizações sanitárias. Os métodos existentes para a quantificação de folatos em alimentos são desenhados para mensurar não apenas o ácido fólico adicionado, mas também os folatos nativos presentes.

Os folatos nos alimentos são tradicionalmente quantificados através de ensaio microbiológico usando o *Lactobacillus casei*. No entanto, o ensaio microbiológico é lento, monótono e requer considerável experiência analítica, o que faz deste um método inapropriado para análises laboratoriais de rotina. Além disso, o método permite apenas a quantificação total dos folatos presentes na matriz indistintamente de suas formas químicas, naturais ou sintética (OSSEYI, WEHLING e ALBRECHT, 1998).

Novos métodos que envolvem procedimentos bio-específicos como: ensaio por ligação a proteína enzimática (EPBA), ensaio por enzima ligada a fase imune (ELISA) e radioensaios têm algumas vantagens sobre o ensaio microbiológico. São, comparativamente, mais rápidos e menos sujeitos a variações (OSSEYI, WEHLING e ALBRECHT, 1998). No entanto, o radioensaio é mais utilizado em análises sanguíneas, já sua aplicação nas análises de alimentos é limitada. Os métodos por EPBA e ELISA são ainda técnicas novas, necessitam de certos conhecimentos do analista além de serem, em geral, mais caros que os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os métodos por CLAE têm a capacidade de separar e quantificar diferentes formas de folatos e o ácido fólico, é considerado um método relativamente mais

simples, acessível, confiável e que apresenta ótima reprodutibilidade (CATHARINO e GODOY, 2000).

Alguns métodos cromatográficos foram reportados como sendo capazes de promover a separação e a quantificação do ácido fólico e folatos em alimentos, como resumido por HAWKES e VILLOTA (1989). Recentes métodos publicados, como os de MÜLLER (1993), VAHTERISTO et al. (1997), e de PFEIFFER (1997) parecem funcionar bem na quantificação de baixos níveis de folatos nativos e de ácido fólico em alimentos. No entanto, toda a complexidade que envolve os métodos, incluindo extrações multi-enzimáticas, limpeza extensiva da amostra e concentração do extrato usando colunas de troca-iônica ou por afinidade, fazem desses, métodos questionáveis no uso por laboratórios de controle de qualidade.

A metodologia desenvolvida e validada por CATHARINO e GODOY (2000) para a determinação de ácido fólico em cereais, embora pareça ser bastante promissora, mostrou-se inapropriada para a determinação da vitamina em arroz enriquecido em ensaios preliminares.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método por CLAE confiável, simples e rápido que permita a identificação e quantificação do ácido fólico em arroz enriquecido tipo 1 polido e integral.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Arroz Tipo 1 Polido e Integral

Um lote de arroz tipo 1 polido e outro de arroz integral não enriquecidos foram adquiridos em supermercados da cidade de Campinas-SP, oriundos de um mesmo fabricante. Cada lote foi composto por 2 embalagens de 500g as quais foram analisadas previamente a fim de se comprovar a ausência de ácido fólico e interferentes.

O enriquecimento de cada lote foi realizado em uma única etapa, assim, o conteúdo das duas embalagens de cada tipo de arroz foi homogeneizado com o ácido fólico durante um período de 2 horas, em homogeneizador automático.

A água de lavagem foi obtida através da lavagem de 1 xícara do arroz (190g e 210g, respectivamente para arroz polido e integral) com uma porção de 500 ml de água potável.

REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi adquirido da SIGMA (cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico foi obtido da Synth. 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 FHLP 1300), com poros de 0,45µm de diâmetro e posteriormente desgaseificadas em ultrassom.

EQUIPAMENTO

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido VARIAN série 9060, com alça de amostragem de 10µL de capacidade, bomba ternária equipado com sistema de detecção por UV. A coluna Microsorb-MV (C₁₈ ODS-2, 12X4,6mm, 5µm) produzida pela Rainin LC e comercializada pela VARIAN-USA foi utilizada para o processo cromatográfico.

MÉTODO

Arroz Tipo 1 Polido

Para a análise do ácido fólico em Arroz Tipo 1 Polido, partiu-se da metodologia desenvolvida por CATHARINO e GODOY (2000), validada para produtos lácteos e cereais. No entanto, de acordo com testes preliminares, a metodologia de extração teve de ser modificada assim como as condições cromatográficas.

O ácido fólico foi extraído de 1,0g de arroz, previamente homogeneizado e pulverizado em moinho de martelo, com 3,0mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e 3,0mL de acetonitrila por 10 minutos em banho ultra-sônico. Ao extrato foram adicionados 3,5ml de tampão fosfato e 500µL de ácido tricloroacético. A partir de então, seguiram-se as etapas de filtração, a primeira em papel filtro comum e a segunda em membranas MILLIPORE (FHLP 1300), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado no cromatógrafo a líquido (10µL). O mesmo procedimento foi realizado para a extração do ácido fólico contido na água de lavagem. A suspensão foi vigorosamente agitada e tomados 2mL como amostragem para cada análise realizada.

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min, com 95% de fase móvel aquosa (FMa), composta por 20mL de ácido acético glacial (20%) e 700µL de hidróxido de potássio 50% (o volume foi aferido com água MILLI-Q a 1L em balão volumétrico) e 5% de fase móvel orgânica (acetonitrila) no início da corrida, chegando aos 20 minutos a 80% de FMa e 20% de acetonitrila. As condições cromatográficas iniciais foram retomadas gradativamente até os 25 minutos, mantendo-se essa proporção até os 30 minutos, tempo necessário ao reequilíbrio da coluna cromatográfica. A detecção foi feita em detector de ultra-violeta (UV), 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, por co-cromatografia e comparação com o espectro de absorção obtido no detector de arranjo de diodos. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, através de curva analítica construída com 5 níveis de concentração (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

Arroz Integral

Para a análise de ácido fólico no Arroz Integral e em sua água de lavagem, as metodologias de extração foram as mesmas descritas anteriormente para Arroz Tipo 1 Polido e sua água de lavagem.

Quanto às condições cromatográficas, o ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min iniciando-se a corrida com 95% de FMa e 5% de acetonitrila, chegando aos 20 minutos em 76% de FMa e 24% de acetonitrila. As condições cromatográficas iniciais foram retomadas gradativamente até os 25 minutos, mantendo-se essa proporção até os 30 minutos, tempo necessário ao reequilíbrio da coluna cromatográfica. A detecção, identificação e quantificação foram realizadas seguindo o mesmo procedimento citado anteriormente para o arroz polido.

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se testes de recuperação do padrão de ácido fólico adicionado aos produtos não enriquecidos, em dois níveis diferentes de concentração 3,0 e 0,8µg/g, 1,3 e 0,3µg/mL, para arroz polido e integral e suas águas de lavagem, respectivamente. Esses valores foram escolhidos de acordo com a faixa geral de enriquecimento fornecida pelo FDA, que é de 100 a 300µg por 100g de todos os tipos de produtos cereais (FDA, 1996) e pelos níveis de perda média da vitamina encontrados em testes preliminares e na literatura.

Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de cinco determinações, em duplicata, nos níveis de concentração de ácido fólico adicionado às matrizes. A repetibilidade foi calculada de acordo com CALCUTT e BRODY (1983) através da equação:

$$r = t \sqrt{2} \cdot sr$$

r = 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 produzirá um sinal com uma amplitude três vezes maior que a do ruído. O limite de quantificação será considerado como sendo duas vezes o limite de detecção (AGOSTINI, 1996; FERREIRA, MARQUES e FERREIRA, 2000; KAYALI-SAYADI et al., 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da metodologia

As taxas de recuperação obtidas para o arroz tipo I polido, arroz integral de suas respectivas águas de lavagem estão apresentadas na **Tabela 1**. Os valores variaram entre 92 e 101% nos dois níveis de enriquecimento. As taxas de recuperação obtidas nesse trabalho foram ligeiramente superiores às alcançadas por KONINGS (1999) e OSSEYI et al. (1998) que obtiveram, respectivamente, níveis de recuperação de ácido fólico de 90 e 93% para cereais, incluindo arroz. As taxas de recuperação obtidas neste trabalho foram semelhantes às encontradas por LIMA e GODOY (2001) em margarina, farinha e pão, cujos valores variaram entre 92 e 98%. Esses valores indicam que o método permitiu uma ótima recuperação para níveis da vitamina encontrados nos dois tipos de arroz e em suas águas de lavagem.

Tabela 1. Taxas de recuperação do ácido fólico em dois níveis de concentração.

Categoria	Nível I	Recuperação (%)	Nível II (µg/g)	Recuperação (%)
Arroz Tipo I Polido	3.0 (µg/g)	99 ± 0,7	0.8 (µg/g)	95 ± 1,9
Arroz Integral	3.0 (µg/g)	101 ± 0,6	0.8 (µg/g)	92 ± 1,2
Água (Tipo I Polido)	1.3 (µg/ml)	92 ± 3,5	0.3 (µg/ml)	97 ± 19,4
Água (Integral)	1.3 (µg/ml)	97 ± 4,8	0.3 (µg/ml)	94 ± 10

Resultados obtidos pelas médias de 10 determinações simples.

A **Tabela 2** apresenta as faixas de repetibilidade entre 10 determinações de ácido fólico para os dois tipos de arroz analisados, em dois níveis diferentes de concentração. Assim, é esperado que os valores encontrados nas determinações possam diferir entre si dentro dos limites dados pela repetibilidade, a um nível de confiança de 0,025 (95%).

Tabela 2. Repetibilidade dos valores de concentração do ácido fólico adicionado em dois níveis aos dois tipos de arroz.

Categoria	Nível I (µg/g)	Repetibilidade (r)	Nível II (µg/g)	Repetibilidade (r)
Arroz Tipo I Polido	2,98	0,45	0,75	0,32
	2,99		0,77	
	3,01		0,74	
	3,01		0,76	
	3,03		0,77	
	2,99		0,79	
	2,97		0,78	
	2,96		0,78	
	3,01		0,76	
	2,99		0,77	
Média +/- DP	2,99 ± 0,02		0,77 ± 0,01	
CV (%)	0,7		1,3	
Arroz Integral	3,01	0,45	0,74	0,32
	3,02		0,73	
	3,02		0,72	
	3,03		0,73	
	3,05		0,75	
	3,05		0,74	
	3,04		0,72	
	3,06		0,74	
	3,01		0,76	
	3,01		0,73	
Média +/- DP	3,03 ± 0,02		0,74 ± 0,01	
CV (%)	0,7		1,4	

M ± DP – média aritmética e estimativa de desvio padrão das determinação.

CV – coeficiente de variação.

Limite de confiança de 95% (t de Student = 2,262).

As faixas de repetibilidade para as águas de lavagem de ambos os tipos de arroz são expressas na **Tabela 3**.

Observa-se que, tanto para o arroz como para as águas de lavagem, a maior diferença entre os valores obtidos entre as 10 determinações, nos dois níveis de enriquecimento, são menores que o valor de “r” calculado a partir da equação de CALCUTT e BRODY (1983). Esses índices comprovam a boa repetibilidade do método aplicado a essas matrizes.

Tabela 3. Repetibilidade dos valores de concentração do ácido fólico adicionado em dois níveis às águas de lavagem.

Categoria	Nível I (µg/ml)	Repetibilidade (r)	Nível II (µg/ml)	Repetibilidade (r)
Água (Tipo I Polido)	1,12	0,72	0,32	0,78
	1,18		0,26	
	1,22		0,34	
	1,15		0,21	
	1,24		0,22	
	1,24		0,36	
	1,19		0,38	
	1,24		0,28	
	1,26		0,31	
	1,18		0,25	
Média +/- DP	1,20 ± 0,05		0,29 ± 0,06	
CV (%)	4,1		20,7	
Água (Integral)	1,24	0,78	0,26	0,55
	1,35		0,24	
	1,33		0,26	
	1,18		0,32	
	1,24		0,24	
	1,28		0,26	
	1,32		0,31	
	1,24		0,33	
	1,18		0,31	
	1,33		0,28	
Média +/- DP	1,27 ± 0,06		0,28 ± 0,03	
CV (%)	4,7		10,7	

M ± DP – média aritmética e estimativa de desvio padrão das determinação.

CV – coeficiente de variação.

Limite de confiança de 95% (t de Student = 2,262).

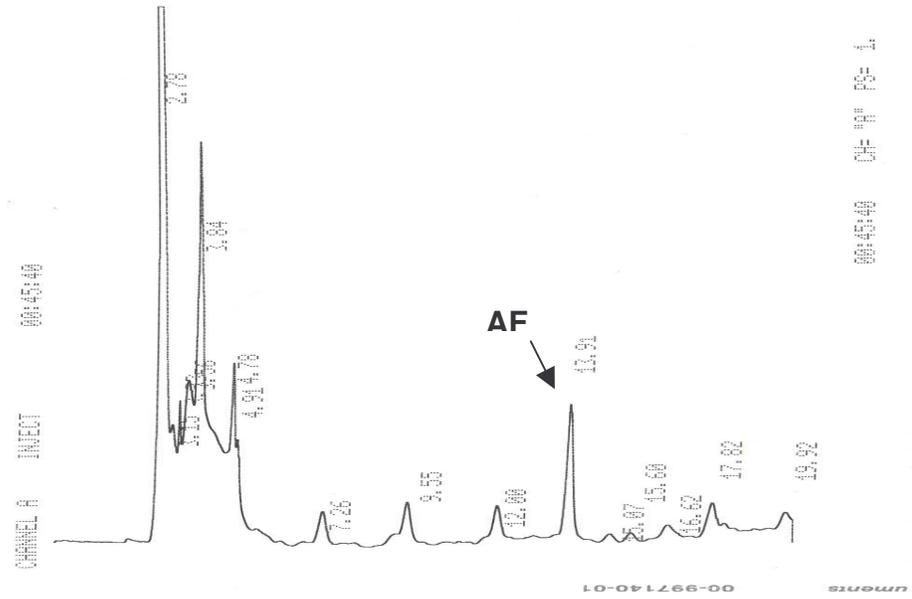
Os limites de detecção para as amostras de arroz tipo I polido e para arroz integral foram praticamente os mesmos, correspondendo a 0,1µg/g, sendo considerado o limite de quantificação a concentração de 0,2µg/g do produto.

Para as águas de lavagem de ambos os tipos de arroz, os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 0,06µg/ml e 0,12µg/ml.

Os cromatogramas referentes às amostras de arroz tipo I polido e arroz integral estão dispostos na **Figura 1**. Já os cromatogramas das águas de lavagem de ambos os produtos são mostrados na **Figura 2**. Neles, o pico do ácido fólico (AF) aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 17 minutos para arroz tipo I polido e de 15 minutos para arroz integral. A pureza dos picos foi avaliada através da comparação entre os tempos de retenção do padrão e da amostra, além da realização de co-cromatografia o que confirmou a eficiência do sistema cromatográfico.

Os teores de ácido fólico foram avaliados por padronização externa, tendo as curvas analíticas apresentado boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas. O coeficiente de correlação obtido para o método utilizado para identificar e quantificar o ácido fólico em arroz tipo I polido e em sua água de lavagem foi de 0,9982 (**Anexo 1**), já o coeficiente de correlação obtido para o método utilizado nas análises do arroz integral e sua água de lavagem foi de 0,9972 (**Anexo 2**).

A



B

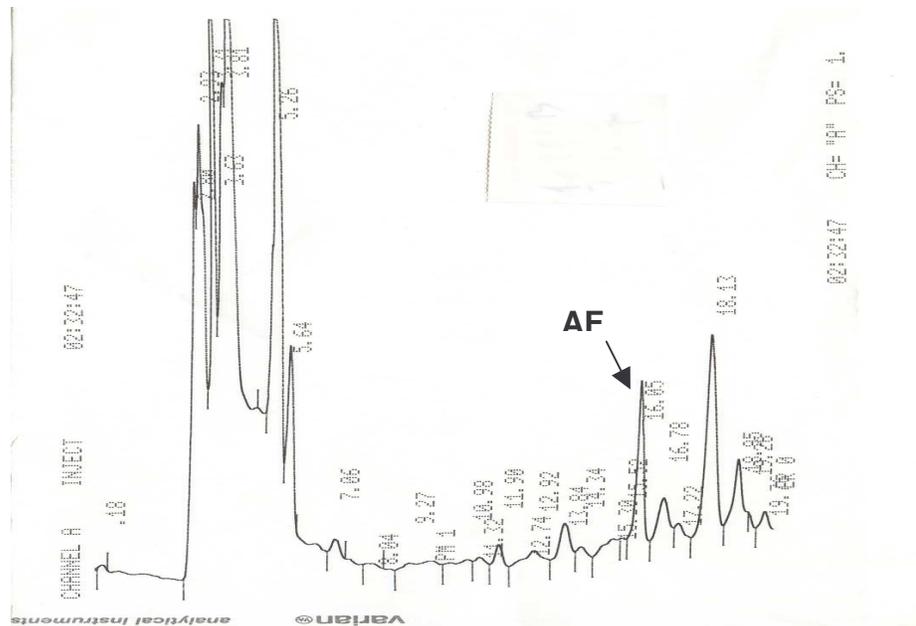


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato de arroz tipo I polido (A) e de arroz integral (B) enriquecidos com ácido fólico (AF).

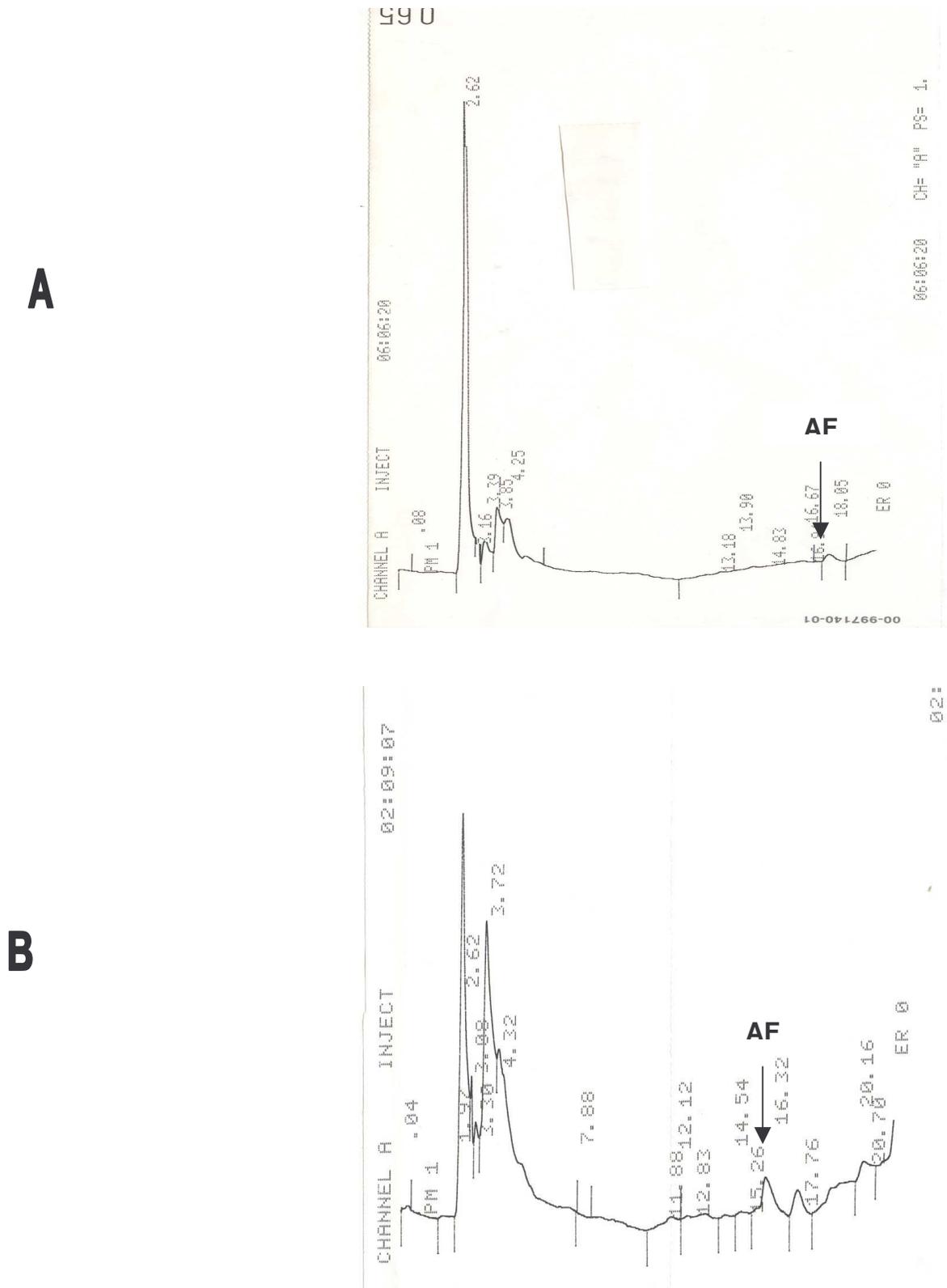


Figura 2. Perfil cromatográfico da água de lavagem de arroz tipo I polido (A) e de arroz integral (B) enriquecidos com ácido fólico (AF).

CONCLUSÕES

Concluiu-se que as metodologias propostas para a determinação de ácido fólico nesses alimentos é adequada e mostrou-se eficiente, de acordo com os parâmetros utilizados para a validação do método.

O desenvolvimento e a validação destas metodologias específicas à análise dessa vitamina nesses dois tipos de arroz e em suas águas de lavagem permitirão estudos capazes de monitorar, com maior fidelidade, a estabilidade do ácido fólico nessas matrizes além de ser ferramenta útil na fiscalização sanitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTINI, T.S. **Desenvolvimento de metodologia para a determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, B6, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1996.
2. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fortificação de Farinhas**. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 12/2005.
3. CATHARINO, R.R, GODOY, H.T. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para a análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 2000.
4. CALCUTT, R., BRODY, R. **Statistic for Analitical Chemists**. 1ed. Londres: Academic Press, 1983.
5. EICHHOLZER, M. Micronutrient deficiencies in Switzerland: causes and consequences. **Journal of Food Engineering**, 56: 171-179, 2003.
6. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Consumo, mercado e comercialização de arroz no Brasil**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz>. Acesso em 11/2005.
7. FDA. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. **Federal Register**, 61: 8781-8791, 1996.
8. FERREIRA, I.M.P.L., MARQUES, E.M.J., FERREIRA, M.A. Development, validation, and application of na HPLC/UV method for quantification of casein in infant formulae and follow-up milks. **Journal of Liquid Chromatography & Technology**, 23(13): 2057-2065.
9. FOKKEMA, M.R., MEIJER, W.M., DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W., Benefits and concerns regarding folic acid fortification. **Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde**, 30(3): 218-223, 2005.

10. HAWKES, J.G., VILLOTA, R. Folates in foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 28(6): 439-539, 1989.
11. HEINEMANN, R.J.B., FAGUNDES, P.L., PINTO, E.A., PENTEADO, M.V.C., LANFER-MARQUEZ, U.M. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, 18: 287-296, 2005.
12. JULIANO, B.O. Rice grain quality: problems and challenges. **Cereal Foods World**, 35: 245-253, 1990.
13. KALTER, H. Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. **Reproductive Toxicology**, 14: 463-476, 2000.
14. KAYALI-SAYADI, M.N., RUBIO-BARROSO, S., GARCIA-IRANZO, R., POLO-DÍEZ, L.M. Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread by supercritical fluid extraction and HPLC with fluorimetric detection. **Journal of Liquid Chromatography & Technology**, 23(12): 1913-1925.
15. KONINGS, E.J.M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **Journal of AOAC International**, 82(1): 119-127, 1999.
16. LIMA, J.A., GODOY, H.T. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 2001.
17. MÜLLER, H. Determination of folic acid contents in foods of animal origin by means of HPLC. **Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Gemüse und Obst mit Hilfe de Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)**, 196: 137-141, 1993.
18. MUSKIET, F.A.J. The importance of early folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 20(3): 403-410, 2005.
19. OSSEYI, E.S.O., WEHLING, R.L., ALBRECHT, J.A. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, 826: 235-240, 1998.
20. PFEIFFER, C.M., ROGERS, L.M., BAILEY, L.B., GREGORY, J.F. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined using a dual-label stable-isotope protocol. **American Journal of Clinical Nutrition**, 47: 183-189, 1997.
21. RYCHLIK, M. Revised folate content of foods determined by stable isotope dilution assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17: 475-483, 2004.
22. SMULDERS, Y.M., STEHOUWER, C.D.A. Folate metabolism and cardiovascular disease. **Seminars in Vascular Medicine**, 5(2): 87-97, 2005.
23. VAHTERISTO, L., LEHIKONEN, K., OLLILAINEN, V., VARO, P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. **Food Chemistry**, 59: 589-597, 1997.

Artigo a ser submetido à publicação no Journal of Food Science

CAPÍTULO III – APLICAÇÃO DA CLAE NA DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO EM ARROZ TIPO I POLIDO E INTEGRAL ENRIQUECIDOS

CREPALDI, P.F. e GODOY, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Departamento de Ciência de Alimentos
C.P. 6121 CEP 13083-970
crepaldi_bauru@yahoo.com.br

RESUMO

A mais de dez anos atrás, tornou-se claro que o ácido fólico diminui substancialmente o risco de defeitos do tubo neural de recém-nascidos. As autoridades em saúde pública de muitos países, a partir de então, tomaram providências em melhorar a ingestão pré-concepcional do ácido fólico em mulheres com gravidez planejada ou naquelas em idade fértil. Nos anos 90, logo após as primeiras publicações evidenciando o efeito protetor do ácido fólico contra doenças cardiovasculares, defeitos congênitos e outras doenças, o governo dos Estados Unidos decidiu pela fortificação de alimentos cereais base da dieta norte-americana. Hoje, a maioria dos países desenvolvidos e o Brasil praticam a fortificação com o ácido fólico voluntariamente ou através do uso de leis. O arroz é considerado um alimento ideal para a fortificação por ser a base da dieta de mais da metade da população mundial além de ser uma das mais pobres fontes de folatos. Para se garantir a qualidade, para propósitos legais e para se conhecer a estabilidade da vitamina sob as condições de processamento do arroz, os objetivos desse trabalho foram examinar a homogeneidade da vitamina no arroz enriquecido industrializado e analisar as perdas do ácido fólico durante a lavagem e o cozimento do arroz tipo 1 polido e do arroz integral. Todos os lotes analisados, tanto do arroz polido quanto do arroz integral, diferiram significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey. As perdas do ácido fólico durante os cozimentos foram menores no arroz polido (21%) do que no arroz integral (42%), sendo que o

arroz polido previamente refogado em óleo foi o que perdeu menos vitamina (16,13%). As maiores perdas ocorreram durante os processos de lavagem, 87% para o arroz polido e 93% para o arroz integral.

SUMMARY

More than 10 years ago, it became clear that folic acid substantially decrease the risk of neural tube defects (NTDs). Public health authorities in many countries have taken steps to improve the periconceptional intake of folic acid in women planning pregnancy or women at risk of getting pregnant. In the early 1990s, soon after the publications about a protective effect of folic acid against cardiovascular diseases, congenital anomalies as well as other diseases, the US government decided to move forward to fortification of cereal staple foods. Nowadays, most of the developed countries and Brazil practice mandatory or voluntary fortification with folic acid. Rice is an ideal food for micronutrient fortification because it is a staple diet for more than half of the world's population besides it is one of the poorest sources of folate. For quality assurance, regulatory purposes and to know the stability of the vitamin under rice's processing conditions, the objectives of this work were to examine the uniformity of the industrial production of the fortified rice and to evaluate the folic acid washing and cooking losses of the type 1 milled and brown rices. All the milled and brown rice samples analysed were statistically different according to Tukey's test. The losses of folic acid in cooking were lower in milled rice (21%) than in brown rice (42%), therefore, the milled rice fried with oil before cooking showed the minor losses of the vitamin (16,13%). The highest losses occurred during the washing processes, 87% for milled rice and 93% for brown rice.

INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos científicos têm sido apresentados evidenciando a direta correlação entre os micronutrientes e a saúde humana. A população mundial, como um todo, tem se alimentado mal, e o consumo de alimentos ricos em muitos

compostos nutritivos como frutas, verduras e legumes é cada vez menor. Além dos maus hábitos alimentares, quando o nutriente em questão é uma vitamina, o problema torna-se ainda mais grave, pois são compostos bastantes instáveis a muitas condições de processamento, tanto industrial quanto doméstico, e estocagem (LIMA e GODOY, 2001).

A fortificação alimentar é um recurso utilizado mundialmente com a finalidade de corrigir deficiências nutricionais de uma população, de obter um balanço nutricional adequado, de suprir necessidades nutricionais de produtos novos lançados no mercado e de atender padrões de identidade e regulamentos nutricionais já existentes.

Na tentativa de compensar as perdas no processamento de alimentos ou mesmo com o intuito de reforçar o conteúdo nutritivo dos mesmos é que vem sendo feita a adição de ácido fólico a muitos alimentos, uma vitamina que tem despertado interesse devido aos seus efeitos em relação à prevenção de doenças como problemas cardíacos, malformações congênitas, certos tipos de câncer, mal de Alzheimer e anemia megaloblástica, entre outras (COTTER e DALLY, 2005; FOKKEMA et al., 2005; FRENCH et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2004; KALTER, 2001; MUSKIET, 2005).

Em março de 1996 a United States Food and Drug Administration (FDA) publicou uma regulamentação determinando que a todos os cereais e produtos de origem cereal, incluindo arroz, farinhas, cereais matinais, macarrão, entre outros, fossem adicionados 140 µg de ácido fólico por 100g do produto (FDA, 1996). O objetivo dessa regulamentação foi aumentar a ingestão do ácido fólico por mulheres em idade fértil a fim de diminuir a incidência de defeitos no tubo neural fetal. A regulamentação tornou-se efetiva somente a partir de Janeiro de 1998.

No Brasil, os altos índices de anemia e de doenças causadas pela deficiência de ácido fólico na população brasileira levaram o Ministério da Saúde e a Anvisa, através da publicação da Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, a partir de junho de 2004. Cada 100g de farinha de trigo e de milho deve conter 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (ANVISA, 2005). A tendência

é a extensão dessa regulamentação à outros produtos cereais como o arroz, a exemplo do que hoje ocorre em outros países.

A validade das estimativas usadas para determinar o potencial do impacto dos programas de fortificação é dependente da exatidão das informações a respeito da estabilidade do nutriente às condições de processamento e produção do alimento-alvo. O uso de métodos analíticos inadequados ao ácido fólico e a sobredosagem de nutrientes nos alimentos fortificados foram reconhecidas como as duas principais fontes de subestimação da estimativa de ingestão das vitaminas, segundo o FDA (1996).

Existe um consenso geral de que os métodos tradicionais para a análise dos folatos subestimam o conteúdo do ácido fólico nos alimentos (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998; RADER, WEAVER e ANGYAL, 1998; TAMURA, 1998). Além disso, os produtores podem adicionar quantidades maiores de ácido fólico no alimento do que o valor especificado no rótulo do produto, a fim de garantir que o alimento contenha ao menos a quantidade especificada do nutriente ao final da sua vida-de-prateleira ou processamento doméstico (FDA, 1996).

Ainda que o ácido fólico seja considerado seguro e livre de toxicidade, existem dúvidas quanto à sua capacidade, quando ingerido cronicamente e em grandes quantidades, em mascarar os sintomas da deficiência da vitamina B₁₂, cuja deficiência é estimada entre 10-15% da população acima dos 60 anos de idade, fato que levaria à uma progressão dos sintomas neurológicos (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998; MCCARTHY, 1997).

A princípio, o arroz pode ser considerado um alimento ideal para a fortificação com o ácido fólico pois é a base da dieta de mais da metade da população mundial além de ser, quando beneficiado, uma das mais pobres fontes de folato e outras vitaminas hidrossolúveis dentre os cereais (JULIANO, 1990; MARSHALL et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 2005; MCKEVITH, 2004). No entanto, valor nutricional do arroz enriquecido pode ser influenciado em resultado ao método usado em seu preparo para o consumo tal como os processos de lavagem e cozimento (RADER, WEAVER e ANGYAL, 2000; SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

A diminuição do valor nutricional do arroz durante a lavagem e o cozimento já foi bem documentada em muitas pesquisas. A lavagem do arroz polido é responsável pela perda média de 22-59% de tiamina, 11-26% de riboflavina e de 20-60% de niacina (JULIANO, 1985).

A labilidade característica do ácido fólico a fatores como temperatura, luz, pH, atividade de água, exposição a agentes oxidantes e lixiviação (ARCOT, SHRESTHA e GUSANOV, 2002; GREGORY, 1989; VORA et al., 2002; VORA et al., 2004), entre outros, indicam a necessidade de se estudar o comportamento desse nutriente durante as fases de produção, comercialização e consumo do arroz, visando assegurar a qualidade do mesmo.

Para o arroz, a maioria dos métodos utilizados para a fortificação utilizam ácidos (BRAMALL, 1986; JOSEPH, LIUZZO e RAO, 1990; MICKUS, 1955; MISAKI e YASUMATSU, 1985) o que fazem deles métodos inapropriados para a fortificação com o ácido fólico, já que a vitamina é instável sob condições ácidas (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003). Outro fator importante para uma boa fortificação com o ácido fólico é que o método utilizado tenha a capacidade de prevenir a lixiviação da vitamina durante o processo de lavagem e mantenha a estabilidade do nutriente durante o cozimento.

SHRESTHA, ARCOT e PATERSON (2003) relataram a perda de 73% do ácido fólico adicionado ao arroz polido fortificado sem o uso de polímeros de revestimento. Durante o cozimento em excesso de água durante 20 minutos, o arroz polido fortificado com o ácido fólico sem o uso de qualquer revestimento perdeu quase a totalidade da vitamina adicionada enquanto que outros arroz revestidos tiveram uma perda entre 61-93% para a água de cozimento.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi determinar e avaliar o conteúdo e a homogeneidade do ácido fólico em arroz tipo I polido e integral enriquecidos disponíveis no mercado nacional, além de estudar a estabilidade da vitamina frente aos procedimentos comumente envolvidos no preparo doméstico do alimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Arroz Tipo 1 Polido

No Brasil, apenas uma empresa fabrica arroz polido enriquecido com ácido fólico, com teor declarado de 148µg da vitamina em 100g de arroz. Três diferentes lotes foram adquiridos em supermercados da cidade de Campinas-SP, com preocupação de se obter lotes com data de fabricação o mais recente possível. Cada lote foi composto por duas embalagens de 500g, as quais tiveram o seu conteúdo homogeneizado antes da retirada da amostra para análise. As determinações foram realizadas em duplicata.

Os arrozes cozidos foram preparados de forma caseira, tendo como ingredientes apenas 90g do arroz enriquecido e 250mL de água, 90g do arroz enriquecido e 500mL de água, e 90g do arroz enriquecido refogado em 4 colheres de óleo e cozido em 375mL de água. Foram cozidos em fogão convencional a temperatura baixa, por aproximadamente 10, 20 e 15 minutos, respectivamente, até que a água de cozimento houvesse secado. O arroz foi deixado esfriar até a temperatura ambiente (25°C), amassado em almofariz, homogeneizado e sua umidade avaliada antes da tomada da amostra. As determinações foram sempre realizadas em duplicata.

Para a avaliação das águas de lavagem, 1 xícara do arroz (190g) foi lavado manualmente com uma porção de 500mL de água potável durante 5 minutos, o arroz completamente drenado e a água reservada para análise. O mesmo procedimento foi repetido utilizando o arroz já lavado, visando a obtenção da segunda água de lavagem. Os materiais foram armazenados em recipientes hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração até o momento das análises.

Arroz Integral

O arroz integral foi adquirido em estabelecimentos comerciais de Campinas e conduzido o enriquecimento, já que não existem fabricantes nacionais do arroz

integral enriquecido. O arroz foi analisado para comprovar a ausência de ácido fólico e interferentes. O enriquecimento dos três lotes foi conduzido no Laboratório de Análise de Alimentos a partir da adição de 150µg de ácido fólico a cada 100g do produto. Cada lote foi individualmente homogeneizado com a vitamina com o auxílio de um homogeneizador automático, durante um período de 2 horas.

Após esse processo, foram tomadas de cada embalagem 2 amostras de 1,0g e realizada a análise para se determinar, não só o conteúdo de ácido fólico mas, a homogeneidade do produto.

Assim como feito para o arroz polido, os arrozes integrais cozidos foram preparados de forma caseira, tendo como ingredientes apenas 90g do arroz enriquecido e 375mL de água, e 90g do arroz enriquecido e 625mL de água. Foram cozidos em fogão convencional a temperatura baixa, por aproximadamente 20 e 30 minutos, respectivamente, até que a água de cozimento houvesse secado. O arroz foi deixado esfriar até a temperatura ambiente (25°C), amassado em almofariz, homogeneizado e sua umidade calculada antes da tomada da amostra. As determinações foram sempre realizadas em duplicata.

Para a avaliação das águas de lavagem, 1 xícara do arroz (210g) foi lavado manualmente com uma porção de 500mL de água encanada durante 5 minutos, o arroz completamente drenado e a água reservada para análise. O mesmo procedimento foi repetido utilizando o arroz já lavado, visando a obtenção da segunda água de lavagem. Os materiais foram armazenados em recipientes hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração até o momento das análises.

REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi obtido da SIGMA (cód. F-7876, lote 40H321). A acetoneitrila grau cromatográfico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico foi obtido da Synth. 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 (FHLP 1300), com poros de 0,45µm de diâmetro e posteriormente desgaseificadas.

EQUIPAMENTO

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido VARIAN série 9060, com alça de amostragem de 10µL de capacidade, bomba ternária equipado com sistema de detecção por UV. A coluna Microsorb-MV (C₁₈ ODS-2, 12X4,6mm, 5µm) produzida pela Rainin LC e comercializada pela VARIAN-USA foi utilizada para o processo cromatográfico.

MÉTODO

Arroz Tipo 1 Polido

Para a análise do ácido fólico em Arroz Tipo 1 Polido e suas águas de lavagem, utilizou-se a metodologia desenvolvida e validada por CREPALDI e GODOY (2005) para esse tipo de alimento.

Para a determinação da vitamina no alimento cru, o ácido fólico foi extraído de 1,0g de arroz, previamente homogeneizado e pulverizado em moinho, com 3,0ml de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e 3,0ml de acetonitrila por 10 minutos em banho ultra-sônico. Ao extrato foram adicionados 3,5ml de tampão fosfato e 500µL de ácido tricloroacético. A partir de então, seguiram-se as etapas de filtração, a primeira em papel filtro comum e a segunda em membranas MILLIPORE (FHLP 1300), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado no cromatógrafo a líquido (10µL). O mesmo procedimento foi realizado para a extração do ácido fólico contido nas águas de lavagem, a suspensão foi vigorosamente agitada e tomados 2ml como amostragem para cada análise realizada.

Para a extração da vitamina nas amostras de arroz cozido, o alimento foi deixado esfriar até a temperatura ambiente (25°C), amassado em almofariz, homogeneizado, tomados 5g de amostragem e conduzido o procedimento de

extração utilizado para o arroz cru dobrando-se o volume das soluções empregadas.

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min, com 95% de Fase Móvel Aquosa (FMA: composta por 20mL de ácido acético glacial e 700 μ L de hidróxido de potássio 50%, o volume foi aferido com água MILLI-Q a 1L em balão volumétrico) e 5% de Fase Móvel Orgânica (FMb: composta exclusivamente de acetonitrila) no início da corrida, chegando aos 20 minutos a 80% de FMA e 20% de FMb. As condições cromatográficas iniciais foram retomadas gradativamente até os 25 minutos, mantendo-se essa proporção até os 30 minutos, tempo necessário ao reequilíbrio da coluna cromatográfica. A detecção foi feita em detector de UV, 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, espectros de absorção no DAD e por co-cromatografia. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, através de curva analítica construída com 5 níveis de concentração (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 μ g/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

Arroz Integral

Para a análise de ácido fólico no Arroz Integral cru, cozidos e em suas águas de lavagem, as metodologias de extração foram as mesmas descritas anteriormente para Arroz Tipo 1 Polido.

Quanto às condições cromatográficas, o ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min iniciando-se a corrida com 95% de FMA e 5% de FMb, chegando aos 20 minutos em 76% de FMA e 24% de FMb. As condições cromatográficas iniciais foram retomadas gradativamente até os 25 minutos, mantendo-se essa proporção até os 30 minutos, tempo necessário ao reequilíbrio da coluna cromatográfica. A detecção, identificação e quantificação foi realizada seguindo os mesmos procedimentos citados anteriormente para o arroz polido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 1** apresenta os cromatogramas obtidos para o arroz tipo 1 polido cru, cozido e para sua água de lavagem. Nas condições cromatográficas utilizadas a eluição do ácido fólico (AF) ocorreu em, aproximadamente, 14,7 minutos para o arroz cru, 17,5 minutos para o arroz cozido e 18,1 minutos para água de lavagem.

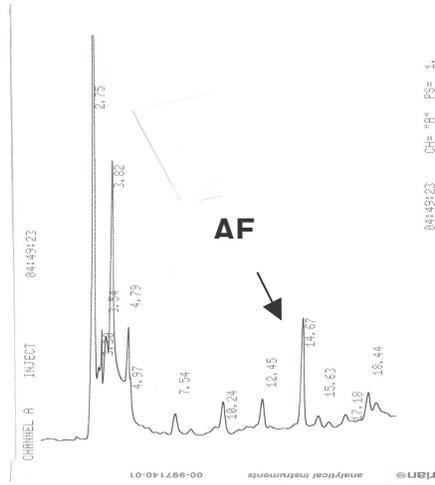
A curva analítica traçada por padronização externa, apresentou boa linearidade na faixa de concentração de 0,02 a 0,4 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9982 (**Anexo 1**).

Na **Figura 2** são apresentados os cromatogramas obtidos para o arroz integral cru, cozido e para sua água de lavagem. Nas condições cromatográficas empregadas para a análise, o tempo de retenção do ácido fólico foi de, aproximadamente, 16,3 minutos para o arroz integral cru, 17,4 minutos para o cozido e 17,8 minutos para sua água de lavagem.

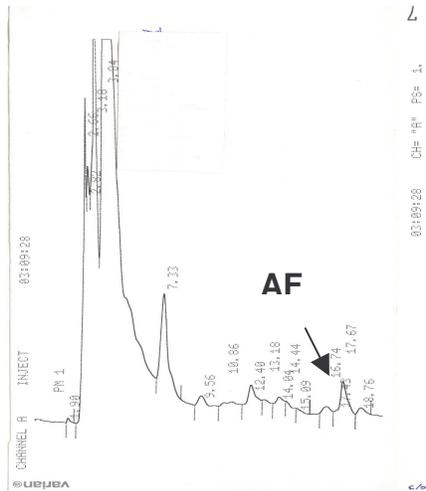
A curva analítica traçada por padronização externa, apresentou boa linearidade na faixa de concentração de 0,02 a 0,4 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9972 (**Anexo 2**).

No **Anexo 3** e **Anexo 4** estão, respectivamente, apresentados os perfis dos espectros de absorção do ácido fólico presente em solução padrão e no arroz tipo 1 polido e arroz integral analisados, obtidos por DAD. A pureza do pico correspondente ao ácido fólico foi avaliada através dos parâmetros de pureza fornecidos pelo software HP-Chemstation, mostrando a ausência de co-eluentes nas análises do arroz tipo 1 polido (**Anexo 5**) e do arroz integral (**Anexo 6**).

A



B



C

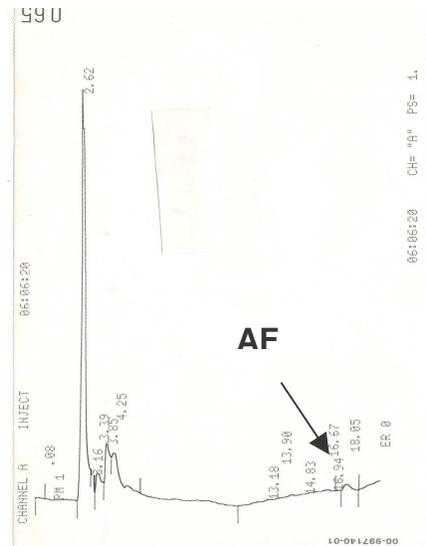
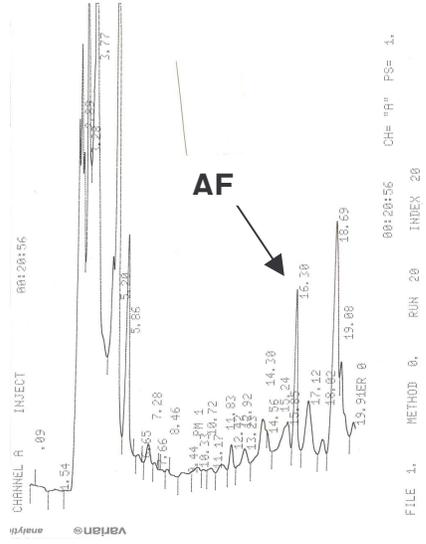
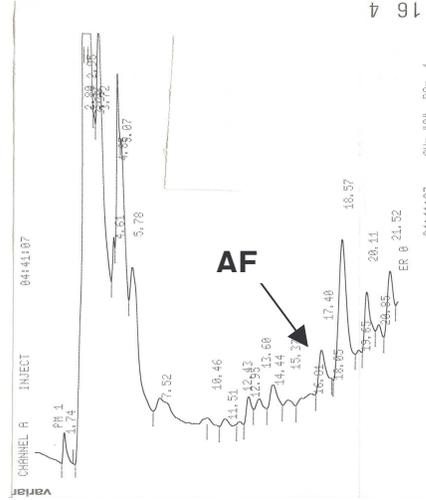


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato do arroz tipo 1 polido cru (A), cozido (B) e da água de lavagem (C) enriquecidos com ácido fólico (AF).

A



B



C

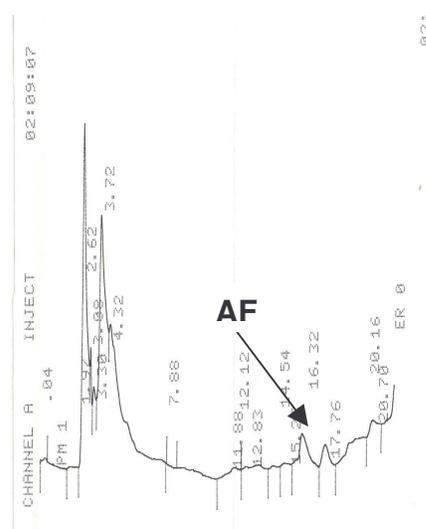


Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato do arroz integral cru (A), cozido (B) e da água de lavagem (C) enriquecidos com ácido fólico (AF).

Avaliação da homogeneidade dos lotes e análise da estabilidade do ácido fólico nos arrozes submetidos a processamentos térmicos

Os resultados das análises realizadas indicam que os processos utilizados no estabelecimento de uma homogeneidade da vitamina no arroz não foram bem sucedidos. Tanto os lotes do arroz tipo 1 polido enriquecido disponível no mercado nacional quanto os lotes do arroz integral enriquecido em laboratório diferem estatisticamente entre si.

A média dos lotes indica um nível de ácido fólico 35% acima do valor declarado no rótulo do produto industrializado que é de 148 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de arroz. No arroz enriquecido em laboratório os valores médios dos lotes apontaram um nível 33% acima do valor proposto inicialmente para o enriquecimento (150 $\mu\text{g}/100\text{g}$ do produto). Esses dados mostram a importância de estudos referentes a melhor forma de adição dessa vitamina ao arroz, com a utilização de equipamentos melhores projetados, que permitam a obtenção de maior eficiência nesse processo (LIMA e GODOY, 2001).

Também foram consideradas estatisticamente significativas as perdas da vitamina ocorridas durante os processamentos térmicos a que foram submetidos ambos os tipos de arroz, fato também relatado por outros autores (CORT et al., 1976; PEIL et al., 1981; SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003). A **Tabela 1** e **Tabela 2** apresentam e relacionam pelo teste de TUKEY, respectivamente para arroz tipo 1 polido e para arroz integral, os teores de ácido fólico encontrados inicialmente e após os tratamentos térmicos a que foram submetidos os lotes de cada matriz.

Observa-se uma grande diminuição no teor da vitamina decorrente do processamento térmico, para o arroz tipo 1 polido a perda média entre os processamentos foi 21%, sendo o cozimento em 10 minutos o responsável pela maior perda, 26,3%. Para o arroz integral a perda média entre os processamentos foi o dobro da perda do arroz polido e ficou em 42%, sendo o cozimento em 20 minutos o responsável pela perda de 62% da concentração do ácido fólico.

Tabela 1. Análises de variância do arroz tipo 1 polido pelo teste de Tukey.

Tratamento	Concentração de Ácido Fólico (µg/100g)			MDS	CV (%)
	Lote 1	Lote 2	Lote 3		
Cru	171,9 Ca	222,9 Aa	207,1 Ba	6,5	1,5
Coz. 10'	116,3 Bc	161,8 Ad	165,5 Ac	3,9	1,2
Coz. 20'	145,4 Cb	173,6 Ab	163,6 Bc	5,3	1,5
Coz. c/ Óleo	151,0 Cb	168,2 Bc	185,6 Ab	8,1	2,2
MDS	6,6	3,2	8,3		
CV (%)	2,0	0,8	2,0		

As letras maiúsculas relacionam-se horizontalmente, as minúsculas verticalmente. Concentrações significativamente distintas entre si são representadas por diferentes letras do alfabeto, aos valores pertencentes a um mesmo grupamento de Tukey são dadas as mesmas letras.

CV – coeficiente de variação.

MDS – mínima diferença significativa.

Tabela 2. Análises de variância do arroz integral pelo teste de Tukey.

Tratamento	Concentração de Ácido Fólico (µg/100g)			MDS	CV (%)
	Lote 1	Lote 2	Lote 3		
Cru	162,0 Ba	213,6 Aa	224,9 Aa	18,5	2,2
Coz. 20'	61,2 Bc	84,5 Ab	82,2 Ac	13,2	4,2
Coz. 30'	80,5 Bb	98,0 Ab	100,2 Ab	8,6	2,2
MDS	8,9	14,2	17,6		
CV (%)	2,1	2,6	3,1		

As letras maiúsculas relacionam-se horizontalmente, as minúsculas verticalmente. Concentrações significativamente distintas entre si são representadas por diferentes letras do alfabeto, aos valores pertencentes a um mesmo grupamento de Tukey são dadas as mesmas letras.

CV – coeficiente de variação.

MDS – mínima diferença significativa.

Diferenças na composição das matrizes e mesmo um possível emprego de polímeros de revestimento na preparação industrial do arroz polido enriquecido, podem ser apontados como possíveis promotores dessa maior estabilidade da vitamina. Segundo SHRESTHA, ARCOT e PATERSON (2003), durante o cozimento em excesso de água por 20 minutos, o arroz polido fortificado com o ácido fólico sem o uso de qualquer revestimento perdeu quase a totalidade da vitamina adicionada enquanto que outros arroz revestidos tiveram uma perda entre 61-93% para a água de cozimento. A **Tabela 3** expõe os valores da concentração inicial do ácido fólico e os teores obtidos após os processamentos térmicos, assim como as porcentagens de perdas.

Tabela 3. Porcentagem de perda de ácido fólico após processamentos térmicos do arroz tipo 1 polido e integral.

CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM BASE SECA ($\mu\text{g}/100\text{g}$)					
Arroz tipo 1 polido					
Concentração Inicial		Tratamento	Concentração Após Tratamento		
M \pm DP	CV (%)		M \pm DP	CV (%)	Perda (%)
200,6 +/- 26,1	13,0	Coz. 10'	147,9 +/- 27,4	18,5	26,3
		Coz. 20'	160,9 +/- 8,9	8,9	19,8
		Coz. c/ Óleo	168,3 +/- 10,3	10,3	16,1
Arroz integral					
Concentração Inicial		Tratamento	Concentração Após Tratamento		
M \pm DP	CV (%)		M \pm DP	CV (%)	Perda (%)
200,1 +/- 33,5	16,8	Coz. 20'	76,0 +/- 12,9	18,5	62,1
		Coz. 30'	92,9 +/- 10,8	11,6	53,6

M \pm DP – média aritmética e estimativa de desvio padrão das determinação.

CV – coeficiente de variação.

De acordo com os dados obtidos no estudo da estabilidade térmica, o arroz polido previamente refogado em óleo e cozido durante 15 minutos foi aquele que proporcionou maior estabilidade à vitamina durante o aquecimento, retendo, aproximadamente, 84% do valor inicial de ácido fólico. Ainda que o arroz cozido por 10 minutos tenha tido um tempo de processamento mais curto e tenha sido cozido em menor volume de água, este apresentou uma capacidade de retenção da vitamina 10% menor. Nesse caso, é plausível a possibilidade de que a formação de um filme de óleo no grão do arroz refogado tenha dificultado o contato entre a vitamina e a água de cozimento, fator que resultaria em uma atividade de água menor, quando comparado aos cozimentos sem óleo, e conseqüentemente em uma menor degradação oxidativa e hidrolítica (GREGORY, 1989; MADZIVA, KAILASAPATHY e PHILLIPS, 2006).

Inesperadamente, os arrozes submetidos a um tempo de cozimento maior foram os que apresentaram maiores teores do ácido fólico durante o processamento, algo que poderia ser explicado por uma menor temperatura média de cozimento devido ao maior volume de água empregado no preparo.

Avaliação do processo de lavagem na estabilidade do ácido fólico em arrozes enriquecidos

O hábito de lavar o arroz antes de cozinhá-lo é comum entre a população que, em geral, mantém essa prática mesmo no alimento enriquecido e pré-lavado.

A fim de se elucidar a real influência desse procedimento na manutenção do valor nutricional do arroz, efetuou-se a análise do teor do ácido fólico antes e após a lavagem dos grãos. Os três lotes dos arrozes tipo 1 polido e integral foram submetidos à lavagem e analisados em duplicatas. Para a avaliação das águas de lavagem, 1 xícara do arroz branco (188g) e integral (213g) foram lavados manualmente com uma porção de 500mL de água potável durante 5 minutos, o arroz completamente drenado e a água reservada para análise. O mesmo procedimento foi repetido utilizando o arroz já lavado, visando a obtenção da segunda água de lavagem.

A diminuição do valor nutricional do arroz durante a lavagem e o cozimento já foi bem documentada em muitas pesquisas. A lavagem do arroz polido é responsável pela perda média de 22-59% de tiamina, 11-26% de riboflavina e de 20-60% de niacina (JULIANO, 1985).

SHRESTHA, ARCOT e PATERSON (2003) relataram a perda de 73% do ácido fólico adicionado ao arroz polido fortificado sem o uso de polímeros de revestimento.

Os valores encontrados nas análises são dispostos na **Tabela 4**. O procedimento de lavagem causou perdas muito grandes do ácido fólico em ambas as matrizes, o arroz polido perdeu, em média, 87% do valor inicial da vitamina, enquanto que no arroz integral foi notada uma perda média acima de 93%, perdas maiores que as relatadas por SHRESTHA, ARCOT e PATERSON (2003).

Mais uma vez, a maior perda ocorreu com o arroz integral, visto que a adição da vitamina feita em laboratório não contou com qualquer agente preventivo à lixiviação ou à oxidação, apontado por diversos autores como alguns dos fatores causais da instabilidade do ácido fólico nos alimentos (VARSANYI e

SOMOGYI, 1983; BÜHLER, 1988; GREGORY, 1989; SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

Tabela 4. Porcentagem de perda de ácido fólico após procedimento de lavagem do arroz.

Tipo de Arroz	Lotes	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO ($\mu\text{g}/100\text{g}$)				Perda (%)
		Antes da Lavagem		Após Lavagem		
		M \pm DP	CV (%)	M \pm DP	CV (%)	
Tipo 1 Polido	1	171,9 \pm 2,3	1,4	20,5 \pm 0,5	2,5	88
	2	222,9 \pm 1,6	0,7	27,3 \pm 0,9	3,4	88
	3	207,1 \pm 3,9	1,9	24,4 \pm 0,4	1,5	85
Integral	1	162,0 \pm 1,6	1,0	11,0 \pm 0,4	3,2	93
	2	213,6 \pm 4,8	2,2	13,4 \pm 0,9	6,4	94
	3	224,9 \pm 5,8	2,6	15,9 \pm 0,6	4,0	93

M \pm DP – média aritmética e estimativa de desvio padrão das determinação.

CV – coeficiente de variação.

No arroz polido, o ácido fólico lixiviado pelas duas lavagens sucessivas correspondeu a 67% do valor inicialmente encontrado da vitamina no alimento, enquanto que a quantidade de ácido fólico encontrada nas águas de lavagem do arroz integral são correspondentes a 92% do teor inicial do arroz. As concentrações médias encontradas em cada água de lavagem são mostradas na **Tabela 5.**

Tabela 5. Análises de variância pelo teste de Tukey da perda do ácido fólico para as águas de lavagem.

Tipo de Arroz	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/100\text{g}$)		MDS	CV (%)
	Perdas para Águas de Lavagem			
	Água 1	Água 2		
Tipo 1 Polido	97,0 A	37,9 B	5,6	9,8
Integral	163,3 A	48,0 B	16,2	11,9

As letras maiúsculas relacionam-se horizontalmente. Concentrações significativamente distintas entre si são representadas por diferentes letras do alfabeto.

CV – coeficiente de variação.

MDS – mínima diferença significativa.

CONCLUSÕES

Assim como em outros trabalhos publicados, a homogeneização do ácido fólico adicionado ao alimento parece ser também um real problema na produção de um arroz enriquecido já que tanto os lotes do arroz industrializado quanto ao enriquecido em laboratório mostraram concentrações estatisticamente distintas da vitamina.

Frente aos processamentos térmicos, o ácido fólico mostrou-se significativamente mais resistente no arroz industrializado, tendo uma capacidade de retenção duas vezes maior que a do arroz integral, devido provavelmente ao uso de coadjuvantes tecnológicos, no entanto, todos os processamentos levaram a grandes perdas de vitamina, sendo o arroz previamente refogado em óleo aquele que reteve maior concentração do ácido fólico. Mas o grande problema entre os processamentos foi mesmo a lavagem dos arrozes, levando a perdas nunca inferiores a 85% da vitamina. Independentemente dos comportamentos distintos das matrizes frente à retenção do ácido fólico, há uma perda muito grande da vitamina, sendo desaconselhada a lavagem do arroz enriquecido até que novos métodos de enriquecimento a permitam.

Conclui-se que embora muitos autores considerem o arroz um alimento ideal para a fortificação com o ácido fólico, as concentrações finais da vitamina no alimento pronto para o consumo podem ser considerados pífios caso não surjam estudos para o melhor planejamento de adição e homogeneização da vitamina a esse tipo de produto, assim como que seja notificado na embalagem do alimento o melhor preparo do arroz, visando melhorar a eficiência do processo, a fim de minimizar as perdas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fortificação de Farinhas.** Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 12/2005.

2. ARCOT, J., SHRESTHA, A.K., GUSANOV, U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. **Food Control**, 13: 245-252, 2002.
3. BRAMALL, L.D. A novel process for fortification of rice. **Food technology in Australia**, 38: 281-284, 1986.
4. BÜHLER, V. **Vademecum for vitamin formulations**. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1998.
5. CORT, W.M., BORENSTEIN, B., HARLEY, J.H., OSADCA, M., SCHEINER, J. Nutrient stability of fortified cereal products. **Food Technology**, 30: 52-62, 1976.
6. COTTER, A.M., DALY, S.F. Neural tube defects: is a decreasing prevalence associated with a decrease in severity? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 119: 161-163, 2005.
7. CREPALDI, P.F., GODOY, H.T. Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ácido fólico em arroz enriquecido. **6º. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, São Paulo: Campinas, 2005. 1 CD-ROM.
8. FDA. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. **Federal Register**, 61: 8781-8791, 1996.
9. FOKKEMA, M.R., MEIJER, W.M., DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W., Benefits and concerns regarding folic acid fortification. **Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde**, 30(3): 218-223, 2005.
10. FRENCH, A.E., GRANT, R., WEITZMAN, S., RAY, J.G., VERMEULEN, M.J., SUNG, L., GREENBERG, M., KOREN, G. Folic acid fortification is associated with a decline in neuroblastoma. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, 74: 288-294, 2003.
11. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.
12. GREGORY, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. **Advanced Food and Nutritional Research**, 33: 1-101, 1989.
13. INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington, USA: National Academic Press, 1998.
14. JOSEPH, E.W., LIUZZO, J.A., RAO, R.M. Development of wash and cook-proof methods for vitamin enrichment of rice grains. **Journal of Food Science**, 55: 1102-1107, 1990.
15. JULIANO, B.O., BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. Em: JULIANO, B.O. **Rice Chemists and Technology**. 2 ed. Miami, USA: **The American Association of Cereal Chemists**, 1985.

16. JULIANO, B.O. Rice grain quality: problems and challenges. **Cereal Foods World**, 35: 245-253, 1990.
17. KALTER, H. Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. **Reproductive Toxicology**, 14: 463-476, 2000.
18. LIMA, J.A., GODOY, H.T. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 93p., 2001.
19. MADZIVA, H., KAILASAPATHY, K., PHILLIPS, M. Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. **Food Science and Technology**, 39(2): 146-151, 2006.
20. MARSHAL, W.E., WADSWORTH, J.I. **Rice science and technology**. New York, USA: Marcel Dekker, 1994.
21. MARTÍNEZ, A.B., BERRUEGO, G.R., CAVA, M.J.B, GRACIÁ, C.M., CASTÓN, M.J.P. Folate and folic acid intake estimation and food enrichment requirements. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 55(1): 5-14, 2005.
22. MCCARTHY, M. On the balance, folic acid fortification benefits elderly. **Lancet**, 349: 35, 1997.
23. MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. **Nutrition Bulletin**, 29(2): 111-142, 2004.
24. MICKUS, R.R. Seal enriching additives on white rice. **Food Engineering**, 27: 91-160, 1955.
25. MISAKI, M., YASUMATSU, K. Rice fortification and enrichment. **The American Association of Cereal Chemists**, 38: 289-402, 1985.
26. MUSKIET, F.A.J. The importance of early folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 20(3): 403-410, 2005.
27. PEIL, A., BARRET, F., RHA, C., LANGER, R. Retention of micronutrients by polymer coatings used to fortify rice. **Journal of Food Science**, 47: 260-262, 1981.
28. RADER, J.I., WEAVER, C.M., ANGYAL, G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. **Food Chemistry**, 70: 275-289, 2000.
29. SHRESTHA, A.K., ARCOT, J., PATERSON, J.L. Edible coating materials – their properties and use in the fortification of rice with folic acid. **Food Research International**, 36: 921-928, 2003.
30. TAMURA, T. Determination of food folate. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, 9: 285-293, 1998.
31. VARSANYI, I., SMOGYI, L. Determination of the shelf life of food products. **Acta Alimentaria**, 12(2): 73-100, 1983.
32. VORA, A., RIGA, A., DOLLIMORE, D., ALEXANDER, K.S. Thermal stability of folic acid. **Thermochemica Acta**, 302-393: 209-220, 2002.
33. VORA, A., RIGA, A., DOLLIMORE, D., ALEXANDER, K. Thermal stability of folic acid in the solid-state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 75(3): 709-717, 2004.

**Artigo a ser submetido à publicação no Journal of Agricultural
Food Chemistry**

CAPÍTULO IV – ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DO ARROZ ENRIQUECIDO

CREPALDI, P.F. e GODOY, H.T.
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Departamento de Ciência de Alimentos
C.P. 6121 CEP 13083-970
crepaldi_bauru@yahoo.com.br

RESUMO

Primeiro de Janeiro de 1998 foi a data em que tornaram-se efetivas as regulamentações do FDA sobre a obrigatoriedade nos EUA da fortificação, em níveis especificados nas regulamentações federais, com o ácido fólico de uma ampla variedade de produtos cereais. Desde então, o ácido fólico tem sido usado, em todo mundo, em processos de enriquecimento alimentar incluindo o arroz e seus produtos. Entretanto, existem poucos dados na literatura que garantem a estabilidade dessa vitamina durante os diferentes tipos de processamento e, principalmente, durante o período de armazenamento desses alimentos enriquecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade do ácido fólico durante a vida de prateleira de amostras de arroz tipo 1 polido e integral enriquecidos expostos ou não à luz natural. Para os arrozes cozidos, percebeu-se que as concentrações de ácido fólico mantiveram-se de acordo com os valores declarados nos rótulos do produto até o quarto mês para o arroz polido e até o sexto mês para o arroz integral, independentemente das condições de armazenamento. No entanto, após seis meses de armazenamento, perdas consideráveis da vitamina foram notadas (18,3% para arroz integral e 34,6% para arroz polido, em média). Sob a exposição à luz, as perdas durante o armazenamento foram de 31,4% e 39,1% para arrozes crus integral e polido, respectivamente, e 5,2% e 30,1% para arrozes integral e polido crus armazenados ao abrigo da luz. As perdas do ácido fólico com o cozimento após ambas condições de armazenamento foram menores para o arroz integral (13,9%) em

comparação às perdas do arroz polido (26%), no entanto, o arroz integral estocado na ausência de luz e cozido durante 20 minutos não mostrou qualquer perda da vitamina.

SUMMARY

January 1, 1998 was the effective date for FDA regulations that mandated the fortification in the USA of a wide range of enriched cereal-grain products with folic acid at levels specified in federal regulations. Therefore, folic acid has been used, around the world, in enrichment processes including that of rice and rice based products. However, there are insufficient data in the literature which warrant the stability of this vitamin during the different kinds of processing and mainly during the storage period of these enriched foods. The objective of this study was to evaluate the stability of folic acid during the shelf-life of enriched samples of type 1 milled rice and brown rice exposed or not on natural light. For the crude ones, it was shown that the concentrations of folic acid were in accordance with those declared on the label of the product until the fourth month for milled rice and until the sixth month for the brown rice, independently of the storage conditions. Nevertheless, after six months of storage, considerable losses of vitamin were noticed (18,3% for brown rice and 34,6% for milled rice, on average). Under light conditions, the losses during storage was 31,4% and 39,1% for brown and milled crude rices, respectively, and 5,2% and 30,1% for brown and milled crude rices stored in absence of the light. The losses of folic acid in cooking after both storage conditions were lower in brown rice (13,9%) than in milled rice (26%), therefore, the brown rice stored in absence of light and cooked in 20 minutes showed no loss of the vitamin.

INTRODUÇÃO

Em muitos países, comissões científicas avaliam periodicamente as evidências sobre as necessidades de nutrientes específicos para a população. Nos EUA, o Food and Nutrition Board do Institute of Medicine, pertencente à

National Academy of Sciences, adotou uma nova abordagem para as Cotas Dietéticas Recomendadas (CDR) publicadas desde 1941. O desenvolvimento das Ingestões Dietéticas de Referência (IDR) amplia e substitui as CDR. A IDR constitui uma família de valores de referência, que são estimativas quantitativas da ingestão de nutrientes para uso no planejamento e na avaliação das dietas para pessoas saudáveis.

O Food and Nutrition Board iniciou um projeto de vários anos para ampliar a base das recomendações quantitativas sobre a ingestão de nutrientes, que abrange a avaliação dos nutrientes e de outros componentes alimentares quanto a seu impacto sobre a saúde. O projeto estende-se além dos critérios necessários para evitar a ocorrência de deficiências clássicas e incluir a revisão de dados relacionados com o risco de doenças crônicas (GOODMAN e GILMAN, 2004). À medida que a comissão permanente de avaliação científica das IDR do Food and Nutrition Board conclui a revisão de cada grupo de nutrientes, os relatórios são publicados.

Defeitos no tubo neural, um grupo de anormalidades congênitas que incluem a anencefalia e a spina bífida, são estritamente relacionados a um consumo materno insuficiente dos folatos, um grupo de vitaminas do complexo B que desempenham papéis específicos no metabolismo intracelular, durante o período pré-concepcional (BROUWE et al., 2001; FRENCH et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2004; SMULDERS e STEHOUWER, 2005). O atual índice da IDR dos folatos para gestantes, publicado em 1998 nos EUA, é de 500-600 µg/dia ou mais (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998).

Em reconhecimento à necessidade de diminuir o risco de defeitos no tubo neural, muitos programas de fortificação alimentar foram instituídos nos EUA e em muitos países em desenvolvimento, como o Brasil. Em março de 1996 a United States Food and Drug Administration (FDA) publicou uma regulamentação determinando que a todos os cereais e produtos de origem cereal, incluindo arroz, farinhas, cereais matinais, macarrão, entre outros, fossem adicionados 140 µg de ácido fólico por 100g do produto (FDA, 1996).

No Brasil, os altos índices de anemia e de doenças causadas pela deficiência de ácido fólico na população brasileira, como os problemas no tubo neural fetal, levaram o Ministério da Saúde e a Anvisa, através da publicação da Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, a partir de junho de 2004. Cada 100g de farinha de trigo e de milho deve conter 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (ANVISA, 2005). A tendência é a extensão dessa regulamentação à outros produtos cereais, a exemplo do que ocorre em outros países.

A princípio, o arroz pode ser considerado um alimento ideal para a fortificação com o ácido fólico pois é a base da dieta de mais da metade da população mundial além de ser, quando beneficiado, uma das mais pobres fontes de folato e outras vitaminas hidrossolúveis dentre os cereais (JULIANO, 1990; MARSHALL et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 2005; MCKEVITH, 2004). No entanto, valor nutricional do arroz enriquecido pode ser influenciado em resultado ao método usado em seu preparo para o consumo e armazenamento (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003, RADER, WEAVER e ANGYAL, 2000).

As vitaminas são compostos considerados bastante lábeis. Vários são os fatores que influenciam as perdas desses nutrientes em alimentos processados, como pH, oxigênio, luz, temperatura, concentrações de sal e açúcares, atividade de água, presença de catalisadores metálicos, agentes antioxidantes e tipo de embalagem (VARSANYI e SOMOGYI, 1983).

Para o arroz, a maioria dos métodos utilizados para a fortificação utilizam ácidos (BRAMALL, 1986; JOSEPH, LIUZZO e RAO, 1990; MICKUS, 1955; MISAKI e YASUMATSU, 1985) o que fazem deles métodos inapropriados para a fortificação com o ácido fólico, já que a vitamina é instável sob condições ácidas (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

Muitos autores relatam que a estabilidade dos folatos, durante o período de estocagem dos alimentos, depende principalmente da quantidade de antioxidantes e de oxigênio presentes além da exposição direta do produto à luz (FAVIER et al., 1987; FORD et al., 1969; LIMA e GODOY, 2001; VIBERG et al., 1997).

Embora o ácido fólico seja considerado quimicamente mais estável que os folatos naturalmente presentes nos alimentos, suas soluções são sensíveis à luz o que pode levar à sua fotodecomposição em ácido p-aminobenzoilglutâmico mais pterina, essas moléculas formadas acabam por sensibilizar a fotodegradação em cadeia da vitamina (LOWRY, BESSEY e CRAWFORD, 1949; OFF et al., 2005). Em um ensaio, onde leites esterilizados foram deixados em atmosfera inerte e estocados no escuro e na presença de luz, nenhuma redução significativa dos folatos foi notada nas amostras estocadas na ausência de luz, porém nas amostras expostas à luz houve degradação de 10% (SCOTT et al., 1984).

No preparo de rocamboles, o processo de assamento é responsável pela perda de 20-25% do ácido fólico produzidos com farinha fortificada, no entanto, nenhuma perda significativa na concentração do ácido fólico foi notada em 90 dias de armazenamento dos pães à 20°C (JOHANSSON et al., 2002). Durante o cozimento em excesso de água durante 20 minutos, o arroz polido fortificado com o ácido fólico sem o uso de qualquer revestimento perdeu quase a totalidade da vitamina adicionada enquanto que outros arrozes revestidos tiveram uma perda entre 61-93% para a água de cozimento. A perda pelo cozimento foi menor com o uso da etilcelulose no revestimento, provavelmente devido à impermeabilidade do filme à água (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

FORD et al. (1969), FAVIER et al. (1987) e RENNER et al. (1989) 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 ascórbico protetor e o oxigênio um agente que atua na degradação dos folatos.

Dessa forma, estudos que permitam uma melhor elucidação da estabilidade do ácido fólico em alimentos enriquecidos são de fundamental importância no sentido de validar um programa governamental de fortificação alimentar, além de garantir a qualidade dos produtos, assegurando durante a vida de prateleira dos mesmos o valor nutricional inicialmente proposto, os resultados desses trabalhos acabam por orientar o produtor na sobredosagem necessária da vitamina, assim

como nas melhores condições de embalagem, transporte e armazenamento do alimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Arroz Tipo 1 Polido

No Brasil, apenas uma empresa, até o momento, fabrica arroz polido enriquecido com ácido fólico. Um lote do arroz foi adquirido em supermercado da cidade de Campinas-SP, com preocupação de se obter embalagens com data de vencimento a mais longa quanto possível (já que a empresa não declara a data de fabricação do produto) para um posterior estudo de vida de prateleira. O lote foi composto por quatorze embalagens de 500g, sendo duas destinadas aos testes iniciais e duas destinadas às análises de vida de prateleira para cada um dos períodos analisados (meses 2, 4 e 6) para as embalagens expostas à luz, em condição semelhante à encontrada na maioria dos supermercados do país, e para as embalagens acondicionadas ao abrigo da luz. Cada embalagem teve seu conteúdo homogeneizado antes da retirada da amostra para análise.

Os arrozes cozidos foram preparados de forma caseira, tendo como ingredientes apenas 90g do arroz enriquecido e 250mL de água, 90g do arroz enriquecido e 500mL de água, e 90g do arroz enriquecido refogado em 4 colheres de óleo e cozido em 375mL de água. Foram cozidos em fogão convencional a temperatura baixa, por aproximadamente 10, 20 e 15 minutos, respectivamente, até que a água de cozimento houvesse secado. O arroz foi deixado esfriar até a temperatura ambiente (25°C), amassado em almofariz, homogeneizado e sua umidade avaliada antes da tomada da amostra. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

Arroz Integral

O arroz integral foi adquirido em estabelecimento comercial de Campinas-SP e conduzido o enriquecimento, já que não existem fabricantes nacionais do arroz integral enriquecido. O arroz foi analisado para comprovar a ausência de ácido fólico e interferentes. O enriquecimento do lote foi conduzido no Laboratório de Análise de Alimentos a partir da adição de quantidade conhecida do ácido fólico ao produto (150µg/100g) que foi posteriormente homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador por um período de 2 horas. O ensaio de fortificação foi feito utilizando todo o arroz que seria empregado posteriormente nas análises do período de vida de prateleira. Após ser fortificado, porções de 500g de arroz integral fortificado foram reembaladas em suas embalagens originais com auxílio de seladora térmica, sendo que cada embalagem armazenada foi destinada a cada um dos períodos analisados (meses 2, 4 e 6) para as embalagens acondicionadas em exposição à luz e para as embalagens acondicionadas ao abrigo da luz. Após o processo de fortificação, foram tomadas, de cada embalagem, 2 amostras de 1,0g do arroz e realizada a análise para se determinar, não só o conteúdo de ácido fólico mas, a homogeneidade do produto.

Assim como feito para o arroz polido, os arrozes integrais cozidos foram preparados de forma caseira, tendo como ingredientes apenas 90g do arroz enriquecido e 375mL de água, e 90g do arroz enriquecido e 625mL de água. Foram cozidos em fogão convencional a temperatura baixa, por aproximadamente 20 e 30 minutos, respectivamente, até que a água de cozimento houvesse secado. O arroz foi deixado esfriar até a temperatura ambiente (25°C), amassado em almofariz, homogeneizado e sua umidade calculada antes da tomada da amostra. As determinações foram sempre realizadas em duplicata.

REAGENTES

O padrão de ácido fólico foi adquirido da SIGMA cód. F-7876, lote 40H321, a acetonitrila grau cromatográfico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico foi obtido da Synth. 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 FHLP 1300), com poros de 0,45µm de diâmetro e posteriormente desgaseificadas.

EQUIPAMENTO

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido VARIAN série 9060, com alça de amostragem de 10µL de capacidade, bomba ternária equipado com sistema de detecção por UV. A coluna Microsorb-MV (C₁₈ ODS-2, 12X4,6mm, 5µm) produzida pela Rainin LC e comercializada pela VARIAN-USA foi utilizada para o processo cromatográfico.

MÉTODO

Arroz Tipo 1 Polido

Para a análise do ácido fólico em arroz tipo 1 polido, utilizou-se a metodologia desenvolvida e validada por CREPALDI e GODOY (2005) para esse tipo de alimento.

Para a determinação da vitamina no alimento cru, o ácido fólico foi extraído de 1,0g de arroz, previamente homogeneizado e pulverizado em moinho, com 3,0mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e 3,0mL de acetonitrila por 10 minutos em banho ultra-sônico. Ao extrato foram adicionados 3,5mL de tampão fosfato e 500µL de ácido tricloroacético. A partir de então, seguiram-se as etapas de filtração, a primeira em papel filtro comum e a segunda em membranas MILLIPORE (FHLP 1300), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado no cromatógrafo a líquido (10µL).

Para a extração da vitamina nas amostras de arroz cozido, o alimento foi deixado esfriar até a temperatura ambiente (25°C), amassado em almofariz, homogeneizado, tomados 5g de amostragem e conduzido o procedimento de extração utilizado para o arroz cru dobrando-se o volume das soluções empregadas.

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min, com 95% de fase móvel aquosa (FMa: composta por 20mL de ácido acético glacial e 700µL de hidróxido de potássio 50%, o volume foi aferido com água MILLI-Q a 1L em balão volumétrico) e 5% de fase móvel orgânica (FMb: composta exclusivamente de acetonitrila) no início da corrida, chegando aos 20 minutos a 80% de FMa e 20% de FMb. As condições cromatográficas iniciais foram retomadas gradativamente até os 25 minutos, mantendo-se essa proporção até os 30 minutos, tempo necessário ao reequilíbrio da coluna cromatográfica. A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos, 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, espectros de absorção e pureza no DAD e por co-cromatografia. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, através de curva analítica construída com 5 níveis de concentração (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

Arroz Integral

Para a análise de ácido fólico nos arrozes integral cru e cozidos, as metodologias de extração foram as mesmas descritas anteriormente para arroz tipo 1 polido, utilizando metodologia desenvolvida e validada por CREPALDI e GODOY (2005).

Quanto às condições cromatográficas, o ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5mL/min iniciando-se a corrida com 95% de FMa e 5% de FMb, chegando aos 20 minutos em 76% de FMa e 24% de FMb. As condições cromatográficas iniciais foram retomadas gradativamente até os 25 minutos, mantendo-se essa proporção até os 30 minutos, tempo necessário ao reequilíbrio da coluna cromatográfica. A detecção, identificação e quantificação foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos utilizados e citados anteriormente para o arroz polido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis cromatográficos das amostras de arroz enriquecido tipo 1 polido cru e cozido podem ser observados na **Figura 1**. Nos cromatogramas o pico do ácido fólico (AF) aparece isolado e com tempo de retenção de, aproximadamente, 14 minutos nas amostras cruas e de 17 minutos nas amostras cozidas. Os cromatogramas das amostras enriquecidas do arroz integral cru e cozido podem ser visualizados na **Figura 2**, sendo que o tempo de retenção da vitamina nas amostras cruas foi de, aproximadamente, 16 minutos e nas amostras cozidas 17 minutos.

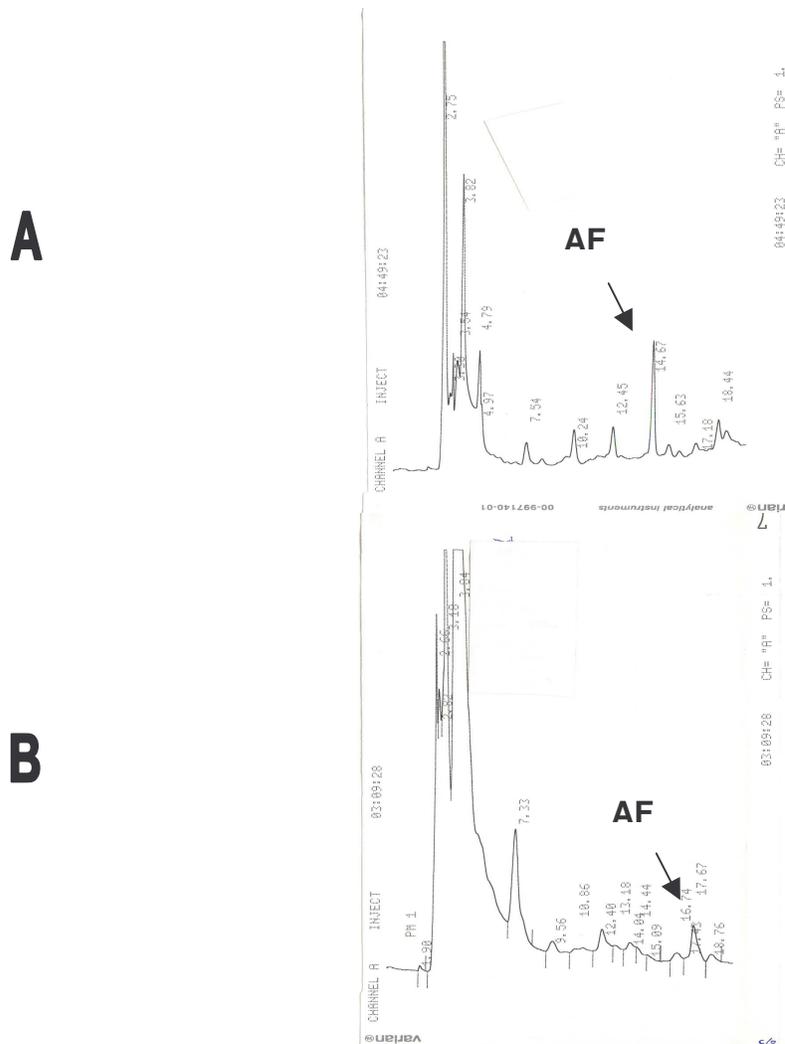


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato do arroz tipo 1 polido cru (A) e cozido (B) enriquecidos com ácido fólico.

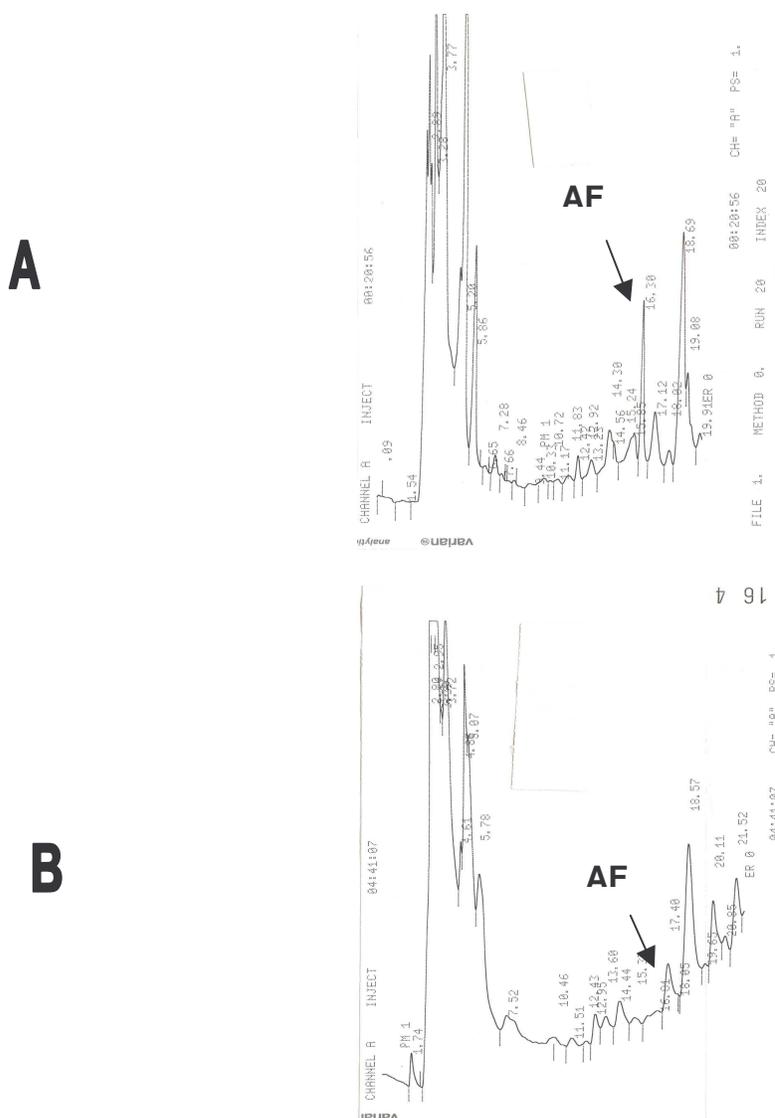


Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato do arroz integral cru (A) e cozido (B) enriquecidos com ácido fólico.

As curvas analíticas traçadas por padronização externa de ambos os processos cromatográficos apresentaram boa linearidade na faixa de concentração aplicada. A curva analítica para o arroz polido está disposta no Anexo 1 e a do arroz integral no **Anexo 2**.

Tanto as amostras de arroz polido enriquecido encontradas no mercado quanto às amostras de arroz integral posteriormente enriquecidos em laboratório não contavam em suas embalagens originais com informação quanto à data de

fabricação, mas apenas quanto à data de vencimento do alimento, dessa forma buscou-se adquirir amostras com prazo de vencimento o mais longo possível em relação à data de compra.

Os teores de ácido fólico encontrados nos produtos crus e cozidos são apresentados na **Tabela 1**. Um problema de homogeneidade do ácido fólico adicionado ao arroz polido industrializado e mesmo da vitamina adicionada em laboratório ao arroz integral foi constatado pelos resultados de análises dos mesmos produtos utilizados nesse trabalho (CREPALDI e GODOY, 2005).

No lote analisado, o arroz industrializado polido apresentou, quando cru, uma concentração de ácido fólico 40% maior à declarada em seu rótulo e mesmo após o cozimento em 20 minutos, processamento que levou à maior perda da vitamina, a concentração de ácido fólico manteve-se 10,5% acima da declarada no rótulo do produto. A respeito do arroz integral enriquecido, a dificuldade em se pesar a quantidade inicialmente proposta do ácido fólico aliada à instabilidade e imprecisão da balança analítica utilizada nesse ensaio, foram os fatores que levaram-nos a encontrar, no alimento cru, uma quantidade quase 50% acima da proposta para o enriquecimento. Após o cozimento em 20 minutos a concentração de ácido fólico caiu a um valor equivalente a 55% da concentração inicialmente proposta (150µg/100g).

Tabela 1. Teores de ácido fólico em arrozes enriquecidos tipo 1 polido e integral, crus e cozidos.

Amostra	Compra	Vencimento	Rótulo (µg/100g)	Análise	Tratamento	Ácido Fólico (µg /100g)	
						M ± DP	CV (%)
Arroz Tipo 1 Polido	22/11/04	17/07/05	148	26/11/04	Cru	207,1 ± 3,9	1,9
					Coz. 10'	165,5 ± 1,9	1,1
					Coz. 20'	163,6 ± 1,9	1,1
					Coz. C/O	185,6 ± 4,6	2,5
Arroz Integral	12/02/05	06/10/05	150 *	21/02/05	Cru	224,9 ± 5,8	2,6
					Coz. 20'	82,2 ± 4,4	5,3
					Coz. 30'	100,2 ± 0,7	0,7

M ± DP – média aritmética e estimativa de desvio padrão das determinações em duplicata.

CV – coeficiente de variação.

*Concentração proposta para o ensaio de enriquecimento laboratorial

As **Tabelas 2 e 3** mostram os valores referentes à concentração de ácido fólico obtida durante a estocagem do arroz polido e integral, respectivamente, para condições de armazenamento das embalagens diretamente expostas ou ao abrigo da luz natural. Já as **Tabelas 4 e 5** apresentam os dados pelo teste de TUKEY, respectivamente para arroz tipo 1 polido e para arroz integral, relacionando os teores de ácido fólico encontrados inicialmente e após os tratamentos térmicos a que foram submetidos cada matriz ao longo do período de estocagem.

Tabela 2. Concentrações de ácido fólico em arroz tipo 1 polido, durante período de estocagem.

		Concentração de Ácido Fólico ($\mu\text{g}/100\text{g}$)				
		M \pm DP CV(%)				
Mês da Análise	Armazenamento	Cru	Coz. 10'	Coz. 20'	Coz. c/ Óleo	Média Tratamentos
2	Presença de Luz	165,3 \pm 8,2 5,0	147,7 \pm 5,7 3,8	142,8 \pm 1,5 1,0	142,3 \pm 20,1 14,2	149,5 \pm 10,8 7,2
2	Ausência de Luz	196,8 \pm 15,8 8,1	165,63 \pm 4,86 2,93	147,3 \pm 12,7 8,6	181,7 \pm 21,2 11,7	172,9 \pm 21,3 12,3
4	Presença de Luz	152,9 \pm 4,0 2,6	145,3 \pm 9,5 6,5	129,6 \pm 0,2 0,1	137,4 \pm 7,4 5,4	141,3 \pm 10,0 7,1
4	Ausência de Luz	149,4 \pm 9,0 6,02	128,6 \pm 12,7 9,9	144,1 \pm 8,5 5,9	139,2 \pm 3,2 2,3	140,3 \pm 8,9 6,3
6	Presença de Luz	126,3 \pm 1,5 1,2	116,7 \pm 5,7 4,9	110,6 \pm 2,4 2,1	124,37 \pm 1,93 1,55	119,5 \pm 7,2 6,1
6	Ausência de Luz	144,7 \pm 0,7 0,5	131,0 \pm 3,9 3,0	140,4 \pm 6,4 4,5	138,1 \pm 8,0 5,8	138,5 \pm 5,7 4,1

M \pm DP – média aritmética e estimativa de desvio padrão das determinações em duplicata.
CV – coeficiente de variação.

Tabela 3. Concentrações de ácido fólico em arroz integral, durante período de estocagem.

		Concentração de Ácido Fólico ($\mu\text{g}/100\text{g}$)			
		M \pm DP CV(%)			
Mês da Análise	Armazenamento	Cru	Coz. 20'	Coz. 30'	Média Tratamentos
2	Presença de Luz	174,0 \pm 11,0 6,3	81,5 \pm 0,5 0,6	97,1 \pm 6,1 6,23	117,5 \pm 49,5 42,2
2	Ausência de Luz	218,5 \pm 0,2 0,1	85,9 \pm 2,8 3,2	101,1 \pm 3,1 3,07	135,2 \pm 72,6 53,7
4	Presença de Luz	180,5 \pm 1,0 0,53	73,7 \pm 3,6 4,9	82,8 \pm 1,1 1,4	112,3 \pm 59,2 52,7
4	Ausência de Luz	212,2 \pm 3,5 1,7	83,9 \pm 2,6 3,1	88,4 \pm 0,9 1,04	128,2 \pm 72,8 56,8
6	Presença de Luz	154,3 \pm 4,2 2,7	69,8 \pm 2,0 2,9	82,7 \pm 3,8 4,6	102,3 \pm 45,5 44,5
6	Ausência de Luz	213,1 \pm 1,5 0,7	86,0 \pm 5,2 6,0	91,0 \pm 2,3 2,6	130,1 \pm 72,0 55,3

M \pm DP – média aritmética e estimativa de desvio padrão das determinações em duplicata.
CV – coeficiente de variação.

Os resultados das análises mostram uma perda contínua e proporcional do teor do ácido fólico nas amostras avaliadas bimestralmente.

Quando se compara os arrozes crus, o arroz integral perde em média ao final da vida de prateleira 18,3% da quantidade inicialmente determinada da vitamina enquanto que o arroz polido perde 34,6% do seu teor.

Tabela 4. Análises de variância do arroz tipo 1 polido pelo teste de Tukey durante o armazenamento da matriz.

Mês da Análise	Armazenamento	Concentração de Ácido Fólico (µg/100g)				MDS	CV (%)
		Cru	Coz. 10'	Coz. 20'	Coz. c/ Óleo		
0	ND	207,1 Aa	165,5 Ca	163,6 Ca	185,6 Ba	8,3	2,0
2	Presenta de Luz	165,3 Ab	147,7 ABb	142,8 Bbc	142,3 Bb	20,3	6,0
2	Ausência de Luz	196,8 Aa	165,6 ABa	147,3 Bab	181,7 ABa	38,0	9,7
4	Presenta de Luz	152,9 Abc	145,3 ABbc	129,6 Cc	137,4 BCb	12,3	3,9
4	Ausência de Luz	149,4 Abc	128,6 Bd	144,1 ABbc	139,2 ABb	17,2	5,4
6	Presenta de Luz	126,3 Ad	116,7 Bd	110,6 Bd	124,4 Ab	6,8	2,5
6	Ausência de Luz	144,7 Ac	131,0 Acd	140,4 Abc	138,1 Ab	14,0	4,5
	MDS	18,3	16,2	16,9	28,6		
	CV (%)	4,7	4,7	5,0	7,9		

As letras maiúsculas relacionam-se horizontalmente, as minúsculas verticalmente. Concentrações significativamente distintas entre si são representadas por diferentes letras do alfabeto, aos valores pertencentes a um mesmo grupamento de Tukey são dadas as mesmas letras.

CV – coeficiente de variação.

MDS – mínima diferença significativa.

Tabela 5. Análises de variância do arroz integral pelo teste de Tukey durante o armazenamento da matriz.

Mês da Análise	Armazenamento	Concentração de Ácido Fólico (µg/100g)			MDS	CV (%)
		Cru	Coz. 20'	Coz. 30'		
0	ND	224,9 Aa	82,2 Bab	100,2 Cab	17,6	3,1
2	Presenta de Luz	174,0 Abc	81,5 Bab	97,1 Bab	30,4	6,2
2	Ausência de Luz	218,5 Aa	85,9 Ca	101,1 Ba	10,0	1,8
4	Presenta de Luz	180,5 Ab	73,7 Bab	82,8 Bc	9,5	2,0
4	Ausência de Luz	212,2 Aa	83,9 Ba	88,4 Bbc	10,8	2,0
6	Presenta de Luz	154,3 Ac	69,8 Bb	82,7 Bc	14,4	3,4
6	Ausência de Luz	213,1 Aa	86,0 Ba	91,0 Babc	14,2	2,6
	MDS	20,5	13,2	12,4		
	CV (%)	2,6	4,2	3,4		

As letras maiúsculas relacionam-se horizontalmente, as minúsculas verticalmente. Concentrações significativamente distintas entre si são representadas por diferentes letras do alfabeto, aos valores pertencentes a um mesmo grupamento de Tukey são dadas as mesmas letras.

CV – coeficiente de variação.

MDS – mínima diferença significativa

As **Figuras 3 e 4** ilustram o comportamento da vitamina nas amostras analisadas neste trabalho, durante o referido período de estocagem em armazenamento das embalagens em exposição ou ao abrigo da luz natural. Os pontos representam a média do lote.

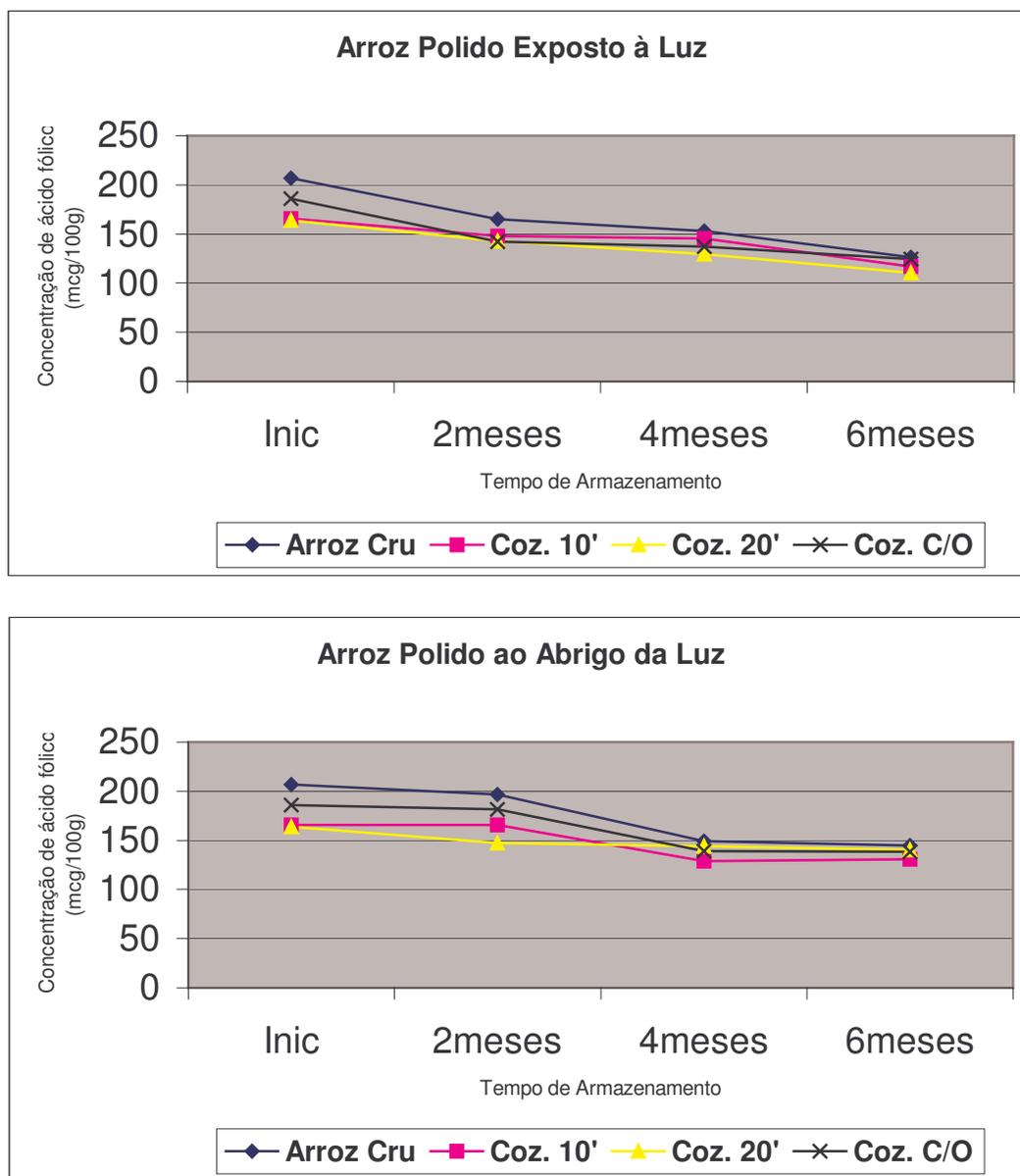


Figura 3. Comportamento do ácido fólico durante as estocagens do arroz tipo 1 polido.

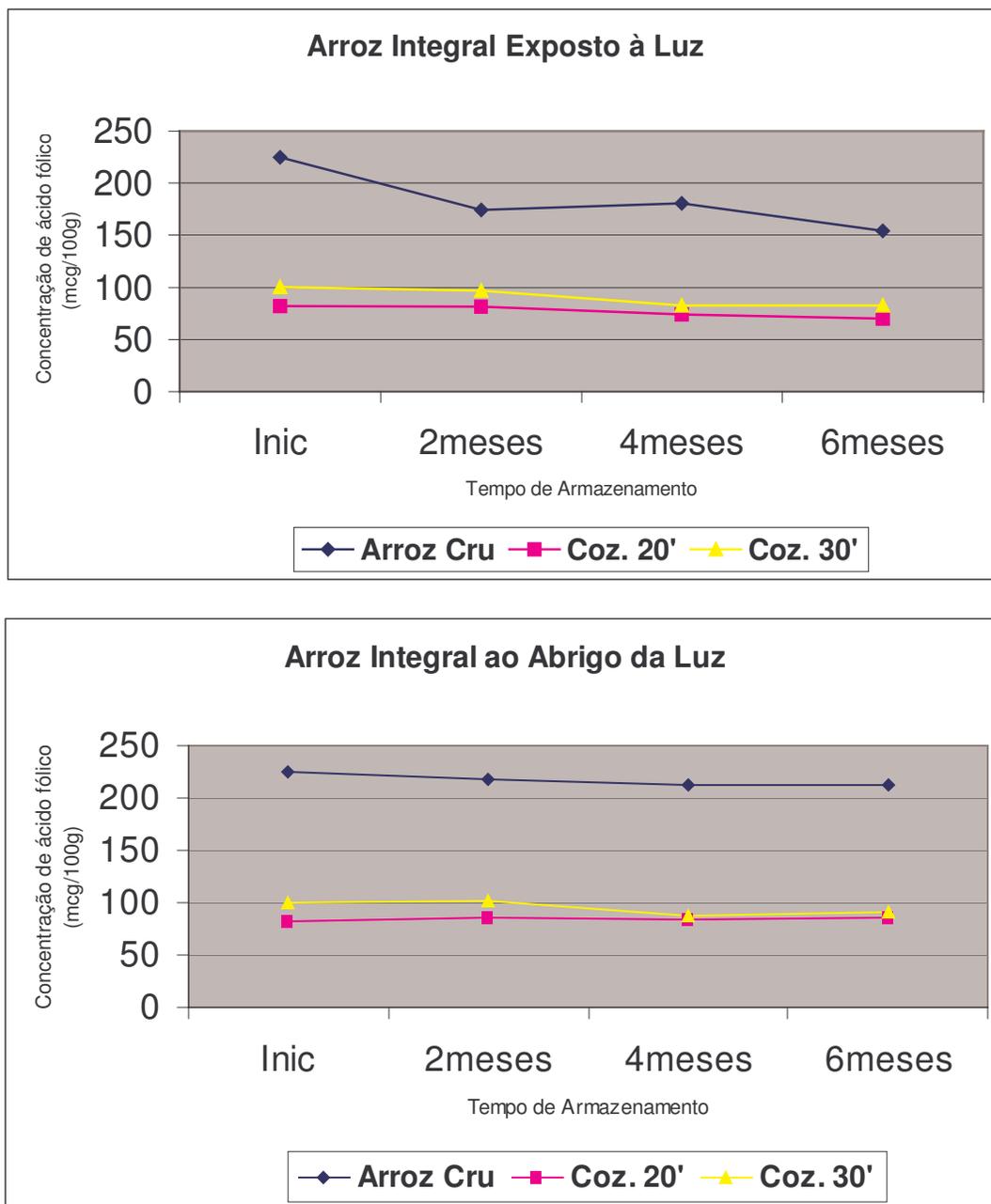


Figura 4. Comportamento do ácido fólico durante as estocagens do arroz integral.

A degradação térmica inicial causada pelo cozimento do arroz é visivelmente maior no arroz integral, sendo que a partir de então essa passa a ter uma porcentagem de degradação menor do que a do arroz polido (**Figuras 3 e 4**). A **Figura 3** sugere que, provavelmente, todos os arrozes polidos armazenados em exposição à luz natural e que foram preparados para o consumo em até 60 dias

após as análises iniciais, independentemente do modo de cozimento, continham a vitamina no alimento pronto para o consumo na concentração determinada na embalagem. Os arrozes armazenados ao abrigo da luz continham valores ligeiramente maiores do que os encontrados em cada período de análise do arroz exposto à luz, no entanto, das amostras processadas para o consumo, nenhuma alcançou o quarto mês de análise com o teor de vitamina declarado no rótulo.

A **Figura 4** deixa claro que nenhuma forma termicamente processada para o consumo do arroz integral, independentemente do modo de armazenamento, alcançou em qualquer período de análise o teor de ácido fólico de 150µg/100g. Já o arroz integral cru apresentou boa estabilidade quando ao abrigo da luz, tendo uma pequena perda ao redor de 5% da concentração inicial do ácido fólico. SCOTT et al. (1984) em ensaios envolvendo leites esterilizados também não percebeu nenhuma redução significativa nos níveis de folatos do alimento estocado no escuro por 6 meses, porém nas amostras expostas à luz notou degradação de 10% da concentração inicial

Diferenças na composição das matrizes e mesmo um possível emprego de polímeros de revestimento na preparação industrial do arroz polido enriquecido, podem ser apontados como possíveis promotores dessa maior retenção da vitamina (SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

Muitos dos fatores que diferem duas matrizes distintas podem estar relacionados a esses comportamentos diferenciados dos arrozes na promoção da estabilidade do ácido fólico ao longo de um período de armazenamento como a presença de agentes antioxidantes naturais e sintéticos, catalisadores e mesmo a presença de certos polímeros adicionados industrialmente ao arroz polido enriquecido a fim de se evitar a lixiviação da vitamina e que acabaria também por influenciar na diminuição da atividade de água do grão (GUJSKA e MAJEWSKA, 2005; JOHANSSON et al., 2002; OSSEY, WEHLING e ALBRECHT, 2001).

Também foram consideradas estatisticamente significativas as perdas da vitamina ocorridas durante os processamentos térmicos a que foram submetidos ambos os tipos de arroz, fato também relatado por outros autores (CORT et al., 1976; PEIL et al., 1981; SHRESTHA, ARCOT e PATERSON, 2003).

No caso específico do arroz integral, surpreendentemente, o cozimento em 30 minutos levou a uma menor perda de ácido fólico quando comparado a um cozimento em 20 minutos algo que apenas poderia ser supostamente justificado a uma menor temperatura média de preparo do arroz cozido em 30 minutos devido ao maior volume de água empregado.

Utilizando o teste de TUKEY, visualizou-se que no caso do arroz polido não há diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados na análise inicial dos arrozes cru ou processados e os valores dos respectivos tratamentos empregados após 60 dias nas embalagens armazenadas ao abrigo da luz, algo que já não ocorre nesse mesmo período nas embalagens armazenadas em exposição à luz. As diferenças nas concentrações do ácido fólico entre as análises iniciais e o os períodos de análise permaneceram estatisticamente insignificantes até os seis meses de armazenamento ao abrigo da luz.

O arroz integral mantido ao abrigo da luz, a exemplo do que também ocorreu com o arroz polido mantido nessas condições, manteve um mesmo agrupamento de TUKEY para o arroz cru e cozidos ao longo dos 6 meses de estudo de vida de prateleira do alimento. O arroz integral cozido durante 20' manteve-se sem diferença estatística significativa no teor de ácido fólico, tanto das embalagens armazenadas em exposição ou ao abrigo da luz, até o quarto mês de análise.

A exposição direta do produto à luz, é apontada por muitos autores como um dos principais fatores críticos à manutenção da estabilidade do ácido fólico e dos folatos nos alimentos, os resultados desse trabalho tomados nessas condições confirmam essa influência da luz na manutenção do teor da vitamina (FAVIER et al., 1987; FORD et al., 1969; VIBERG et al., 1997; LIMA e GODOY, 2001).

A porcentagem de perda média entre os tratamentos, após 6 meses, variou de 21,3 a 33,5% respectivamente para arroz integral e polido armazenados em exposição à claridade e de 4,8 a 22,7% para arroz integral e polido armazenados ao abrigo da luz (**Tabela 6**).

Tabela 6. Porcentagem de perda de ácido fólico durante o período de estocagem dos arrozes analisados.

Amostra	Tratamento	Perda Média ao Final da Vida de Prateleira (%)	
		Presença de Luz	Ausência de Luz
Arroz Tipo 1 Polido	Cru	39,1	30,1
	Coz. 10'	29,5	20,9
	Coz. 20'	32,4	14,2
	Coz. c/ Óleo	33,1	25,6
Perda Média entre Tratamentos (%)		33,5 ± 4,0	22,7 ± 6,8
Arroz Integral	Cru	31,4	5,2
	Coz. 20'	15,1	0*
	Coz. 30'	17,5	9,2
Perda Média entre Tratamentos (%)		21,3 ± 8,8	4,8 ± 4,6

*Não foi detectada perda significativa da vitamina nessas condições.

É sabido, a muito tempo, que a degradação do ácido fólico pode ser influenciada por diversos fatores tais como oxigênio, luz, temperatura, atividade de água, presença de catalisadores metálicos, agentes antioxidantes e tipo de embalagem (VARSANYI e SOMOGYI, 1983). Baseado nesse conhecimento e nos resultados obtidos do nosso estudo, observou-se que muitos desses conhecidos fatores são capazes de influenciar na vida de prateleira do arroz enriquecido.

CONCLUSÕES

No arroz polido enriquecido disponível no mercado, os resultados das análises indicam uma boa estabilidade da vitamina no alimento ao longo dos 6 meses de armazenamento, no entanto, o teor do ácido fólico mencionado no rótulo do produto apenas é alcançado até o quarto mês de estocagem em ambas condições de armazenamento do arroz cru. Para o arroz integral cru, a quantidade do ácido fólico adicionado permitiu uma estabilidade comparativamente ainda maior do que a obtida pelo arroz polido cru, assim, em ambos modelos de estocagem o alimento apresentou ao final dos seis meses um teor de vitamina acima do inicialmente proposto (150µg/100g).

As perdas da vitamina durante o período de estocagem, para ambos os arrozes, não ocorreu em níveis acentuados mesmo nas embalagens expostas à luz, no entanto, as perdas de todos os tratamentos das embalagens expostas ou não à luz foram consideradas estatisticamente significativas ao final dos 180 dias de armazenamento.

O arroz integral apresentou menor resistência aos cozimentos e já no período inicial da análise, o alimento termicamente processado manteve apenas, aproximadamente, a metade do valor vitamínico proposto para o consumo que era de 150µg/100g. Fato que pode estar relacionado à ausência de agentes tecnológicos promotores da estabilidade do ácido fólico no arroz integral e mesmo às diferenças da composição dessa matriz em relação ao arroz polido.

Levando-se em conta que as embalagens dos produtos hoje comercializados não são hermeticamente fechadas, permitem a passagem de luz, a entrada de oxigênio e umidade, além de que os comerciantes não possuem controle de temperatura desse tipo de alimento durante seu armazenamento e o consumidor final desconhece o modo mais apropriado para o preparo desse arroz, os resultados aqui obtidos apenas corroboram os já conhecidos fatores críticos à estabilidade do ácido fólico em um alimento enriquecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fortificação de Farinhas**. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>. Acesso em 12/2005.
2. BRAMALL, L.D. A novel process for fortification of rice. **Food technology in Australia**, 38: 281-284, 1986.
3. BROWE, I.A., VAN DUSSELDOR, M., WES, C.E., STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. **Nutrition Research Reviews**, 14(2): 267-293, 2001.
4. CORT, W.M., BORENSTEIN, B., HARLEY, J.H., OSADCA, M., SCHEINER, J. Nutrient stability of fortified cereal products. **Food Technology**, 30: 52-62, 1976.
5. CREPALDI, P.F., GODOY, H.T. Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de ácido

- fólico em arroz enriquecido. **6º. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, São Paulo: Campinas, 2005. 1 CD-ROM.
6. FAVIER, J.C., CHRISTIDES, J.P., POITER, G., LÉGER, J.J. Folic acid content of foods. III.. Folic acid content of different categories of milk. **Science des Aliments**, 7(1): 23-40, 1987.
 7. FDA. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. **Federal Register**, 61: 8781-8791, 1996.
 8. FORD, J.E., PORTER, J.W.G., THOMPSON, S.Y., TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J. Effects of ultra-high-temperature processing and of subsequent storage on the vitamin content in milk. **Journal of Dairy Research**, 36: 447-449, 1969.
 9. FRENCH, A.E., GRANT, R., WEITZMAN, S., RAY, J.G, VERMEULEN, M.J., SUNG, L., GREENBERG, M., KOREN, G. Folic acid fortification is associated with a decline in neuroblastoma. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, 74: 288-294, 2003.
 10. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.
 11. GUJSKA, E., MAJEWSKA, K. Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. **Plant Foods for Human Nutrition**, 60(2): 37-42, 2005.
 12. INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington, USA: National Academic Press, 1998.
 13. JOHANSSON, M., WITTHOFT, C.M., BRUCE, A., JÄRGERSTAD, M. Study of wheat breakfast rolls fortified with folic acid. The effect on folate status in women during a 3-month intervention. **European Journal of Nutrition**, 41: 279-286, 2002.
 14. JOSEPH, E.W., LIUZZO, J.A., RAO, R.M. Development of wash and cook-proof methods for vitamin enrichment of rice grains. **Journal of Food Science**, 55: 1102-1107, 1990.
 15. JULIANO, B.O. Rice grain quality: problems and challenges. **Cereal Foods World**, 35: 245-253, 1990.
 16. LIMA, J.A., GODOY, H.T. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 93p., 2001.
 17. LOWRY, O.H., BESSEY, O.A., RAWFORD, E.J. Photolytic and enzymatic transformations of pteroylglutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, 180(1): 389, 1949.
 18. MARSHAL, W.E., WADSWORTH, J.I. **Rice science and technology**. New York, USA: Marcel Dekker, 1994.
 19. MARTÍNEZ, A.B., BERRUEGO, G.R., CAVA, M.J.B, GRACIÁ, C.M., CASTÓN, M.J.P. Folate and folic acid intake estimation and food enrichment requirements. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 55(1): 5-14, 2005.

20. MCKEVITH, B. Nutritional aspects of cereals. **Nutrition Bulletin**, 29(2): 111-142, 2004.
21. MICKUS, R.R. Seal enriching additives on white rice. **Food Engineering**, 27: 91-160, 1955.
22. MISAKI, M., YASUMATSU, K. Rice fortification and enrichment. **The American Association of Cereal Chemists**, 38: 289-402, 1985.
23. OFF, M.K., STEINDAL, A.E., POROJNICU, A.C., JUZENIENE, A., VOROBAY, A., JOHNSON, A. MOAN, J. Ultraviolet photodegradation of folic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 80(1), 47-55, 2005.
24. OSSEY, E.S., WEHLING, R.L., ALBRECHT, J.A. HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chemistry**, 78(4): 375-378, 2001.
25. PEIL, A., BARRET, F., RHA, C., LANGER, R. Retention of micronutrients by polymer coatings used to fortify rice. **Journal of Food Science**, 47: 260-262, 1981.
26. RADER, J.I., WEAVER, C.M., ANGYAL, G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. **Food Chemistry**, 70: 275-289, 2000.
27. RENNER, E. **Micronutrients in milk and milk-based food products**. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1989.
28. SCOTT, K.J., BISHOP, D.R., ZECHALCO, A., EDWARDS-WEBB, J.D. Nutrient content of liquid milk. II. Content of vitamin C, riboflavin, folic acid, thiamin, vitamins B12 and B6 in pasteurized milk as delivered to the home and after storage in the domestic refrigerator. **Journal of Dairy Research**, 51(1): 51-54, 1984.
29. SHRESTHA, A.K., ARCOT, J., PATERSON, J.L. Edible coating materials – their properties and use in the fortification of rice with folic acid. **Food Research International**, 36: 921-928, 2003.
30. SMULDERS, Y.M., STEHOUWER, C.D.A. Folate metabolism and cardiovascular disease. **Seminars in Vascular Medicine**, 5(2): 87-97, 2005.
31. VARSANYI, I., SMOGYI, L. Determination of the shelf life of food products. **Acta Alimentaria**, 12(2): 73-100, 1983.
32. VIBERG, U., JÄGERSTAD, M., ÖSTE, R., SJÖHOLM, I. Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen. **Food Chemistry**, 59(3): 381-386, 1997.

CONCLUSÕES GERAIS

As metodologias desenvolvidas por CLAE, para a análise de ácido fólico em arroz tipo 1 polido e integral fortificados e em suas respectivas águas de lavagem, apresentaram-se eficientes, considerando os parâmetros de validação do método (limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade e recuperação), onde os valores encontrados nos limites de quantificação, ficaram abaixo do índice de enriquecimento exigido para esses alimentos pelo FDA e pela legislação em vigor em diversos países.

O desenvolvimento e a validação destas metodologias específicas à análise dessa vitamina nesses dois tipos de arroz e em suas águas de lavagem permite monitorar com maior fidelidade a estabilidade do ácido fólico nessas matrizes além de ser ferramenta útil na fiscalização sanitária.

A pesquisa sobre a estabilidade do ácido fólico adicionado aos dois diferentes tipos de arroz, submetidos à lavagem e a diferentes processamentos térmicos, comuns na prática cotidiana doméstica, mostrou a ocorrência de grandes perdas no teor da vitamina. O arroz polido industrializado mostrou-se significativamente mais resistente, tendo uma capacidade de retenção até duas vezes maior que a do arroz integral enriquecido em laboratório, fato que não impediu a perda de quantidade considerável da vitamina. Mas o grande problema entre os processamentos foi mesmo a lavagem dos arrozes, levando a perdas nunca inferiores a 85% do teor de ácido fólico.

Independentemente dos comportamentos distintos das matrizes frente à retenção do ácido fólico, há uma perda muito grande da vitamina, sendo desaconselhada a lavagem do arroz enriquecido até que novos métodos de enriquecimento a permitam.

Quanto ao enriquecimento em si, assim como constatado em outros estudos publicados, a homogeneização do ácido fólico adicionado ao alimento parece ser também um real problema na produção de um arroz enriquecido já que tanto os lotes do arroz polido industrializado quanto o integral enriquecido em laboratório mostraram concentrações estatisticamente distintas da vitamina, no

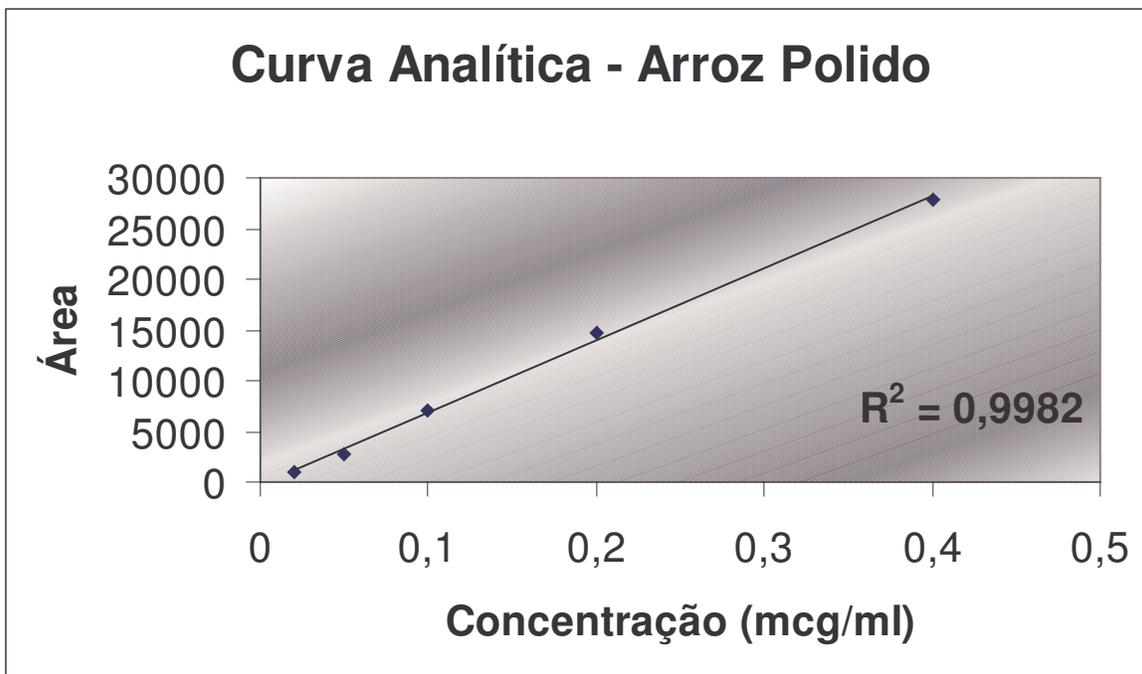
entanto, nenhum lote analisado possuía inicialmente o teor de vitamina abaixo do declarado no rótulo do produto ou do proposto para o enriquecimento em laboratório.

Os estudos de vida de prateleira de ambos os tipos de arroz indicam uma boa estabilidade da vitamina no alimento cru ao longo do período de 6 meses de armazenamento das embalagens expostas ou não à luz natural. No entanto, o teor do ácido fólico mencionado no rótulo do arroz polido apenas é alcançado até o quarto mês de estocagem em ambas condições de armazenamento do arroz cru.

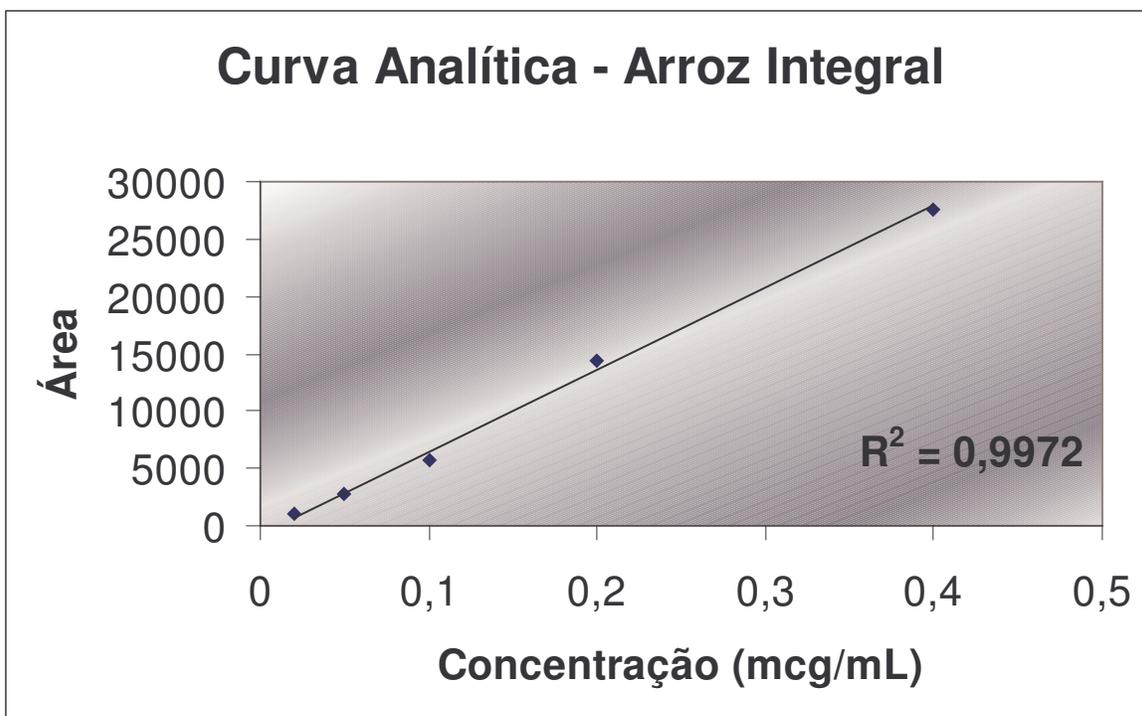
Dos arrozes armazenados ao abrigo da luz foram obtidos valores ligeiramente maiores para a concentração do ácido fólico do que os encontrados em cada período de análise dos arrozes expostos à luz, no entanto, das amostras processadas para o consumo, nenhuma alcançou o quarto mês de análise com o teor de vitamina declarado no rótulo, sendo que no caso do arroz integral a análise inicial de suas formas termicamente processadas já indicava um teor menor ao valor proposto para o enriquecimento (150µg/100g).

Embora muitos autores considerem o arroz um alimento ideal para a fortificação com o ácido fólico, as concentrações finais da vitamina no alimento pronto para o consumo podem ser consideradas pífias caso não surjam estudos para o melhor planejamento de adição e homogeneização da vitamina a esse tipo de produto, melhores condições de embalagem e armazenamento, assim como que seja notificado nessa embalagem o melhor preparo do arroz, visando melhorar a eficiência do processo, a fim de minimizar as perdas da vitamina.

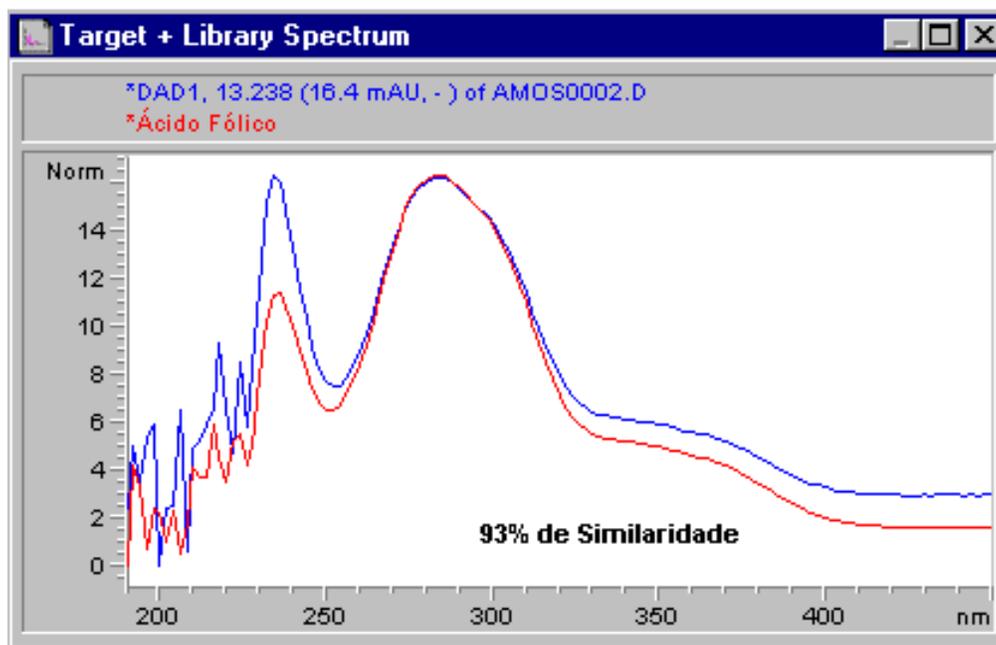
ANEXOS



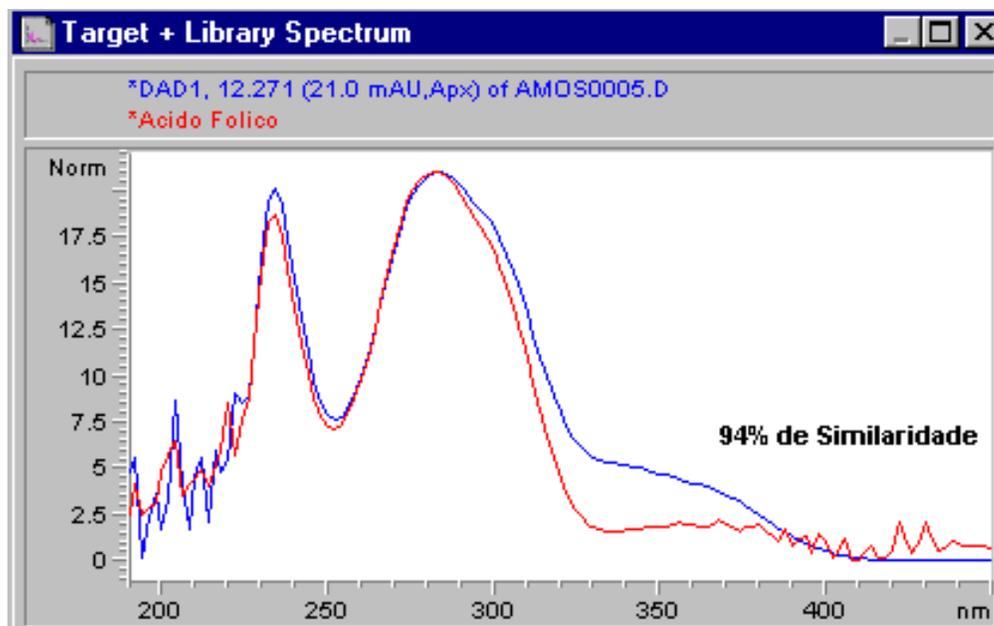
ANEXO 1: Curva analítica do ácido fólico para arroz tipo 1 polido e sua água de lavagem, obtida por padronização externa e traçada com média de triplicatas.



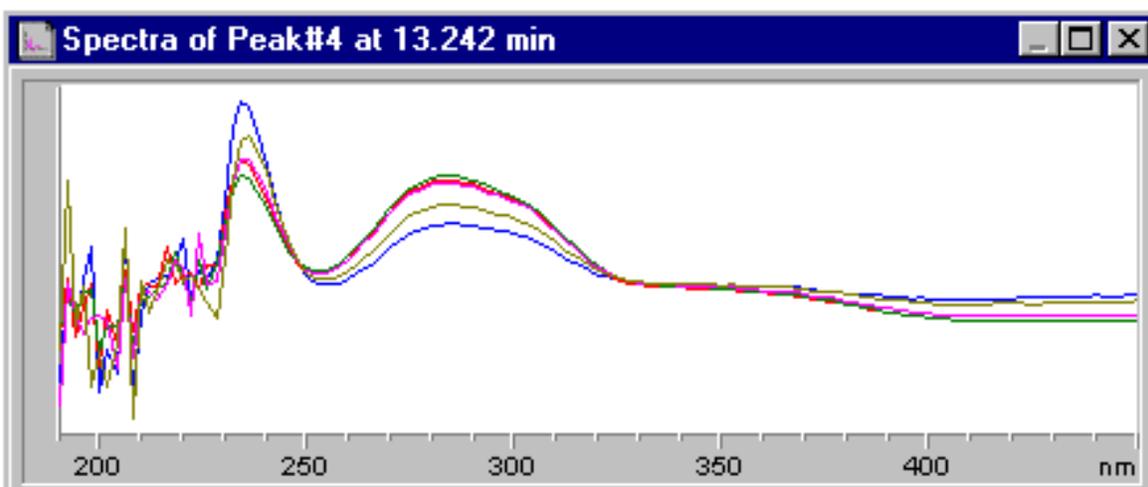
ANEXO 2: Curva analítica do ácido fólico para arroz integral e sua água de lavagem, obtida por padronização externa e traçada com média de triplicatas.



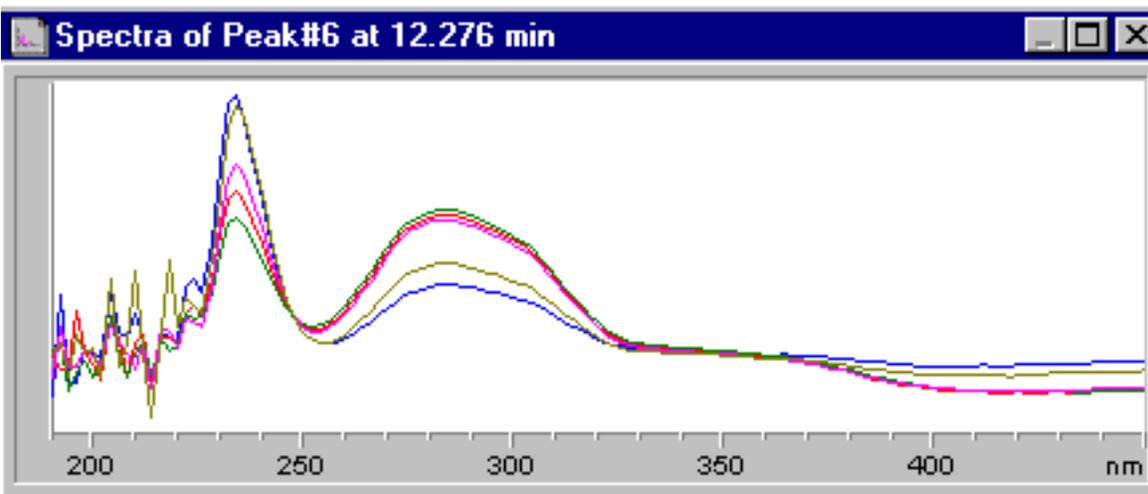
ANEXO 3: Perfis dos espectros de absorção, obtidos através do detector de arranjo de diodos, de solução padrão de ácido fólico e arroz tipo 1 polido enriquecido.



ANEXO 4: Perfis dos espectros de absorção, obtidos através do detector de arranjo de diodos, de solução padrão de ácido fólico e arroz integral enriquecido.



ANEXO 5: Análise do grau de pureza do pico correspondente ao ácido fólico em arroz tipo 1 polido através da obtenção dos seus espectros de absorção.



ANEXO 6: Análise do grau de pureza do pico correspondente ao ácido fólico em arroz integral através da obtenção dos seus espectros de absorção.