



DANIELA ANDRADE NEVES

**“BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DO ÁCIDO FÓLICO EM
PÃO FRANCÊS E AVALIAÇÃO DE SUA ESTABILIDADE
TÉRMICA”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DANIELA ANDRADE NEVES

**“BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DO ÁCIDO FÓLICO EM
PÃO FRANCÊS E AVALIAÇÃO DE SUA ESTABILIDADE
TÉRMICA”**

Orientadora: Prof^a. Dra. Helena Teixeira Godoy

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELA ANDRADE NEVES
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA.HELENA TEIXEIRA GODOY**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

N414b Neves, Daniela Andrade, 1988-
Bioacessibilidade in vitro do ácido fólico em pão francês e avaliação de sua estabilidade térmica / Daniela Andrade Neves. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.
Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Coorientador: Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido fólico. 2. Vitamina. 3. Fortificação. 4. Análise térmica. 5. Difração de Raios-X. I. Godoy, Helena Teixeira, 1957-. II. Oliveira, Giovanna Pisanelli Rodrigues de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Folic acid in vitro bioaccessibility in bread and evaluation of its thermal stability

Palavras-chave em inglês:

Folic acid

Vitamin

Fortification

Thermal analysis

X-Ray diffraction

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Adriana Dillenburg Meinhart

Ana Cecília Poloni Ribka

Data de defesa: 02-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

Dra. Adriana Dillenburg Meinhart
Membro Titular
FEA – UNICAMP

Dra. Ana Cecília Poloni Ribka
Membro Titular
Embrapa Semiárido

Profa. Dra. Maria Teresa Mendes Ribeiro Borges
Membro Suplente
CCA – UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
Membro Suplente
FEA – UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico e agradeço especialmente aos meus pais
Roberto de Freitas Neves e Elisa Cristina Andrade Neves

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho, o qual me trouxe a UNICAMP onde aprendi lições valiosas e pude conhecer pessoas maravilhosas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, especialmente ao Departamento de Ciência de Alimentos pelo suporte e conhecimentos transmitidos.

Ao CNPQ pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Helena Godoy por toda a disposição, atenção e contribuição ao longo deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora pelas contribuições e sugestões apresentadas.

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei e que sempre me encorajaram a persistir apesar das adversidades.

Ao meu namorado Kleidson que sempre esteve ao meu lado não importa a distância e que sempre soube o momento certo de me ajudar, de me dar bronca e de me fazer rir.

À Tici, minha querida irmã que sempre foi uma fonte de admiração, um muito obrigada, entre outras coisas por me abrigar em diversos fins de semana, facilitando minha adaptação longe de casa.

À Lara Lima pela amizade e por estar sempre presente apesar da distância.

Aos meus amigos Janclei, Wellington, Lenaice, Thaís, Polly, Tayse, Maria Rosa Matheus, Danilo por me ajudarem não apenas na parte experimental, mas também por todo o apoio, por tornarem meus dias mais leves, agradáveis e divertidos, e por aumentarem meus conhecimentos culturais.

Ao Sr. Dirceu por me ajudar imensamente ao lavar minhas vidrarias e por tudo que ele faz pelo laboratório.

As técnicas Renata e Marcela por toda a colaboração e apoio.

À profa. Juliana Pallone, Giovanna Oliveira, Carlos Suzart e Elede Elias pelo apoio e por estarem sempre disponíveis para tirar minhas dúvidas.

Ao Rafael Nogueira por me ajudar na obtenção da farinha de trigo.

Ao professor Rômulo Angélica, Susy, Paula, André e Pedro do Laboratório de Diração de raios X do Centro de Geociências da UFPA por toda a ajuda.

À Bruna por me ajudar na utilização da centrífuga.

Ao Sr. Diamantino por possibilitar a preparação do pão.

Aos colegas do Laboratório de Análise de Alimentos pelo apoio.

À todos que me ajudaram nessa jornada e que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO I - ÁCIDO FÓLICO: REVISÃO

1 FOLATOS E ÁCIDO FÓLICO	7
1.1 FONTES	9
1.2 ESTABILIDADE	10
1.3 ABSORÇÃO	12
1.4 DEFICIÊNCIAS DE ÁCIDO FÓLICO NO ORGANISMO HUMANO	13
1.5 DOSES DIÁRIAS	17
1.6 TOXICIDADE	18
1.7 BIODIPONIBILIDADE, BIOEFICIÊNCIA E BIOACESSIBILIDADE.....	18
1.8 MÉTODOS DE ANÁLISE DE BIOACESSIBILIDADE.....	20
1.9 MÉTODOS DE ANÁLISE DE FOLATOS	21
2 MICROENCAPSULAÇÃO.....	22
3 ANÁLISES DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO ÁCIDO FÓLICO.....	24
REFERÊNCIAS	25

CAPÍTULO II - BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DO ÁCIDO FÓLICO EM PÃO FRANCÊS FORTIFICADO

RESUMO.....	35
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 REAGENTES, SOLVENTES E AMOSTRAS.....	39
2.2 PREPARO DO PÃO FRANCÊS	39
2.3 ANÁLISE DE UMIDADE.....	40
2.4 ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO.....	40
2.5 VALIDAÇÃO METODOLOGIA ÁCIDO FÓLICO EM UPLC	42
2.6 ANÁLISE DE BIOACESSIBILIDADE	42
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 VALIDAÇÃO	45
3.2 ANÁLISE DA AMOSTRA DE FARINHA DE TRIGO E PÃO FRANCÊS.....	45
3.3 BIOACESSIBILIDADE DE ÁCIDO FÓLICO EM PÃO FRANCÊS	47
4 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	48

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE ÁCIDO FÓLICO LIVRE E MICROENCAPSULADO

RESUMO	53
ABSTRACT	54
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1 MATERIAIS	56
2.2 UMIDADE	56
2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	56
2.4 ANÁLISES TERMICAS.....	57
2.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	57
2.6 ANÁLISE DE ESTABILIDADE TÉRMICA DO ÁCIDO FÓLICO	58
2.7 LEVANTAMENTO DAS CURVAS DE TEMPERATURA NO INTERIOR DO FORNO E DO PÃO DURANTE ASSAMENTO.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ÁCIDO FÓLICO.....	59
3.2 ANÁLISES TERMICAS DO ÁCIDO FÓLICO.....	60
3.2.1 Ácido fólico livre	60
3.2.2 Ácido fólico microencapsulado	62
3.3 ANÁLISES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO ÁCIDO FÓLICO.....	63
3.3.1 Difração de raios-X de ácido fólico livre submetidos a aquecimento	65
3.3.2 Difração de raios-X de ácido fólico microencapsulado	66
3.4 DEGRADAÇÃO TÉRMICA DA FARINHA DE TRIGO	68
3.5 CURVA TÉRMICA DURANTE O ASSAMENTO DE PÃO	70
4 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
 CONCLUSÃO GERAL	 76

RESUMO GERAL

A bioacessibilidade é a proporção de um composto ingerido que apresenta-se disponível no intestino para ser absorvido. A verificação da bioacessibilidade do ácido fólico presente em amostras de pão francês produzidos com farinha de trigo fortificada foi realizada através da simulação *in vitro* da digestão, o que permite a avaliação da eficiência do processo de fortificação da farinha de trigo. O teor de ácido fólico das amostras de farinha de trigo, pão francês e dos extratos obtidos a partir da simulação da digestão foram determinados por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), e em seguida, foram calculadas as retenções do ácido fólico em cada uma das amostras e extratos. Para a verificação da influência da temperatura e tempo de aquecimento na degradação de amostras de padrão de ácido fólico livre e microencapsulado foram realizadas análises térmica diferencial e termogravimétrica (ATD-TG) e difração de raios-X (DRX). Os resultados mostraram que o ácido fólico apresentou retenção de 85% e aproximadamente 70% nas etapas de homogeneização e assamento do pão francês, respectivamente, enquanto que a bioacessibilidade do ácido fólico foi de 100% nas amostras analisadas. As amostras de padrão de ácido fólico apresentaram total degradação após exposição a 155°C por 35 min e 175°C por 15 min. Já o padrão de ácido fólico microencapsulado apresentou completa decomposição a 100°C por 15min. Assim, pode-se concluir que o processo de enriquecimento das farinhas de trigo com ácido fólico, no que diz respeito ao fabrico de pães francês se mostra eficiente e que novas técnicas de recobrimento e técnicas de microencapsulamento devem ser estudadas para poderem ser aplicadas ao ácido fólico.

Palavras-chave: vitamina B9, fortificação, análise térmica, difração de raios-X.

ABSTRACT

Bioaccessibility is the proportion of a compound ingested that is available to be absorbed. The bioaccessibility of folic acid in bread samples made with fortified wheat flour was carried out through the *in vitro* simulation of the digestion. This vitamin concentration in the flour, bread extracts and in the extracts obtained by de digestion simulation were measured by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Then the folic acid retention was calculated for each sample. The influence of temperature and time in the degradation of free and microencapsulated folic acid standard during a heating process were determined by a thermogravimetric and differential thermal analysis (TG-DTA) and X-ray diffraction (DRX). The results showed that folic acid retention was 85% and near 70% after the flour homogenization and the bread baking, respectively. Even though there were losses during the bread production the folic acid was 100% bioaccessible in the bread samples. The free folic acid standards samples presented total degradation after 35 min at 155°C and 15 min at 175°C exposition. However, the microencapsulated folic acid standards showed a complete degradation under 100°C for 15 min. Thus, it is conclude that in bread fabrication the wheat flour fortification process with folic acid is efficient and that new coating and microencapsulation techniques must be studied in order to be applied to folic acid.

Keywords: B9-vitamin, fortification, thermal analysis, X-ray diffraction.

INTRODUÇÃO GERAL

Para uma alimentação saudável é necessária a ingestão equilibrada de alimentos capazes de fornecerem ao organismo uma quantidade de nutrientes suficientes ao seu funcionamento. Entre esses nutrientes estão os sais minerais e as vitaminas (GUYTON e HALL, 2006). As vitaminas são nutrientes essenciais, não sintetizadas pelo homem, e necessárias em pequenas quantidades, algumas são coenzimas e grupos prostéticos fundamentais para diversas reações metabólicas, outras atuam como componentes do sistema de defesa, antioxidantes e possuem funções específicas como, por exemplo, na visão (NELSON e COX, 2006; GUYTON e HALL, 2006; BELITZ *et al.*, 2009; DAMODARAN *et al.*, 2010).

Uma das vitaminas que vem sendo amplamente estudadas são os folatos devido a problemas relacionados à baixa ingestão. Esse composto também pode ser denominado de vitamina B₉, B_c e ácido pteroilmonoglutâmico (SHARP *et al.*, 2002; QUINLIVAN e GREGORY, 2003; RAVAGLIA *et al.*, 2004; MUSKIET, 2005; EBISCH *et al.*, 2007; FURLANI e GODOY, 2007; SIE *et al.*, 2009; GALVÁN-PORTILLO *et al.*, 2010; NUKOLOVA *et al.*, 2011). Essa é uma vitamina hidrossolúvel pertencente às vitaminas do complexo B e está presente naturalmente em vegetais verdes folhosos, cereais, pão, leite, fígado, rins, gema de ovo, etc (CATHARINO e GODOY, 2001; LIMA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004; CATHARINO *et al.*, 2006; LIMA-PALLONE *et al.*, 2008; BASSETT e SAMMÁN, 2010). Por ser um cofator essencial para as reações metabólicas de transferência de carbono sua deficiência pode estar relacionada a problemas no fechamento do tubo neural, doenças cardiovasculares, cerebrovascular e neurodegenerativas, anemia megaloblástica, entre outras (SCOTT *et al.*, 2000; UEHARA e ROSA, 2010).

Devido ao alto índice de problemas relacionados com a carência dessa vitamina, diversos países iniciaram a fortificação de cereais e farinhas, voluntariamente ou através de legislação (LYNOTT, 2006). Entre esses países encontra-se o Brasil, que tornou obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e de milho com ácido fólico em 2002, com a implantação da RDC nº344, de 13 de dezembro de 2002 (BRASIL, 2002 b). Esses produtos foram escolhidos por serem utilizados para fabricação de produtos panificados, os quais são muito consumidos por todas as classes sociais e em todas as regiões do Brasil (IBGE, 2012). Apesar desse alto consumo, poucos trabalhos foram realizados para avaliar a

bioacessibilidade do ácido fólico, ou seja, a proporção ingerida de ácido fólico presente nos alimentos fortificados que está disponível para a absorção no intestino.

A estimativa da bioacessibilidade é necessária para verificar a eficiência da fortificação, visto que o ácido fólico passa por diversas etapas durante a digestão, nas quais não se sabe qual o seu comportamento. Essa eficiência pode ser avaliada através da utilização de métodos *in vivo* e *in vitro*. O primeiro consome tempo, é oneroso, os resultados são difíceis de serem interpretados, apresenta necessidade de considerações éticas e é mais susceptível a erros. Por esses motivos, estudos *in vitro* são empregados para avaliações preliminares de bioacessibilidade, pois são eficazes, práticos, de baixo custo, possuem boa reprodutibilidade e permitem a obtenção de informações inviáveis através de estudos *in vivo* (PETRONILHO *et al.*, 2012).

O ácido fólico, assim como diversas vitaminas, apresenta baixa estabilidade térmica, porém, pouco se sabe a respeito da sua temperatura de decomposição durante o forneamento de produtos panificados. Na tentativa de minimizar a instabilidade, sua microencapsulação vem sendo estudada, pois assim o contato dessa vitamina com os compostos do alimento e/ou do meio é menor, retardando sua degradação (THIES, 2003; MADZIVA *et al.*, 2005; SHRESTHA *et al.*, 2012; LI e DIOSADY, 2012; LIU *et al.*, 2012; TOMIUK *et al.*, 2012).

Para melhor elucidação da temperatura de degradação do ácido fólico pode-se utilizar análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG), e difração de raios-X (DRX). Essa última é uma técnica não destrutiva, de preparação simples, confiável, rápida, não necessita de grande quantidade de amostra, além de não gerar resíduos tóxicos (WANG e GEIL, 2012).

Logo, os objetivos desse trabalho foram o de avaliar a bioacessibilidade *in vitro* do ácido fólico adicionado a farinha de trigo utilizada na fabricação de pão francês, verificando sua estabilidade durante o processamento e percurso no trato gastrointestinal, avaliando, dessa forma, a eficácia do processo de fortificação da farinha de trigo. Além disso, de observar a influência da temperatura e tempo de degradação do ácido fólico através de análises de ATD-TG e DRX.

REFERÊNCIAS

- BASSETT, M. N.; SAMMÁN, N. C. Folate content and retention in selected raw and processed foods. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 60(3): 298-305, 2010.
- BELITZ, H.-D; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4ed. Revised and Expanded. Berlim: Springer, 2009. p. 1070
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico**. Diário Oficial da União. Brasília, 2002.
- CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Otimização da determinação de ácido fólico em leites enriquecidos através da análise de superfície de resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 21(3): 326-329, 2001.
- CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.; LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para a determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**. 29(5): 972-976, 2006.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 900.
- EBISCH, I. M. W.; THOMAS, C. M. G.; PETERS, W. H. M.; BRAAT, D. D. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Human Reproduction Update**. 13(2): 163–174, 2007.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Contents of folates in edible mushrooms commercialized in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 27(2): 278-280, 2007.
- GALVÁN-PORTILLO, M. V.; OÑATE-OCAÑA, L. F.; PÉREZ-PÉREZ, G. I.; CHEN, J.; HERRERA-GOEPFERT, R.; CHIHU-AMPARAN, L.; FLORES-LUNA, L.; MOHAR-BETANCOURT, A.; LÓPEZ-CARRILLO, L. Dietary folate and vitamin B12 intake before diagnosis decreases gastric cancer mortality risk among susceptible MTHFR 677TT carriers. **Nutrition**. 26: 201–208, 2010.
- GUYTON, A.; HALL, J. **Tratado de fisiologia médica**. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1264.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Alimentares. Consumo alimentar domiciliar “per capita”: Brasil e Grandes regiões. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 22/07/2012.
- LI, Y. O.; DIOSADY, L. L. Microencapsulation and its application in micronutrient fortification through “engineered” staple foods. **Agrofood industry hi-tech**. 23(2): 18-21, 2012.
- LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebidas lácteas enriquecidos – estudo da vida de prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 24(1): 082-087, 2004.

- LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Folatos em vegetais: importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. **Alimentos e Nutrição**. 14(1): 123-129, 2003.
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Determinação de folatos em espinafre: avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 58(1): 81-86, 2008.
- LIU, Y.; GREEN, T. J.; WONG, P.; KITTS, D. D. Microencapsulation of L-5-methyltetrahydrofolic acid with ascorbate improves stability in baked bread products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61: 247–254, 2012.
- LYNOTT, M. **Report of the National Committee on folic acid food fortification**. Dublin: Food Safety Authority of Ireland, 2006. p. 120.
- MADZIVA, H.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Alginate–pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. **Journal of Microencapsulation**. 22(4): 343–351, 2005.
- MUSKIET, F. A. J. The importance of (early) folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. **Reproductive Toxicology**. 20: 403–410, 2005
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. São Paulo: SARVIER, 2006. p. 1202.
- NUKOLOVA, N. V.; OBEROI, H. S.; COHEN, S. M.; KABANOV, A. V.; BRONICH, T. K. Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer. **Biomaterials**. vol 32: 5417-5426, 2011.
- PETRONILHO, S.; MARASCHIN, M.; COIMBAR, M. A.; ROCHA, S. M. In vitro and in vivo studies of natural products: a challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Industrial Crops and Products**. 40: 1-12, 2012.
- QUINLIVAN, E.P.; GREGORY III, J. F. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 77:221–5, 2003.
- RAVAGLIAA, G.; FORTIA, P.; MAIOLIA, F.; SERVADEIA, L.; MARTELLIA, M.; ARNONEA, G.; TALERICOA, T.; ZOLIA, M.; MARIANIB, E. Plasma homocysteine and inflammation in elderly patients with cardiovascular disease and dementia. **Experimental Gerontology**. 39: 443–450, 2004.
- SCOTT, J.; RÉBEILLÉ, F.; FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food Agriculture**. 80:795-824, 2000.
- SHARP, L.; LITTLE, J.; SCHOFIELD, A. C.; PAVLIDOU, E.; COTTON, S. C.; MIEDZYPBRODZKA, Z.; BAIRD, J. O. C.; HAITES, N.E.; HEYS, S. D.; GRUBB, D. A. Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Cancer Letters**. 181: 65–71, 2002.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; YULIANI, S. Susceptibility of 5-methyltetrahydrofolic acid to heat and microencapsulation to enhance its stability during extrusion processing. **Food Chemistry**. 130: 291–298, 2012.
- SIE, K. K.Y. A; CHEN, J.; SOHN, K.; CROXFORD, R.; THOMPSON, L. U.; KIM, Y. Folic acid supplementation provided in utero and during lactation reduces the number of

terminal end buds of the developing mammary glands in the offspring, **Cancer Letters**. 280: 72–77, 2009.

THIES, C. Microcapsules. In: In: CABALLERO, B. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2 ed. Academic Press:Washington, 2003. p. 3892-3903.

TOMIUK, S.; LIU, Y.; GREEN, T. J.; KING, M. J.; FINGLAS, P. M.; KITTS, D. D. Studies on the retention of microencapsulated L-5-methyltetrahydrofolic acid in baked bread using skim milk powder. **Food Chemistry**. 133: 249–255, 2012.

UEHARA, S. K.; ROSA, G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. **Revista de Nutrição**. 23(5): 881-894, 2010.

WANG, Y.; GEIL, P. H. X-ray diffraction. In: **Nanotechnology Research Methods for Foods and Bioproducts**. 1 ed. Oxford: John Wiley & Sons, Inc, 2012. 163-179p

CAPÍTULO I

ÁCIDO FÓLICO: REVISÃO

Daniela Andrade Neves¹, Helena Teixeira Godoy¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP,

1 FOLATOS E ÁCIDO FÓLICO

As vitaminas são componentes minoritários encontrados em alimentos, não são sintetizadas pelo organismo e desempenham funções fundamentais para o metabolismo, tal como a participação em diversas reações enzimáticas (LUKASKI, 2004; LIBERATO e PINHEIRO-SANT'ANA, 2006). Esses compostos são classificados em lipossolúveis, vitaminas A, D, E e K, e hidrossolúveis como a vitamina C e as vitaminas do complexo B (FAO, 2001).

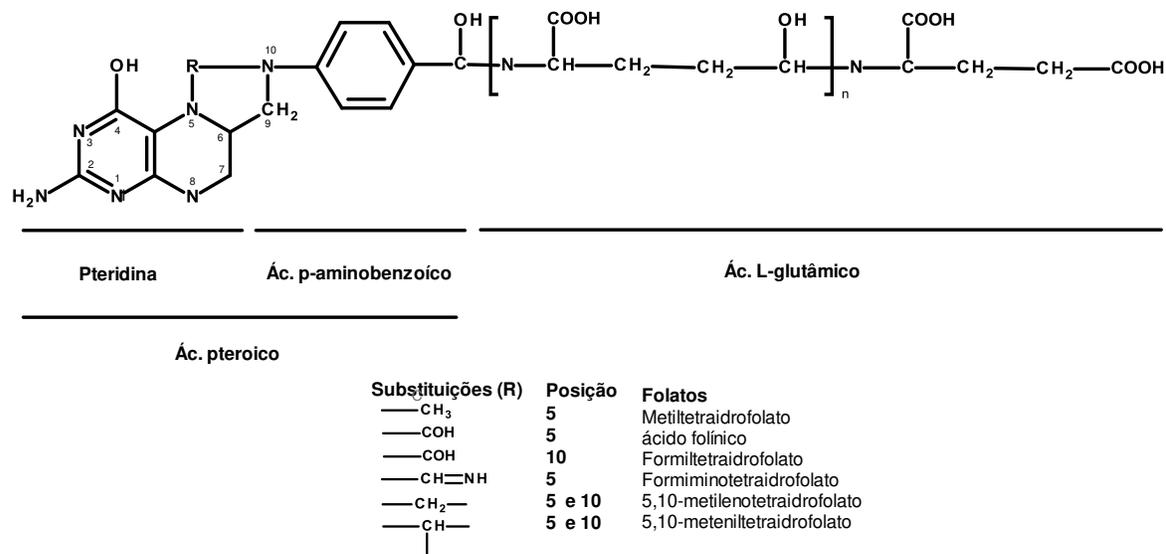
Os folatos (Figura 1 a) fazem parte das vitaminas do complexo B, e também podem ser denominados de vitamina B_c, B₉, M e ácido pteroilmonoglutâmico (CODY, 1991). A estrutura química básica dos folatos consiste de um anel pteridina ligado ao para-aminobenzoato, que por sua vez está associado a resíduos poliglutâmicos. Eles são compostos que apresentam atividade biológica e estão presentes naturalmente em alguns alimentos (BREE *et al.*, 1997; BALUZ *et al.*, 2002; VORA *et al.*, 2004). Dependendo da fonte, nas células e nos alimentos os folatos podem estar ligados a cadeias de 3 a 11 glutamatos apresentando diferentes graus de instabilidade. Essas cadeias de poliglutamatos mantêm o folato dentro das células, aumentam sua afinidade e propriedades cinéticas quando atuam com enzimas folato-dependentes (SCOTT *et al.*, 2000).

O ácido fólico (Figura 1 b) é a forma sintética, totalmente oxidada e utilizada nos processos de fortificação, embora não seja a forma encontrada naturalmente nos alimentos apresenta maior estabilidade dentre os folatos (BREE *et al.*, 1997; BALUZ *et al.*, 2002; VORA *et al.*, 2004).

O ácido fólico é um cristal amarelo com massa molecular de 441,4 g.mol⁻¹ (ARCOT e SHRESTHA, 2005). É pouco solúvel em água fria (1-10 mg.L⁻¹), aumentando sua solubilidade para 1% em água fervente. É mais solúvel em solução aquosa alcalina, com fenol, piridina ou outros solventes básicos (BATES, 2003).

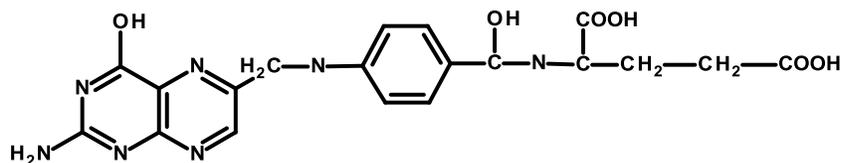
A solubilidade do ácido fólico pode ser devido ao seu maior caráter polar e hidrofílico, que se deve ao seu grupo carboxila adicional. Os folatos (poliglutamados) apresentam uma maior solubilidade que o ácido fólico (monoglutamado) a pH neutro e básico, por possuírem mais grupos carboxil ionizáveis. Enquanto que a pH entre 2-4 há predominância de monocátion e espécies neutras, o que torna o folato pouco solúvel em

água, além do fato de que quanto maior a cadeia glutâmica mais hidrofóbica é a molécula nesta faixa de pH, pois os grupos carboxil apresentam-se protonados (GREGORY, 1989).



(a)

Ácido fólico (Pteroyl-L-glutâmico)



(b)

Figura 1: Estrutura química do (a) folatos e (b) ácido fólico.

Fonte: Adaptado de Fokkema *et al.* (2005), Swiglo (2007) e Roure (2010).

O folato tem sido considerado como uma das vitaminas mais importantes para o metabolismo humano. Ele é um cofator essencial em reações metabólicas de transferência de carbono que ocorre em dois ciclos importantes chamados “ciclo da biossíntese do DNA” e “ciclo de metilação” (Figura 2) (SCOTT *et al.*, 2000). Durante esses ciclos há a síntese de nucleotídeos; interconversão de aminoácidos (metionina-homocisteína); metilação do DNA, RNA e proteínas, sendo essencial em períodos de rápida multiplicação celular como, por exemplo, durante a gestação e na medula óssea. Além disso, atua como antioxidante,

pois inibe a peroxidação lipídica e protege as membranas celulares e o DNA dos danos causados pelos radicais livres (LUKASKI, 2004; MELO, 2004; BOEN *et al.*, 2008; UEHARA e ROSA, 2010).

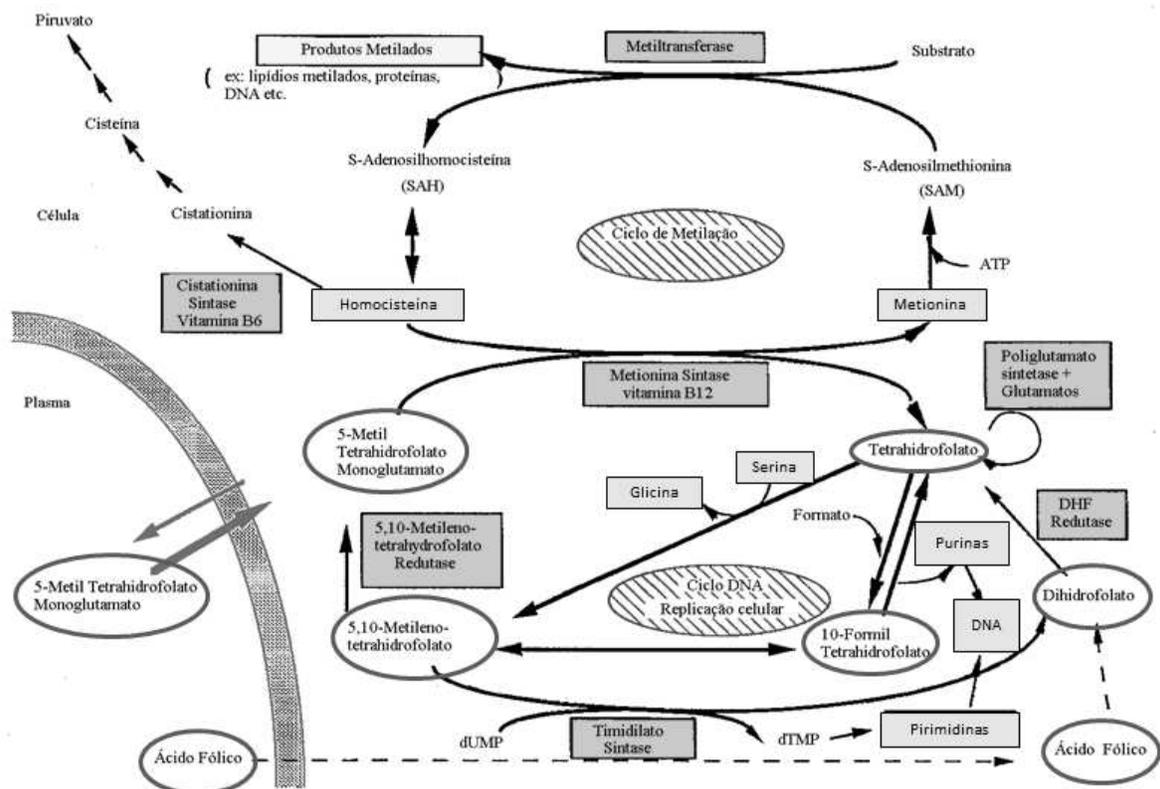


Figura 2: Vias metabólicas dos folatos e do ácido fólico.
Fonte: Scott *et al.* (2000).

1.1 FONTES

Os vegetais verdes folhosos são as principais fontes de folatos, eles também podem ser encontrados em cereais, leite, pães, carnes, fígado, rins e ovos (CATHARINO e GODOY, 2001; FINGLAS e WRIGHT, 2002; LIMA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004; FOKKEMA *et al.*, 2005; CATHARINO *et al.*, 2006; LIMA-PALLONE *et al.*, 2008a; BASSETT e SAMMÁN, 2010), mas uma pequena quantidade de folatos pode ser proveniente da microbiota intestinal *in situ*. No entanto, em humanos, essa é uma fonte minoritária de absorção dessa vitamina (BALUZ *et al.*, 2002; FINGLAS e WRIGHT, 2002; BATES, 2003).

1.2 ESTABILIDADE

Pouco se sabe a respeito da estabilidade dos folatos durante o processamento e estocagem dos produtos alimentícios. Isso se deve as dificuldades encontradas durante os estudos devido a variações na suscetibilidade à degradação; influência de fatores ambientais como pH, concentração de oxigênio, metais, entre outros; e devido as suas diferentes formas e graus de oxidação sendo sua ordem de estabilidade: 5-formiltetrahydrofolato > 5-metiltetrahydrofolato > 10-formiltetrahydrofolato > tetrahydrofolato (LIMA *et al.*, 2003; LIMA-PALLONE *et al.*, 2008 a; BASSET e SAMMÁN, 2010; GREGORY, 2010).

Na Tabela 1 encontra-se a estabilidade de vitaminas em diferentes condições, sendo os folatos as que apresentam menor estabilidade. Entre os folatos, o ácido fólico é o que apresenta maior estabilidade, além de ser a forma comercial mais barata (BATES, 2003). Portanto, é a forma escolhida para o enriquecimento de alimentos, como fórmulas infantis, cereais, farinhas e suplementos nutricionais (SWIGLO, 2007).

Pode-se observar na literatura alguns resultados de estabilidade dessa vitamina diante de diferentes condições. De acordo com Shane (2010), os folatos podem ser armazenados de forma estável na ausência de oxigênio ou na presença de um agente redutor, tal como o ascorbato. Quando em solução aquosa, o ácido fólico é estável a 100°C por 10 min em uma faixa de pH de 5-12 e protegido da luz, no entanto, apresenta uma instabilidade crescente em pH abaixo de 5 (ARCOT e SHRESTHA, 2005). Nguyen *et al.* (2003) verificaram que o ácido fólico apresentou maior estabilidade que o ácido 5-metiltraidofólico em tampão fosfato quando submetido a tratamento térmico acima de 65°C e a tratamento térmico combinado com alta pressão (acima de 800 Mpa).

Lima-Pallone *et al.* (2008 a e b) verificaram que o folato presente em espinafre e brócolis foi perdido principalmente por lixiviação durante o cozimento, e não devido ao processo térmico. Segundo Shrestha *et al.* (2003), houve perda de quase a totalidade do ácido fólico adicionado ao arroz sem revestimento após o cozimento em excesso de água por 20 min. Enquanto Kam *et al.* (2012), verificaram que após a cocção houve uma retenção de 90% do ácido fólico adicionado a arroz parboilizado fortificado.

Tabela 1: Estabilidade de vitaminas em diferentes condições.

Vitamina / Condições	Calor	pH neutro	pH ácido	pH básico	Ar ou oxigênio	Luz
Folatos	I	I	I	I	I	I
Carotenos	I	E	I	E	I	I
Vitamina A	I	E	I	E	I	I
Vitamina D	I	E	E	I	I	I
Vitamina E	I	E	E	E	I	I
Vitamina K	E	E	I	I	E	I
Vitamina B1	I	I	E	I	I	E
Vitamina B2	I	E	E	I	E	I
Vitamina B6	I	E	E	E	E	I
Vitamina B12	E	E	E	E	I	I
Biotina	I	E	E	E	E	E
Niancina	E	E	E	E	E	E
Pantotênico	I	E	I	I	E	E
Vitamina C	I	I	E	I	I	I

E – estável; I – instável.

Fonte: Modificado de GREGORY (2010).

Durante processamento (homogeneização, esterilização e fervura) de leite enriquecido com ácido fólico, Lima-Pallone *et al.* (2006) verificaram que houve uma perda média de 10%. No entanto, Boeneke e Aryana (2008) observaram que a pasteurização (85°C por 30 min) não proporcionou uma diferença significativa no teor de ácido fólico em iogurtes de limão.

O ácido fólico apresentou-se estável durante as quatro etapas (preparo da massa, corte, cocção por vapor e fritura) de produção de macarrão instantâneo frito e possuiu recuperações entre 96-103% (CHEUNG *et al.*, 2009). No preparo de rocamboles com farinha de trigo fortificada com ácido fólico houve perda de 20-35% dessa vitamina, porém, não houve perdas significativas desse composto após 90 dias de armazenamento dos rocamboles a 20°C (JOHANSSON *et al.*, 2002). Segundo Gujska e Majewska (2005),

houve perda de 12 a 21% do folato em pães de trigo e centeio, sendo estas variações dependentes do processo de assamento.

1.3 ABSORÇÃO

Um esquema simplificado da absorção e distribuição dos folatos no organismo humano está disposto na Figura 3. A absorção do ácido fólico ocorre no jejuno por um processo ativo saturável dependente do pH (ótimo 6,5- 7,0) e também da concentração de sódio no meio (UEHARA e ROSA, 2010). A conversão de ácido fólico na mucosa intestinal durante o transporte ativo tem capacidade limitada, entretanto, quando a concentração de ácido fólico ingerido é elevada, sua absorção também pode ocorrer através de difusão passiva. Desse modo, o ácido fólico pode ser encontrado na corrente sanguínea de forma inalterada (KELLY *et al.*, 1997; SHANE, 2010).

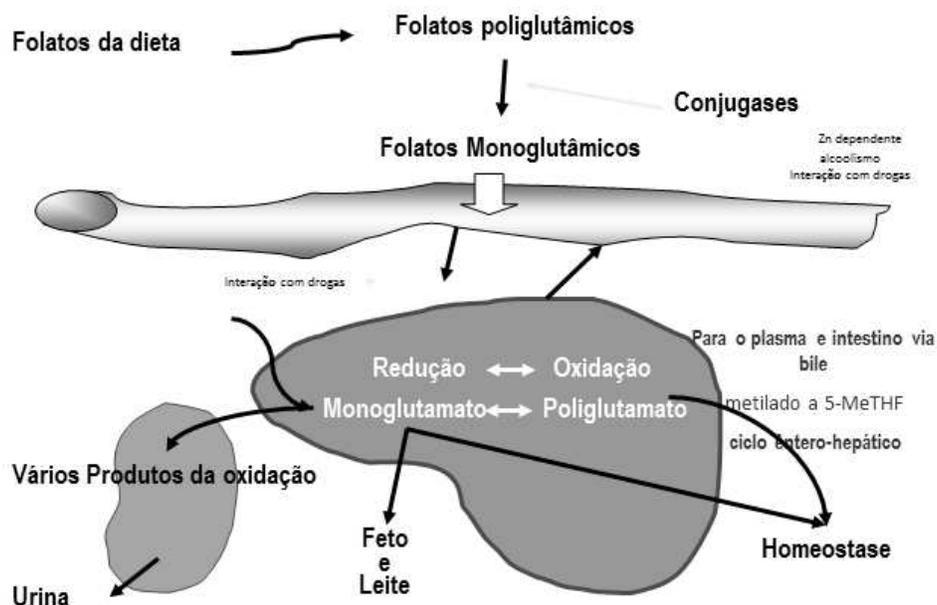


Figura 3: Absorção e distribuição dos folatos no organismo humano.
Fonte: Adaptado de Goodman e Gilman (2004).

O ácido fólico absorvido por transporte ativo é reduzido na mucosa intestinal do jejuno por uma enzima conjugase. Inicialmente ele é convertido à forma diidrofolato, e em

seguida para tetraidrofolato, que é um composto biologicamente ativo. Posteriormente, é enzimaticamente convertido para 5-metiltetraidrofolato, forma metabolicamente inativa (FINGLAS e WRIGHT, 2002; MELSE-BOONSTRA *et al.*, 2004; SHANE, 2010; UEHARA e ROSA, 2010). O ácido fólico absorvido por transporte passivo é reduzido a diidrofolato na sua primeira passagem pelo fígado, e posteriormente, é metabolizado da mesma forma que o ácido fólico absorvido por transporte ativo e as demais formas de folatos.

Na circulação sanguínea, o folato encontra-se na forma de 5-metiltetrahidrofolato, entretanto esse não pode ser mantido dentro das células ou utilizado como coenzima. Para tornar-se biologicamente ativo é necessário que seja metabolizado à tetrahidrofolato pela enzima B₁₂-dependente metionina sintase, essa conversão metila a homocisteína com consequente formação de metionina. O tetrahidrofolato é então convertido à forma poliglutamato, o que permite sua retenção pelas células (KELLY *et al.*, 1997; FINGLAS e WRIGHT, 2002; SUÁREZ-OBANDO *et al.*, 2010).

O 5-metiltetrahidrofolato é transportado pela veia porta para o fígado, que contém 50% do total de folato no organismo. A partir do fígado o ácido fólico pode ser distribuído para os tecidos ou participar da circulação enterohepática e ser secretado na bile. Entretanto, de acordo com Gregory *et al.* (1998) e Lin *et al.* (2004), a maior parte desse folato é reabsorvido e, segundo Finglas e Wright (2002), a eficiência da reabsorção depende da dieta.

1.4 DEFICIÊNCIAS DE ÁCIDO FÓLICO NO ORGANISMO HUMANO

Devido à importância dos folatos no metabolismo humano sua carência pode estar relacionada a diversos problemas no organismo (UEHARA e ROSA, 2010). O baixo nível dessa vitamina e o aumento da concentração de homocisteína no sangue podem estar associados a doenças cerebrovasculares, vascular periférica e doenças coronarianas, assim como a trombose venosa profunda (ROURE, 2010).

A concentração de homocisteína nas células e no plasma é controlada por três diferentes enzimas, sendo que duas delas necessitam de folato como cofator (SCOTT *et al.*, 2000). Logo, uma das causas da hiper-homocisteinemia é a falta de cofatores como a

vitamina B12, o folato e a vitamina B6 para a conversão de homocisteína a metionina ou em cisteína. Essa insuficiência pode ser devido a causas genéticas, nutricionais, transtornos sistêmicos (câncer, doenças renais, entre outros), fatores fisiológicos, drogas (anticonvulsivos, contraceptivos, entre outras) e fatores relacionados ao estilo de vida (tabagismo, abuso de álcool, dieta e falta de atividade física) (SACHDEV, 2004).

Existem vários mecanismos sugeridos que relacionam a hiper-homocisteinemia com doenças cardiovasculares. Entre eles, a inibição do crescimento e lesão das células endoteliais, crescimento da musculatura lisa vascular e maior adesividade das plaquetas, assim como efeitos na coagulação e/ou sistema fibrinolítico, que podem provocar uma redução do calibre dos vasos contribuindo para uma resposta pró-inflamatória e pró-arterosclerótica. A homocisteína também pode aumentar o estresse oxidativo e inibir a atividade da enzima glutathione peroxidase. O processo oxidativo pode provocar a oxidação de LDL-colesterol com sua deposição na parede vascular, aumentando os riscos de arterosclerose (NEVES *et al.*, 2004; UHERA *et al.*, 2005; GUIMARÃES, 2006; WANG *et al.*, 2012 a e b).

Os folatos também estão envolvidos na produção de mielina, principal proteína que participa da produção da camada lipídica que separa os axônios. Portanto, é importante para o desenvolvimento do sistema nervoso central, para o metabolismo de neurotransmissores e para a preservação e integridade da memória (LIMA *et al.*, 2003; UEHARA e ROSA, 2010). Altas concentrações de homocisteína no cérebro podem estar associadas a doenças cerebrovasculares (hipertensão arterial, coágulo, AVC); neurotoxicidade (uma das causas principais de doenças neurodegenerativas como mal de Alzheimer, mal de Parkinson); estresse oxidativo e acúmulo de radicais livres relacionados a distúrbios neurodegenerativos uma vez que promovem peroxidação excessiva de lipídeos, resultando em degeneração neuronal. Além de poder causar outras desordens mentais como irritabilidade, esquecimento, hostilidade, e comportamento paranóico. Entre outros problemas cerebrais encontram-se os prejuízos da vasodilatação endo-dependente, aumento da agregação plaquetária e inibição dos anticoagulantes naturais (KRUMAN *et al.*, 2002; REYNOLDS, 2002; FOKKEMA *et al.*, 2005; BALK *et al.*, 2007; FENECH, 2010; UEHARA e ROSA, 2010).

A homocisteína também tem sido relacionada com complicações durante a gravidez, como pré-eclampsia, ruptura da placenta, retardo no crescimento intrauterino, parto prematuro, abortos e morte intrauterina, e baixo peso do feto ao nascer (UEHARA e ROSA, 2010).

Como os folatos participam da divisão celular sua falta durante a gravidez pode provocar diversos problemas ao feto, pois é necessária uma rápida divisão celular para o seu desenvolvimento e crescimento, assim como para o amadurecimento da placenta e o alargamento do útero (CZEIZEL e DUDÁS, 1992; SCHOLL e JOHNSON, 2000). O baixo consumo de folato por gestantes pode estar relacionado com diversos problemas como os defeitos da formação do tubo neural (DTN), que são malformações do sistema nervoso central do embrião, que ocorre entre 21° e 28° dias de gestação, período no qual a maior parte das mulheres nem sabem que estão grávidas (WANAT *et al.*, 2005; SANTOS e PEREIRA, 2007).

As formas clínicas do DTN mais comuns são anencefalia, encefalocele, e a espinha bífida (ROURE, 2010). A anencefalia é a ausência total ou parcial do crânio e do cérebro. A encefalocele é o deslocamento do cérebro ou da meninge devido a uma deformação do crânio (AGUIAR *et al.*, 2003; GONZALÉZ e CARBALLO, 2003). A espinha bífida pode ser de dois tipos, oculta e aberta. Na espinha bífida oculta há a má formação de uma ou mais vértebras, sendo que geralmente esta não está associada a problemas neurológicos, visto que normalmente a medula óssea não se apresenta comprometida. Na espinha bífida aberta ocorre a má formação das vértebras com a exposição da medula óssea, provocando desde paralisias à perda de controle visceral e do intestino (GONZALÉZ e CARBALLO, 2003; SANDLER, 2010). De acordo com Uehara e Rosa (2010), outros problemas também podem estar associados ao baixo consumo de folatos pelas gestantes, como os lábios leporinos (36° dia de gestação), o defeito de septo ventricular (42° dia após a concepção) e a fenda palatina (47-72° dia de gravidez). Outros defeitos relatados são anomalias no trato urinário e atresia anal (FOKKEMA *et al.*, 2005).

A ingestão de baixas concentrações de folatos está relacionada também a problemas como a redução do número de plaquetas e de células brancas, e anemia megaloblástica. Isso ocorre devido a diminuição da divisão celular e da síntese de ácidos nucléicos, sendo mais aparente em tecidos de multiplicação rápida (BAILEY e GREGORY, 1999; BALUZ *et al.*,

2002). A anemia megaloblástica consiste no desenvolvimento inadequado das hemácias que apresentam tamanho anormal (grandes), imaturidade do núcleo e membranas frágeis (HINES, 2002; GUYTON e HALL, 2006; ROURE, 2010). Essas células mal formadas são capazes de transportar o oxigênio, porém, possuem apenas a metade ou um terço do tempo de sobrevivência normal (BAILEY e GREGORY, 1999).

Além dos folatos estarem relacionados a síntese de compostos essenciais para a formação do DNA eles também participam de sua metilação. Logo, a deficiência de folatos pode estar relacionada com sua hipometilação, danos na estrutura do DNA e nos processos de sua reparação. Portanto, pode proporcionar o crescimento de células anormais, levando até a formação de cânceres, como o colorretal, de mama, gástrico, no ovário, entre outros (AGRAWAL *et al.*, 2007; SIE *et al.*, 2009; GALVÁN-PORTILLO *et al.*, 2010; NUKOLOVA *et al.*, 2011). Embora, segundo Kim (2004), em um organismo sadio o ácido fólico pode prevenir certos tipos de câncer, entretanto existem algumas poucas evidências que indicam que caso haja a presença de células pré-maligna e/ou lesão maligna, o ácido fólico pode provocar o desenvolvimento mais rápido do câncer, visto que essas células tendem a se multiplicar mais rápido que células normais (KIM, 2004; FINGLAS *et al.*, 2006).

Embora sejam necessários mais estudos, a deficiência em ácido fólico também pode estar relacionada à reprodução humana, visto que síntese e metilação do DNA são fundamentais para a gametogênese e a hiper-homocisteinemia pode estar associada a redução do óxido nítrico (ROURE, 2010; UEHARA; ROSA, 2010).

Em homens férteis foi verificada uma baixa concentração de folatos no plasma seminal, o que estaria associado a um alto nível de DNA danificado. Outro problema é o fato de os espermatozoides serem particularmente susceptíveis aos danos da peroxidação lipídica, pois sua membrana possui grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, alvos principais das espécies reativas de oxigênio. Portanto, sua oxidação poderia alterar a fluidez e a funcionalidade da membrana dos espermatozoides, prejudicando sua capacidade de penetração no ovócito. Os danos aos espermatozóides associados à baixa motilidade e problemas morfológicos podem provocar infertilidade. Enquanto que a redução das concentrações de óxido nítrico provoca problemas durante a ereção peniana,

espermatogênese e reação acrossômica (FORGES *et al.*, 2007; BOXMEER *et al.*, 2009; UEHARA; ROSA, 2010).

Nas mulheres a deficiência pode estar associada à endometriose, que é uma das causas mais comum de infertilidade. Enquanto que a baixa concentração de óxido nítrico pode comprometer a ovulação e a nidação do óvulo (UEHARA; ROSA, 2010).

1.5 DOSES DIÁRIAS

A recomendação da ingestão diária de ácido fólico (Tabela 2) para um adulto normal é de 240 µg/dia. A dose diária recomendada para gestante ou lactante é maior, visto que há grande necessidade de multiplicação celular e para a formação de placenta, e desenvolvimento do bebê, respectivamente (SANTOS e PEREIRA, 2007). De acordo com Brasil (2002 a), o consumo de ácido fólico por gestantes encontra-se abaixo do recomendado, sendo a média de 200 µg/dia, enquanto que o consumo deveria ser de 355 µg/dia. Logo, para reduzir o risco de incidência de doenças e de má formação do tubo neural iniciou-se o programa de fortificação.

Tabela 2: Recomendação de consumo diário para ácido fólico.

Indivíduos	µg/dia
Crianças	
1-3 anos	95
4-6 anos	118
7-10 anos	177
Mulher	240
Gestantes	355
Lactante	295
Homem	240

Fonte: BRASIL (2005).

De acordo com Boushey *et al.* (2001), a fortificação de alimentos com ácido fólico é uma forma excelente para o aumento do consumo dessa vitamina. Segundo Hunt e Dwyer (2001), a fortificação dos alimentos oferece várias vantagens em comparação com a suplementação e modificação da dieta, pois é uma forma confiável e efetiva de aumentar o

consumo de nutrientes pela população sem depender de práticas individuais de suplementação. Assim, com a implantação da RDC nº344, de 13 de dezembro de 2002 tornou-se obrigatória a fortificação (150 µg/100g) de farinhas de trigo e de milho com ácido fólico no Brasil (BRASIL, 2002 b). A escolha desses produtos foi devido as farinhas e os produtos panificados serem bastante consumidos por todas as classes sociais e em todas as regiões do Brasil (IBGE, 2012), sendo o pão um dos alimentos mais difundidos e uma das principais fontes energéticas da dieta em muitos países (BRASIL, 1998).

1.6 TOXICIDADE

A ingestão de ácido fólico é segura e quase não apresenta efeitos colaterais, mesmo à concentrações de 15 mg/dia (BUTTERWORTH e TAMURA, 1989). No entanto, concentrações acima de 5 mg/dia podem mascarar a deficiência de vitamina B12. Logo, como o ácido fólico não apresenta efeitos nos problemas neurológicos provocados pela falta de vitamina B12, danos irreparáveis podem ser causados ao sistema nervoso central (CORNEL *et al.*, 2005; FOKKEMA *et al.*, 2005; LYNOTT, 2006; PAZ e HERNÁNDEZ-NAVARRO, 2006).

Outro problema discutido é a respeito dos anti-convulsivos que aumentam a concentração de homocisteína no plasma, elevando o risco de arteriosclerose (HAMED e NABESHIMA, 2005). Como mencionado anteriormente, a administração de ácido fólico pode reduzir esse risco, porém, supõe-se que a altas concentrações de ácido fólico anulam o efeito antiepilético de alguns medicamentos. No entanto, há estudos que indicam que as concentrações presentes nos alimentos não alteram significativamente a concentração e a meia vida dos anti-convulsivos no plasma (MOORE, 2005; RAY, 2005). Devido a essas preocupações, a Food and Drugs Administration (FDA) (1996) recomenda que a concentração de folatos ingeridos não ultrapasse 1 mg/dia.

1.7 BIODIPONIBILIDADE, BIOEFICIÊNCIA E BIOACCESSIBILIDADE

A biodisponibilidade pode ser definida como a proporção entre a quantidade de folato ingerido e a disponível para ser utilizada nos processos metabólicos ou ser armazenada no organismo (Figura 4) (MCNULTY e PENTIEVA, 2004). Ela depende de

vários fatores como a estrutura do folato, matriz alimentar, estabilidade de certas formas de folatos durante a digestão, presença de outros compostos que podem afetar a sua estabilidade durante a digestão (álcool e drogas que a prejudicam e o ascorbato que favorece sua absorção), fatores fisiológicos (pH nos locais de absorção, por exemplo), doenças gastrointestinais e fatores genéticos que reduzem a biodisponibilidade do ácido fólico (BROUWER *et al.*, 2001; FINGLAS e WRIGHT, 2002; MCNULTY e PENTIEVA, 2004). Segundo Gregory (2001), pouco se sabe a respeito da perda de biodisponibilidade do folato quando esse interage com outros nutrientes.

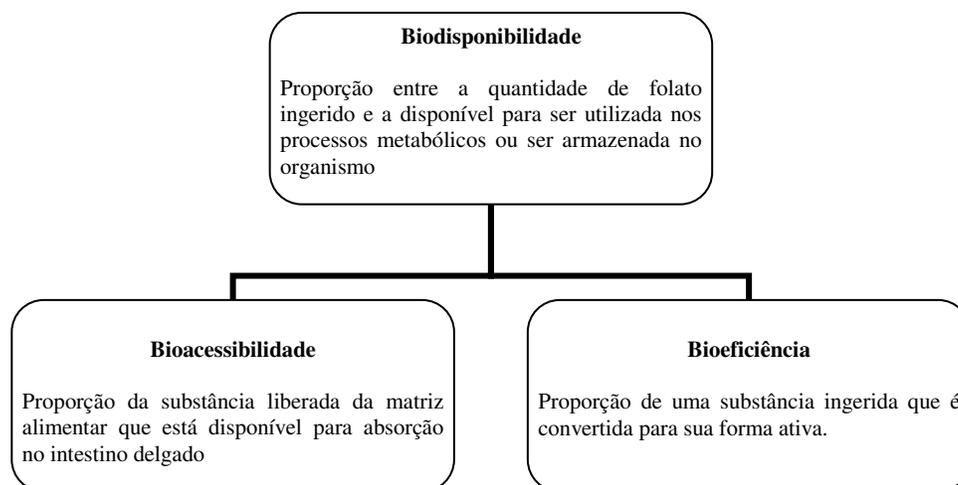


Figura 4: Definições de biodisponibilidade, bioacessibilidade e bioeficiência.
Fonte: Fernández-Garcia *et al.* (2009)

McNulty e Pentieva (2004) relataram que os folatos naturais presentes nos alimentos apresentam uma biodisponibilidade menor quando comparados com o ácido fólico. No entanto, há uma falta de dados precisos a respeito da biodisponibilidade dos folatos, sendo que a diferença de biodisponibilidade entre folatos e ácido fólico variou entre 10 a 98% em estudos com humanos, dependendo da metodologia utilizada para sua determinação. Segundo Ohrvik e Witthoft (2011), nos últimos 15 anos a biodisponibilidade do folato foi estudada, porém os dados obtidos foram inconclusivos.

A biodisponibilidade engloba a bioeficiência e a bioacessibilidade (Figura 4) (FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009). A bioeficiência é a proporção de uma substância ingerida que é convertida para sua forma ativa. O folato possui 50% menos bioeficiência que o ácido fólico, o que provavelmente pode ser devido a fatores como a matriz alimentícia, a sua ligação com outros compostos, entre outros fatores (BROUWER *et al.*, 2001).

A bioacessibilidade corresponde à fração liberada da matriz alimentar que está disponível para absorção no intestino delgado (VERWEI *et al.*, 2003). Arkbåge *et al.* (2003), obtiveram uma bioacessibilidade *in vitro* de 82% em amostras de iogurte e leite fortificados com ácido fólico e folato (6S)-5-CH₃-H₄. Segundo Verwei *et al.* (2003), a bioacessibilidade de leite fortificado com ácido fólico foi de 58- 61% e com folato 5-CH₃-H₄ foi de 71%.

No estudo realizado por Öhrvik *et al.* (2010), foi estimada uma bioacessibilidade do ácido fólico de 76% para amostras de pão integral, enquanto que Chandra-Hioe *et al.* (2013) obtiveram uma bioacessibilidade de 100% em amostras de pão branco e integral. Apesar dos altos valores de bioacessibilidade obtidos nos trabalhos realizados são necessários mais estudos para realmente constatar se a fortificação está sendo eficiente e suficiente, ou se a matriz escolhida é a mais adequada. Essa verificação é necessária pois a digestão e absorção envolvem diversas etapas, e cada uma pode causar diferentes efeitos, positivos ou negativos, em cada nutriente (FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

1.8 MÉTODOS DE ANÁLISE DE BIOACESSIBILIDADE

A bioacessibilidade pode ser avaliada através de métodos *in vivo* ou *in vitro* (MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2011). O estudo *in vivo* está relacionado à caracterização e análise de moléculas e sistemas biológicos em organismos intactos como animais e humanos, enquanto que estudo *in vitro* refere-se a manipulação de órgãos, tecidos e biomoléculas sob condições controladas artificialmente (PETRONILHO *et al.*, 2012).

Estudos *in vivo* em humanos são susceptíveis a grandes erros, necessitam de um grande trabalho laboratorial, consomem tempo, são onerosos, os resultados são difíceis de serem interpretados, são limitados a um pequeno número de amostras, apresentam

necessidade de considerações éticas, e são mais difíceis de controlar (FAILLA e CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005; FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009; PETRONILHO *et al.*, 2012).

Estudos *in vivo* em animais apresentam vantagens em relação a estudos em humanos, pois nos animais é possível induzir deficiências nutricionais, doenças crônicas e agudas, utilizar isótopos radioativos e coletar tecidos de interesse para a análise (FAILLA e CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2011). No entanto, são caros e limitados pela incerteza em relação a diferença de metabolismo entre o animal e o ser humano (SCOTT *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

Por isso, tem-se dedicado ao desenvolvimento de métodos *in vitro* (HUR *et al.*, 2011), que são empregados para a simulação de condições fisiológicas e a sequência de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal em humanos (FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009). Esses métodos são ferramentas eficazes e práticas para a avaliação preliminar da biodisponibilidade de um grande número de amostras e da influência de vários fatores. Além de serem simples, rápidas, de baixo custo, de alta precisão, apresentarem boa reprodutibilidade e permitirem a obtenção de informações impossíveis de serem alcançadas em estudos *in vivo* (FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2011). Por isso, eles têm sido utilizados para investigar os efeitos do processamento, da matriz alimentar, estabilidade dos compostos de interesse durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (FAILLA e CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

1.9 MÉTODOS DE ANÁLISE DE FOLATOS

A análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios devido à baixa concentração, presença de diversos interferentes, complexidade da matriz e exigência de cuidados especiais pela baixa estabilidade desses nutrientes (CATHARINO *et al.*, 2006; ARCOT e SHRESTHA, 2005). Para a determinação de folatos podem ser aplicados métodos biológicos, microbiológicos, químicos, imunobiológicos ou físicos (ARCOT e SHRESTHA, 2005).

Os métodos biológicos são demorados, dispendiosos e de baixa repetibilidade. (SCOTT *et al.*, 2000; EDELMANN *et al.*, 2012). Nos métodos microbiológicos normalmente se utiliza *Lactobacillus casei* para a quantificação de folatos, no entanto, esse método proporciona informações limitadas a respeito da forma química do folato, determinando apenas a concentração total dessa vitamina (FINGLAS *et al.*, 1999; LIN e YOUNG, 2000; ZHANG *et al.*, 2012). Os métodos químicos são pouco utilizados principalmente para análises qualitativas, visto que há a presença de muitos interferentes (KEAGY, 1985). Enquanto que os métodos imunológicos podem se tornar inviáveis devido ao seu elevado custo (OSSEY *et al.*, 1998; ARCOT e SHRESTHA, 2005).

Os métodos físico-químicos vêm sendo cada vez mais utilizados para a determinação de folatos. Entre eles os mais empregados são os que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão. Além de serem capazes de identificar e quantificar as diferentes formas dos folatos presentes nos alimentos (DOHERTY e BEECER, 2003; CATHARINO *et al.*, 2006; CATHARINO *et al.*, 2007; LYER e TOMAS, 2013). Outro método utilizado é a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), que apresenta maior resolução e menor tempo de análise comparado com o CLAE. A coluna de UPLC utilizada apresenta tamanho de partícula inferior a 2 µm e trabalha a pressões elevadas, proporcionando uma melhoria na resolução por unidade de tempo (EDELMANN *et al.*, 2012).

2 MICROENCAPSULAÇÃO

A encapsulação é definida como um processo no qual pequenas partículas ou gotículas são englobadas por um revestimento polimérico, ou embebidas em uma matriz homogênea ou heterogênea, para assim, proporcionar às cápsulas muitas propriedades úteis (MADZINA *et al.*, 2005, GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). As cápsulas formadas são classificadas, de acordo com o tamanho de suas partículas, em macro (>5000 µm), micro (1,0-5000 µm) e nano (<1,0 µm) (JAFARI *et al.*, 2008). Os tipos de cápsulas dependem da técnica e do material utilizado e das características físico-químicas do composto a ser microencapsulado (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Existem muitos métodos de microencapsulação. Alguns são baseados em mecanismos físicos ou processos mecânicos (*spray drying*, *spray chilling/cooling*, extrusão e leite fluidizado) e outros em processos químicos (coacervação, gelatinização, co-cristalização, inclusão molecular e polimerização interfacial ou *in-situs*), ou ainda, ocorre a utilização desses mecanismos combinados (THIES, 2003; LI e DIOSADY, 2012).

As técnicas físicas são mais baratas e mais fáceis de reproduzir em grande escala. Porém, têm inconvenientes de carga relativamente baixas e partículas com propriedades imperfeitas. Enquanto que as técnicas químicas são onerosas e envolvem conceitos complexos, no entanto, usualmente geram partículas com estruturas bem definidas e propriedades de liberação desejadas (LI e DIOSADY, 2012).

A indústria de alimentos tem usado a tecnologia de microencapsulação por mais de 60 anos, utilizando-se principalmente os métodos físicos. Essa técnica tem sido empregada por várias razões, entre elas: por proporcionar uma maior proteção do material contra reações de degradação pela exposição ao calor, umidade, oxigênio e/ou luz; e por reduzir sua interação com os outros componentes do alimento. Por esses motivos, a encapsulação promove o aumento de viabilidade e estabilidade dos compostos desejados. Também podem proporcionar mudanças nas características do material, o que facilita sua utilização e evaporação; e podem reduzir ou retardar a taxa de transferência do material do núcleo para o meio exterior. Além de mascarar o sabor do material de núcleo; separar componentes de uma mistura que poderia reagir; e aumentar o controle da liberação dos compostos desejados (DESAI e PARK, 2005, GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos os compostos encapsulados são liberados durante o preparo ou consumo dos alimentos. Sua liberação é realizada através da destruição do revestimento das microcápsulas pela sua dissolução em água, derretimento, ou por ruptura mecânica. Há casos em que se deseja liberar os compostos apenas após sua ingestão e presença no sistema digestivo. Outra possibilidade é que o material não seja liberado (THIES, 2003).

A microencapsulação pode ser utilizada para vários compostos como aromas, pigmentos e ingredientes nutricionais como vitaminas e aditivos funcionais. Devido a baixa estabilidade dos folatos e ácido fólico a técnica de microencapsulação tem sido estudada por alguns autores para avaliar o grau de proteção dessa vitamina perante condições adversas do meio ambiente e dos alimentos em que estão contidos (THIES, 2003; MADZINA *et al.*,

2005; SHRESTHA *et al.*, 2012; LI e DIOSADY, 2012; LIU *et al.*, 2012; TOMIUK *et al.*, 2012).

3 ANÁLISES DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO ÁCIDO FÓLICO.

Como mencionado anteriormente, o ácido fólico é uma substância instável ao calor. Para analisar sua degradação térmica podem ser utilizadas análises térmicas que medem a variação de propriedades físicas e/ou químicas provocadas durante a mudança de temperatura a qual o material é submetido. Entre as técnicas mais utilizadas encontram-se a análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) (POMERANZ e MELOA, 2000; ARAÚJO *et al.* 2006).

Na ATD a amostra e uma substância inerte, como alumina, são aquecidas e a variação de temperatura entre eles é determinada. Enquanto que na TG a massa da amostra é monitorada durante uma rampa de aquecimento (POMERANZ e MELOA, 2000). Geralmente as análises de TG e ATD são realizadas simultaneamente, deste modo, é possível avaliar concomitantemente a perda de massa e as variações térmicas de uma amostra submetida a uma rampa de aquecimento (BERNAL *et al.*, 2002; VUATAZ, *et al.*, 2010). Esses métodos permitem a especificação das faixas de temperatura nas quais a amostra é termicamente estável ou sofre uma transformação química ou física, bem como a de especificar se a transformação foi de natureza endotérmica ou exotérmica (ARAÚJO *et al.* 2006; MOCANU, *et al.*, 2012).

Os resultados das análises térmicas podem ser confirmados e complementados através da análise de difração de Raios-X (DRX). Essa é uma técnica simples, confiável, rápida, além de não necessitar de grande quantidade de amostra, não ser destrutivo, não gerar resíduos tóxicos e de exigir pouco ou nenhum preparo de amostra. No entanto, este método pode ser aplicado apenas para compostos cristalinos, visto que esta técnica se baseia na Lei de Bragg, a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram, pois cada fase cristalina apresenta uma relação de ângulo e distância característica, sendo possível a identificação de diferentes substâncias cristalinas que compõe uma amostra (WANG e GEIL, 2012).

De acordo com Vora *et al.* (2004), através de análises térmicas utilizando-se fluxo de nitrogênio e uma rampa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ o ácido fólico apresentou ponto de fusão a uma temperatura de 250°C e foi totalmente degradado a carbono em uma temperatura de 800°C . Durante esse aquecimento, inicialmente, houve perda de água a temperatura de 100°C . Em seguida, a 180°C ocorreu perda da molécula de ácido glutâmico, e então os outros constituintes do ácido fólico se degradaram antes da temperatura de 195°C ser atingida (VORA *et al.*, 2004).

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.; MURPHY, R. F.; AGRAWAL, D. K. DNA methylation in breast and colorectal Cancers. **Modern Pathology**. 20: 711–721, 2007.
- AGUIAR, M. J. B.; Campos, A. S.; Aguiar, R. A. L. P.; Lana, A. M. A.; Magalhães, R. L.; Babeto, L. T. Defeitos de fechamento do tubo neural e fatores associados em recém-nascidos vivos e natimortos. **Jornal de Pediatria**. 79(2): 129-134, 2003.
- ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 42(2): 269-277, 2006.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate: method of analysis. **Trends in Food Science and Technology**. 16: 253-266, 2005.
- ARKBÅGE, K.; VERWEI, M.; HAVENAAR, R.; WITTHÖFT, C. Bioaccessibility of folic acid and (6s)-5-methyltetrahydrofolate decreases after the addition of folate-binding protein to yogurt as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. **American Society for Nutritional Sciences**. 133: 3678–3683, 2003.
- BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F. Folate metabolism and requirements. **The Journal of Nutrition**. 129: 779–782, 1999.
- BALK, E. M.; RAMAN, G.; TATSIONI, A.; CHUNG, M.; LAU, J.; ROSENBERG, I. H. Vitamin B6, B12, and folic acid supplementation and cognitive function. **Archives of Internal Medicine**. 167: 21-30, 2007.
- BALUZ, K.; CARMO, M. G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 48(4): 597-607, 2002.
- BASSETT, M. N.; SAMMÁN, N. C. Folate content and retention in selected raw and processed foods. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 60(3): 298-305, 2010.
- BATES, C. J. Folic Acid. In: CABALLERO, B. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2 ed. Academic Press: Cambridge. 2003. p. 2559-2564.

- BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**. 25(5): 849-855, 2002.
- BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA-FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. A. Folic acid and iron evaluation in Brazilian enriched corn and wheat flours. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 19(1): 53-59, 2008.
- BOENEKE, C. A.; ARYANA, K. J. Effect of folic acid fortification on the characteristics of lemon yogurt. **LWT- Food Science and Technology**. 41: 1335–1343, 2008.
- BOUSHEY, C. J.; EDMONDS J. W.; WELSHIMER K. J. Estimates of the effects of folic-acid fortification and folic-acid bioavailability for women. **Nutrition**. 17(10): 873-879, 2001.
- BOXMEER, J. C.; SMIT, M.; UTOMO, E.; ROMIJN, J. C.; EIJKEMANS, M. J. C.; LINDEMANS, J.; LAVEN, J. S. E.; MACKLON, N. S.; STEEGERS, E. A. P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. **Fertility and Sterility**. 92(2): 548-556, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farinha terá ácido fólico para combater anencefalia em bebês**. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002/120602.html>. Acessado em 28/02/2012. (a)
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico**. Diário Oficial da União. Brasília, 2002. (b)
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº31, de 13 de janeiro de 1998. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais**. Diário Oficial da União. Brasília, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico Sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais**. Diário Oficial da União. Brasília, 2005.
- BREE, A.; DUSSELDORP, M. V.; BROUWER, I. A.; HOF, K. H. V. H.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Review Folate intake in Europe: recommended, actual and desired Intake. **European Journal of Clinical Nutrition**. 51: 643-660, 1997.
- BROUWER, I. A.; DUSSELDORP, M. V.; WEST, C. E.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. **Nutrition Research Reviews**. 14: 267–293, 2001.
- BUTTERWORTH, C. E.; TAMURA, T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 50: 353-358, 1989.
- CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Otimização da determinação de ácido fólico em leites enriquecidos através da análise de superfície de resposta. **Ciências Tecnologia de Alimentos** 21(3): 326-329, 2001.

- CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.; LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para a determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**. 29(5): 972-976, 2006.
- CATHARINO, R. R.; LIMA-PALLONE, J.; GODOY, H. T. A. Determination of folic acid in enriched dairy products. **Acta Alimentaria**. 36(1):139-147, 2007.
- CHANDRA-HIOE, M. V.; ADDEPALLI, R.; OSBORNE, S. A.; SLAPETOVA, I.; WHAN, R.; BUCKNALL, M. P.; ARCOT, J. Transport of folic acid across Caco-2 cells is more effective than 5-methyltetrahydrofolate following the *in vitro* digestion of fortified bread. **Food Research International**. 53: 104-109, 2013).
- CHEUNG, R. H. F.; HUGHES, J. G.; MARRIOT, P. J.; SMALL, D. M. Investigation of folic acid stability In fortified instant Asian noodles by use of capillary electrophoresis. **Food Chemistry**. 112: 507-514, 2009.
- CODY, M. M. Substances without vitamin status. In: MACHLING, L. J. **Handbook of vitamins**. 2 ed. Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 595.
- CORNEL, M. C.; SMIT, D. J. ; DEN BERG, L. T. W. J. Folic acid: the scientific debate as a base for public health policy. **Reproductive Toxicology**. 20: 411–415, 2005.
- CZEIZEL, A. E.; DUDÁS, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **New England Journal of Medicine**. 327: 1832-1835, 1992.
- DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**. 23: 1361–1394, 2005.
- DOHERTY, R. F.; BEECHER, G. R. A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. (51): 354–36, 2003.
- EDELMANN, M.; KARILUOTO, S.; NYSTRÖM; PIIRONEN, V. Folate in oats and its milling fractions. **Food Chemistry**. 135: 1938–1947, 2012.
- FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. *In Vitro* models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. HarvestPlus Technical Monograph Series 3, 2005. p.32
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture Organization Journal. Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Roma: Food and Nutrition Division. 2001; p. 290.
- FDA - Food and Drug Administration. Food labeling: health claims and food label statements: folate and neural tube defects. Federal Register. 61 (44):8752-8781, 1996.
- FENECH, M. Folate, DNA damage and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**. 131: 236–241, 2010.
- FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVES. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tools of nutritional efficiency. **Nutrition Research**. 29: 751-760, 2009.
- FINGLAS, P. M.; MEER, K.; VERHOEF, P.; PIETRZIK, K.; POWERS, H. J.; VAM DER STRAETEN, D.; JÄGERSTAD, M.; VARELA-MOREIRAS, G.; VAN VLIET, T.;

- HAVENAAR, R.; BUTTRISS, J.; WRIGHT, A. J. A. Research goals for folate and related B vitamin in Europe. **European Journal of Clinical Nutrition**. 60: 287-294, 2006.
- FINGLAS, P. M.; WRIGHT, A. J. A. Folate bioavailability and health. **Phytochemistry Reviews**. 1: 189–198, 2002.
- FINGLAS, P.M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L. WITTHÖFT, C.; SOUTHON, S., FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardization of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**. 64: 245- 255, 1999.
- FOKKEMA, M. R.; MEIJER, W. M.; BERG, L. T. W. Benefits and concerns regarding folic-acid fortification. **Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk**. 30: 218-223, 2005.
- FORGES, T.; MONNIER-BARBARINO, P.; ALBERTO, J.M.; GUÉANT-RODRIGUEZ, R.M.; DAVAL, J.L.; GUÉANT, J.L. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. **Human Reproduction Update**. 13(3): 225–238, 2007.
- GALVÁN-PORTILLO, M. V.; OÑATE-OCAÑA, L. F.; PÉREZ-PÉREZ, G. I.; CHEN, J.; HERRERA-GOEPFERT, R.; CHIHU-AMPARAN, L.; FLORES-LUNA, L.; MOHAR-BETANCOURT, A.; LÓPEZ-CARRILLO, L. Dietary folate and vitamin B12 intake before diagnosis decreases gastric cancer mortality risk among susceptible MTHFR 677TT carriers. **Nutrition**. 26: 201–208, 2010.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**. 40: 1107–1121, 2007.
- GONZÁLEZ, A. I. G.; CARBALLO, M. M. G. Ácido fólico y defectos del tubo neural en atención primaria. **Medifam**. 13(4): 305-310, 2003.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.
- GREGORY III, J. F. Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements. **The Journal of Nutrition**. 131: 1376S–1382S, 2001.
- GREGORY III, J. F. Vitaminas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Artmed, Porto Alegre. 2010. p. 345-408.
- GREGORY, J. F.; WILLIAMSON, J.; LIAO, J.; BAILEY, L. B.; TOTH, J. P. Kinetic model of folate metabolism in nonpregnant women consuming [²H₂]folic acid: isotopic labeling of urinary folate and the catabolite para-acetamidobenzoylglutamate indicates slow, intake-dependent, turnover of folate pools. **The Journal of Nutrition**. 128: 1896 – 1906, 1998.
- GREGORY, J.F.III. 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.
- GUIMARÃES, A. C. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 86(2): 83-84, 2006.
- GUJSKA, E.; MAJEWSKA, K. Effect of Baking Process on Added Folic Acid and Endogenous Foliates Stability in Wheat and Rye Breads. **Plant Foods for Human Nutrition**. 60: 37–42, 2005.

- GUYTON, A.; HALL, J. **Tratado de fisiologia médica**. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1264.
- 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.
- HINES, J. D. Megaloblastic Anemia. In: MAZZA, J. J. **Manual of Clinical Hematology**. 3 ed. Filadélfia: Lippincott Williams e Wilkins, 2002. p. 39-54.
- HUNT, J.; DWYER, J. Position of the American dietetic association: Food fortification and dietary supplements. **Journal of the American Dietetic Association**. 101: 115-125, 2001.
- HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. *In vitro* human digestion models for food application. **Food Chemistry**. 125: 1-12, 2011.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Alimentares. Consumo alimentar domiciliar “per capita”: Brasil e Grandes regiões. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 22/07/2012.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**. 26: 816–835, 2008.
- 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.
- KAM, K.; ARCOT, J.; WARD, R. Fortification of rice with folic acid using parboiling technique: Effect of parboiling conditions on nutrient uptake and physical characteristics of milled rice. **Journal of Cereal Science**. 56(3): 587-594, 2012.
- KEAGY, P. M. **Folacin I: Methods of vitamin assay**, 4ed, New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- KELLY, P.; MCPARTLIN, J.; GOGGINS, M.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 65: 1790-1795, 1997.
- KIM, Y. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? **The American Journal of Clinical Nutrition**. 80: 1123- 8, 2004.
- KRUMAN, I. I.; KUMARAVEL, T. S.; LOHANI, A.; PEDERSEN, W. A.; CUTLER, R. G.; KRUMAN, Y.; HAUGHEY, N.; LEE, J.; EVANS, M.; MATTSON, M. P. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer’s disease. **The Journal of Neuroscience**. 22(5): 1752–1762, 2002.
- LI, Y. O.; DIOSADY, L. L. Microencapsulation and its application in micronutrient fortification through “engineered” staple foods. **Agrofood industry Hi-Tech**. 23(2): 18-21, 2012.
- LIBERATO, S. C.; PINHEIRO-SANT’ANA, V. Fortification of industrialized foods with vitamins. **Revista de Nutrição**. 19(2): 215-231, 2006.

- LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebidas lácteas enriquecidos – estudo da vida de prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 24(1): 082-087, 2004.
- LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Folatos em vegetais: Importância, Efeito do Processamento e Biodisponibilidade. **Alimentos e Nutrição**. 14(1): 123-129, 2003.
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Avaliação do Comportamento do Ácido Fólico no Processamento de Leites Enriquecidos. **Brazilian Journal of Food Technololy**. 9(1): 57-62, 2006.
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Determinação de folatos em espinafre: avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 58(1): 81-86, 2008. (a)
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Química Nova**. 31(3): 530-535, 2008.(b)
- LIN, M. Y., YOUNG, C. M. Folate level in cultures of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. 10: 409-413, 2000.
- LIN, Y.; DUEKER, S. R.; FOLLETT, J. R.; FADEL, J. G.; ARJOMAND, A.; SCHNEIDER, P. D.; MILLER, J. W.; GREEN, R.; BUCHHOLZ, B. A.; VOGEL, J. S.; PHAIR, R. D.; CLIFFORD, A. J. Quantitation of *in vivo* human folate metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 80: 680-91, 2004.
- LIU, Y.; GREEN, T. J.; WONG, P.; KITTS, D. D. Microencapsulation of L-5-methyltetrahydrofolic acid with ascorbate improves stability in baked bread products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61: 247–254, 2012.
- LUKASKI, H. C. Vitamin and Mineral Status: Effects on Physical Performance. **Nutrition**. 20: 632–644, 2004.
- LYER, R.; TOMAR, S. K. Determination of folate/folic acid level in milk by microbiological assay, immuno assay and high performance liquid chromatography. **Journal of Dairy Research**. 80 233–239, 2013.
- LYNOTT, M. **Report of the National Committee on folic acid food fortification**. Dublin: Food Safety Authority of Ireland, 2006. p. 120.
- MADZIVA, H.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Alginate–pectin microcapsules as a potentialfor folic acid delivery in foods. **Journal of Microencapsulation**. 22(4): 343–351, 2005.
- MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **The Nutrition Society**. 63: 529–536, 2004.
- MELO, G. J. O. A importância do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário e seu papel protetor de ocorrência de gestações afetadas pelos defeitos do tubo neural fetal. **Saúde Tecnologia e Questão Social**. 1: 1-20, 2004.
- MELSE-BOONSTRA, A.; WEST C. E.; KATAN M. B.; KOK F. J.; VERHOEF, P. Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in healthy adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 9: 79:424, 2004.

- MOCANU, A. M.; MOLDOVEANU, C.; ODOCHIAN, L.; PAIUS, C. M.; APOSTOLESCU, N.; NECULAU, R. Study on the thermal behavior of casein under nitrogen and air atmosphere by means of the TG-FTIR technique. **Thermochimica Acta**. 546: 120–126, 2012.
- MOORE, J.L. The significance of folic acid for epilepsy patients. **Epilepsy & Behavior**. 7: 172-181, 2005.
- MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; ROMARÍS-HORTAS, V.; MOSCOSO-PÉREZ, C.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; BERMEJO-BARRERA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. *In vivo* and *in-vitro* testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**. 30 (2): 324-345, 2011.
- NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 40 (5): 311-20, 2004.
- 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):3352-7, 2003.
- NUKOLOVA, N. V.; OBEROI, H. S.; COHEN, S. M.; KABANOV, A. V.; BRONICH, T. K. Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer. **Biomaterials**. vol 32: 5417-5426, 2011.
- OHRVIK, V. E.; WITTHOFT, C. M. Human Folate Bioavailability. **Nutrients**. 3: 475-490, 2011.
- ÖHRVIK, V.; ÖHRVIK, H.; TALLKVIST, J.; WITTHÖFT, C. Folates in bread: retention during bread-making and *in vitro* bioaccessibility. **European Journal of nutrition**. 49: 365-372, 2010.
- 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.
- PAZ, R.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, Y F. Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico. **Nutrición Hospitalaria**. 21(1): 113-119, 2006.
- PETRONILHO, S.; MARASCHIN, M.; COIMBAR, M. A.; ROCHA, S. M. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: a challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Industrial Crops and Products**. 40: 1-12, 2012.
- POMERANZ, Y.; MELOAN, C. **Food analysis: Theory and practice**. 3 ed. Nova Iorque: Aspen Publishers, 2000. 781 p.
- 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.
- REYNOLDS, E. H.; Benefits and risks of folic acid to the nervous system. **Journal of Neurology, Neurosurgery e Psychiatry**. 72: 567-571, 2002.

- ROURE, M. C. El déficit de ácido fólico. **Formación Médica Continuada em Atención Primaria**. 17(2): 94-100, 2010.
- SACHDEV, P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 26(1): 50-56, 2004.
- SANDLER, A.D. Children with spina bifida: key clinical issues. **Pediatric Clinics of North America**. 57: 879–892, 2010.
- SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Caderno de Saúde Pública**. 23(1): 17-24, 2007.
- SCHOLL, O. T; JOHNSON, W.G. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 71(suppl):1295S–1303S, 2000.
- SCOTT, J.; RÉBEILLÉ, F.; FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food Agriculture**. 80:795-824, 2000.
- SHANE, B. Folate Chemistry and metabolism. In: BAILEY, L.B. **Folate in health and disease**. 2 ed. New York: Boca Raton, 2010, p. 1-24.
- 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.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; YULIANI, S. Susceptibility of 5-methyltetrahydrofolic acid to heat and microencapsulation to enhance its stability during extrusion processing. **Food Chemistry**. 130: 291–298, 2012.
- SIE, K. K.Y. A; CHEN, J.; SOHN, K.; CROXFORD, R.; THOMPSON, L. U.; KIM, Y. Folic acid supplementation provided in utero and during lactation reduces the number of terminal end buds of the developing mammary glands in the offspring, **Cancer Letters**. 280: 72–77, 2009.
- SUÁREZ-OBANDO, F.; ORDÓÑEZ-VÁSQUEZ, A.; ZARANTE, I. Defectos del tubo neural y ácido fólico: patogenia, metabolismo y desarrollo embriológico: revisión de la literatura. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**. 61(1): 49-60, 2010.
- SWIGLO, A. G. Folates as antioxidants. **Food Chemistry**. 101: 1480–1483, 2007.
- THIES, C. Microcapsules. In: CABALLERO, B. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2 ed. Academic Press: Washington, 2003. p. 3892-3903.
- TOMIUK, S.; LIU, Y.; GREEN, T. J.; KING, M. J.; FINGLAS, P. M.; KITTS, D. D. Studies on the retention of microencapsulated L-5-methyltetrahydrofolic acid in baked bread using skim milk powder. **Food Chemistry**. 133: 249–255, 2012.
- UEHARA, S. K.; ROSA, G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. **Revista de Nutrição**. 23(5): 881-894, 2010.
- VERWEI, M.; ARKBÅGE, K.; HAVENAAR, R.; BERG, H. V. D.; WITTHÖFT, C.; SCHAAFMA, G. Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. **The Journal of Nutrition**. 133: 2377–2383, 2003.

- VORA, A.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. S. Thermal stability of folic acid in the solid-state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. 75: 709–717. 2004.
- VUATAZ, G.; MEUNIER, V.; ANDRIEUX, J. C. TG–DTA approach for designing reference methods for moisture content determination in food powders. **Food Chemistry**. 122: 436–442, 2010.
- WANAT, S.; BRAZIER, M.; BOITTE, F.; LEMAY, C. Études concentrations sériques en vitamines B9 et B12 dans une population de femmes ayant porte um fœtus atteint de malformation du tube neural. **Immuno-analyse & Biologie spécialisée**. 20: 28–31, 2005.
- WANG, W.; SUN, Y.; LIU, J.; WANG, J.; LI, Y.; LI, H.; ZHANG, W. Protective effect of theaflavins on homocysteine-induced injury in huvec cells *in vitro*. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 59: 434–440, 2012. (a)
- WANG, X; CUI, L.; JOSEPH, J.; JIANG, B.; PIMENTAL, D.; HANDY, D. E.; LIAO, R.; LOSCALZO, J. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 52: 753–760, 2012. (b)
- WANG, Y.; GEIL, P. H. X-ray diffraction. In: **Nanotechnology Research Methods for Foods and Bioproducts**. 1 ed. Oxford: John Wiley & Sons, Inc, 2012. 163-179p
- ZHANG, T.; XUE, H.; ZHANG, B.; ZHANG, Y.; SONG, P.; TIAN, X.; XING, Y.; WANG, P.; MENG, M.; XI, R. Determination of folic acid in milk, milk powder and energy drink by an indirect immunoassay. **Journal of Science od Food and Agriculture**. 92(11): 2297-2304, 2012.

CAPÍTULO II

BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DO ÁCIDO FÓLICO EM PÃO FRANCÊS FORTIFICADO

Daniela Andrade Neves¹, Helena Teixeira Godoy¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP,

RESUMO

A deficiência de ácido fólico no organismo pode provocar vários problemas, por esse motivo em diversos países, dentre eles o Brasil, iniciou-se a obrigatoriedade de fortificação de alimentos com essa vitamina. Entretanto, há poucos estudos avaliando a estabilidade do ácido fólico durante processamento e a digestão dos alimentos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade do ácido fólico durante o processamento de pão francês, assim como sua estabilidade no trato gastrointestinal. Primeiramente, foi realizada a fortificação de uma farinha de trigo isenta de ácido fólico (261 µg/ 100g farinha), com a qual foram produzidas amostras de pão francês. Para avaliação da estabilidade dessa vitamina durante a digestão foi utilizado um método *in vitro* para determinação da bioacessibilidade desse composto. Para a quantificação do ácido fólico nos extratos obtidos a partir da farinha fortificada, das amostras de pão e dos extratos obtidos a partir da simulação da digestão foi utilizada uma metodologia empregando um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC). No presente estudo foi verificado que 85% do ácido fólico adicionado permaneceu retido na farinha de trigo após a adição e homogeneização, e 70% do ácido fólico presente na farinha de trigo permaneceu retido no pão francês após o forneamento. Além disso, não foram observadas perdas de ácido fólico após a digestão *in vitro*. Estes resultados indicaram que 100% do ácido fólico presente em pães francês é bioacessível. Deste modo, o presente estudo sugere que a fortificação de farinha de trigo vem sendo eficaz, e portanto, provavelmente tem contribuído para o aumento da concentração sanguínea de ácido fólico.

Palavras-chave: vitamina B9, fortificação, degradação.

ABSTRACT

Folic acid deficiency in the organism may cause several problems. For this reason, the fortification of food with folic acid became mandatory in some countries, including Brazil. However, there were few studies regarding folic acid stability during food process and digestion. Thus, the aim of this work was to evaluate the folic acid stability during bread making and its stability during a digestion simulation. First wheat flour free of folic acid was fortified with this vitamin (261 µg/ 100g flour), then bread samples were made. To evaluate the folic acid stability its bioaccessibility was determined. For the folic acid quantification in extracts of the bread and wheat flour samples and in the extracts obtained during the digestion simulation it was used a ultra-performance liquid chromatography (UPLC). In the present study was observed that 85% of the folic acid added was retained in the wheat flour after its homogenization, and after the bread baking process 70% of the folic acid present in the wheat flour was retained in the breads. Moreover, no significant loss of folic acid was observed the digestion *in vitro*. This result gives indications that 100% of the folic acid present in the breads is bioaccessible. Thus, the present study suggests that the wheat flour fortification with folic acid has been effective, and probably it has contributed to the increase of folic acid concentration in the bloodstream.

Keyword: B9-vitamin, fortification, degradation.

1 INTRODUÇÃO

O ácido fólico ou ácido pteroilmonoglutâmico é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao grupo dos folatos, também denominado vitamina B9 (CODY, 1991; SWIGLO, 2007). A deficiência dessa vitamina é uma das causas de problemas no fechamento do tubo neural (WANAT *et al.*, 2005; SANTOS e PEREIRA, 2007; SANDLER, 2010) e doenças cardiovasculares (SACHDEV, 2004; GUIMARÃES, 2006; WANG *et al.*, 2011). Além disso, a deficiência pode estar relacionada a doenças cerebrovasculares e neurodegenerativas (KRUMAN *et al.*, 2002; REYNOLDS, 2002; BALK *et al.*, 2007; FENECH, 2010), anemia megaloblástica (HINES, 2002; GUYTON e HALL, 2006), câncer (AGRAWAL *et al.*, 2007; SIE *et al.*, 2009; GALVÁN-PORTILLO *et al.*, 2010; NUKOLOVA *et al.*, 2011), entre outras.

Os folatos são vitaminas termolábeis, sendo o ácido fólico a forma mais estável e barata. Por isso, esta é a forma mais utilizada para fortificação de alimentos como, por exemplo, as farinhas de trigo (BATES, 2003; SWIGLO, 2007). Apesar das perdas de ácido fólico encontradas em alguns estudos, a farinha de trigo é um bom veículo para a realização da fortificação, visto que os produtos panificados são bastante consumidos por todas as classes sociais e em todas as regiões do Brasil (JOHANSSON *et al.*, 2002; GUJSKA e MAJEWSKA, 2005; CHEUNG *et al.*, 2009; IBGE, 2012).

No entanto, há poucos estudos da biodisponibilidade do ácido fólico, que é a proporção entre a quantidade de nutriente ingerido e a disponível para ser utilizado nos processos metabólicos ou para ser armazenado; e da bioacessibilidade do ácido fólico, que é a proporção de nutriente dos alimentos ingeridos que está disponível para a absorção no intestino delgado. Nos últimos 15 anos foram realizados estudos para avaliar essas proporções, entretanto, os resultados obtidos foram inconclusivos (VERWEI *et al.*, 2003; MCNULTY e PENTIEVA, 2004; ÖHRVIK e WITTHOFT, 2011). Os valores discrepantes encontrados podem variar dependendo da metodologia utilizada para determinação da biodisponibilidade e bioacessibilidade. Além da absorção, distribuição e eliminação dos compostos no organismo serem influenciados por fatores genéticos, metabólicos, e fisiológicos (MCNULTY e PENTIEVA, 2004; NETZEL *et al.*, 2011).

Para analisar a biodisponibilidade de forma precisa, são necessários estudos cuidadosamente controlados em humanos. No entanto, essas análises têm alto custo, são

trabalhosas, demoradas, complexas, além de serem necessárias grandes equipes e um grande número de voluntários para obter-se significância estatística. Essas análises também têm restrições éticas, o que limita sua aplicação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; NETZEL *et al.*, 2011).

Uma alternativa é a determinação preliminar da bioacessibilidade através de técnicas *in vitro*, que são caracterizadas por apresentarem eficácia, simplicidade, rapidez, baixo custo, alta precisão e boa reprodutibilidade. Além disso, as técnicas *in vitro* permitem a análise de um grande número de amostras, possibilita a avaliação da influência de vários fatores e a obtenção de informações que seriam difíceis de serem obtidas em estudos *in vivo*, tal como a coleta de amostras em órgãos-alvo (FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009; MOREDA-PINEIRO *et al.*, 2011). Estudos para avaliar a bioacessibilidade são importantes, pois a digestão e absorção envolvem diversas etapas, que podem causar diferentes efeitos nos nutrientes (FERNÁNDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

A avaliação da bioacessibilidade do ácido fólico em pão foi estudada por poucos pesquisadores, sendo que nenhum estudo foi realizado no Brasil até o momento. ÖHRVIK *et al.* (2010) avaliaram a bioacessibilidade de ácido fólico em amostras de pão integral através de análise *in vitro* utilizando um sistema modelo gastrointestinal dinâmico (TIM), que são sistemas controlados por computador composto de diferentes compartimentos, que representam o estômago e intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), os quais simulam os movimentos do trato gastrointestinal e são interconectados através de válvulas. Enquanto CHANDRA-HIOE *et al.* (2013) verificaram a bioacessibilidade *in vitro* do ácido fólico em modelo estático., onde as enzimas e reagentes foram adicionados manualmente e a incubação realizada em um banho maria com agitação.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar a bioacessibilidade *in vitro* do ácido fólico adicionado a farinha de trigo utilizada para a produção de pão francês, verificando sua estabilidade durante o processo de forneamento e percurso no trato gastrointestinal para avaliar a eficiência da fortificação de farinha de trigo com ácido fólico na produção de pão francês.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES, SOLVENTES E AMOSTRAS

O ácido fólico comercial (87% de pureza) foi adquirido da empresa Mcassab (São Paulo, SP, Brasil). O padrão de ácido fólico (97% de pureza), o pirogalol, a α -amilase de pâncreas suíno, a pepsina de mucosa gástrica de suíno, o extrato biliar suíno, a lipase tipo II de pâncreas de suíno e a pancreatina de pâncreas de suíno foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EUA). A acetonitrila grau cromatográfico, ácido tricloroacético, e o fosfato de potássio monobásico grau analítico foram adquiridos da J.T. Baker, (Center Valley, PA, EUA). O ácido fórmico 98-100% de pureza, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio foram adquiridos da Merck, (Darmstadt, HE, Alemanha). Os reagentes de grau analítico cloreto de cálcio, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, fosfato de sódio monobásico, hidróxido de potássio, e ácido clorídrico foram adquiridos da Synth, (Diadema, SP, Brasil). A água utilizada foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore).

A farinha de trigo isenta de ácido fólico e ferro utilizada para o preparo do pão francês foi gentilmente doada por um moinho de Belém, PA, Brasil. Os demais ingredientes foram doados pela Panificadora Nova Diamante (Campinas, SP, Brasil).

2.2 PREPARO DO PÃO FRANCÊS

Para a fabricação do pão francês foi utilizada farinha de trigo isenta de ácido fólico e ferro, a qual foi fortificada com ácido fólico comercial (87% de pureza). A fortificação foi feita na concentração de 300 μ g de ácido fólico comercial por 100g de farinha isenta. Deste modo, se obteve uma farinha de trigo fortificada com uma concentração de 261 μ g de ácido fólico/ 100 g de farinha de trigo. Essa concentração foi utilizada para garantir a detecção do ácido fólico no extrato da digestão, visto que a concentração exigida pela legislação (150 μ g de ácido fólico/ 100 g de farinha de trigo) é baixa e poderia resultar na não detecção do ácido fólico após a análise de bioacessibilidade, além de que é uma prática dos moinhos acrescentar uma concentração cerca de duas vezes maior, para garantir as perdas decorrentes do processo de homogeneização e estocagem das farinhas de trigo. A

homogeneização do ácido fólico na farinha isenta foi realizada durante 35 min em agitador/homogeneizador em “V” da marca Tecnal modelo TE-200/10 com rotação fixa de 50 RPM do Laboratório Piloto de Cereais, Raízes e Tubérculos da UNICAMP.

Posteriormente, foi utilizada uma formulação convencional para o preparo do pão francês, utilizando-se os seguintes ingredientes: farinha de trigo fortificada (5000 g), açúcar (40 g), melhorador (60 g), margarina (100 g), sal (130 g), fermento biológico fresco (150 g) e água (2500 g).

A fabricação do pão francês foi feita em uma masseira espiral (Superfecta, modelo AE 15). Farinha de trigo, açúcar, melhorador e margarina foram adicionados e homogeneizados por 2 min, em seguida, adicionou-se a água e homogeneizou-se por mais 5 min. Então, adicionou-se o sal e bateu-se por mais 2 min. Por fim, adicionou-se o fermento biológico e homogeneizou-se até a massa apresentar-se lisa, atingindo o ponto de véu. A massa descansou por 10 min e, posteriormente, foi modelada utilizando-se uma modeladora. Em seguida, após a fermentação de 90 min a temperatura ambiente a massa permaneceu sob refrigeração a 10°C por 10 min. Logo em seguida foi assada em presença de vapor por 17 min a 220°C. Foram realizadas 3 diferentes fornadas.

2.3 ANÁLISE DE UMIDADE

Os teores de umidade da farinha de trigo e do pão francês foram determinados de acordo com AOAC (1997), sendo 3 g de amostra pesadas em cadinhos previamente tarados. As amostras permaneceram em estufa (Nova Ética, 400/3ND, n° série 0766/00) a 105°C até atingir peso constante. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO

Para análise do teor de ácido fólico nas farinhas de trigo e pão francês foi utilizado o método adaptado do proposto por Catharino e Godoy (2001), com a utilização de um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) Acquity Waters, modelo UPA, série J08UPA 905M, equipado com bomba binária modelo UPB, série K08UPB 444M e detector de arranjo de diodos (DAD) modelo UPD, série G08UPD 124M.

Foi empregada uma coluna Hypersil Gold C₁₈, 50 mm x 2,1 mm d.i e tamanho de partícula de 1,9 µm. As fases móveis utilizadas foram água (eluente A) e acetronitila (eluente B) acidificadas com 0,4% de ácido fórmico, que foram filtradas em membranas de 0,22 µm de poros (Millipore) de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e de politetrafluoroetileno (PTFE), respectivamente e levadas ao ultrassom por 10 min. O gradiente de eluição empregado teve início com 100% A e foi diminuindo até atingir 91% A em 1,4 min. Em seguida, voltou para as condições iniciais em 2,0 min, finalizando, assim, o tempo de corrida. A vazão da fase móvel foi de 0,600 mL.min⁻¹ a uma pressão de 6200-8400 psi. Sendo o tempo de retenção do ácido fólico 1,55 min.

A detecção foi feita em um detector de arranjo de diodos (DAD) a um comprimento de onda na região do ultravioleta de 290 nm. A identificação foi feita através da comparação com os tempos de retenção do padrão analisado nas mesmas condições e a quantificação foi realizada por padronização externa, através de uma curva de calibração construída em sete diferentes concentrações no intervalo de 0,1 ug/ml a 3 ug/ml de ácido fólico. A avaliação da retenção de ácido fólico na farinha de trigo após a homogeneização e no pão francês após o assamento foi calculada de acordo com Öhrvik *et al.* (2010).

Dos 100 pães produzidos 50 foram embalados em sacolas de papel, conforme é realizado em padarias, e transportados diretamente para o laboratório, onde 10 pães foram selecionados aleatoriamente. Esses foram cortados em rodela e secos em estufa com circulação de ar a 105°C até peso constante, e, em seguida, foram pulverizados em moinho analítico IKA (A11 B S32). Após a homogeneização, 1 g de amostra foi pesado em um tubo falcon de 50 mL e em seguida, 3 mL de KOH 0,1 mol.L⁻¹ foram adicionados. Essa mistura foi agitada em vortex (Phoenix - modelo AP 56) por 1 min e deixada em repouso por mais 1 min. Adicionou-se, então, 1,5 mL de tampão fosfato Na₂HPO₄ (0,25 M)/KH₂PO₄ (0,37 M) pH 6,5, o tubo de falcon foi agitado em vortex por 1 min seguido de 1 min de repouso. Então, adicionou-se 0,5 mL de ácido tricloroacético, sem agitação, seguido por 5 min de repouso. Centrifugou-se a 6000xG por 5min a 4°C e filtrou-se primeiramente o sobrenadante em papel de filtro comum e depois em membrana Milex® (polivinilideno - PVDF) de 0,22 µm de poros. Em seguida, 10 µL de amostra foram imediatamente injetados em cromatógrafo.

Para as amostras de farinha de trigo não foram realizado o processo de secagem, e foi necessária a modificação da etapa de filtração, onde se utilizou membrana de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm de poros antes da membrana Milex® de 0,22 µm de poros, para então, injetar-se no cromatógrafo. Os filtrados obtidos foram injetados imediatamente em UPLC com volume de injeção de 10 µL. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 VALIDAÇÃO METODOLOGIA ÁCIDO FÓLICO EM UPLC

A validação da metodologia de ácido fólico foi realizado através da avaliação dos parâmetros: limites de detecção e quantificação, linearidade, repetibilidade e precisão intermediária, exatidão. Para a realização da validação foi utilizado o extrato obtido a partir da amostra de farinha isenta de ácido fólico (Seção 2.3).

O limite de detecção foi avaliado através da adição de concentrações conhecidas de padrão ao extrato da farinha isenta, de tal modo que fosse possível a distinção entre o ruído e o sinal do analito (3 vezes o sinal/ruído). O limite de quantificação foi considerado como sendo três vezes o limite de detecção.

A linearidade foi avaliada através da adição de padrão em sete concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 ppm) ao extrato da farinha de trigo isenta. As medições foram realizadas em triplica e de forma aleatória.

A repetibilidade (n = 10) e a precisão intermediária (n=6) foram avaliadas no ponto intermediário da curva (1,5 ppm), sendo as medições para a precisão intermediária realizadas em três dias diferentes com intervalo de dois dias entre eles.

A exatidão foi realizada através da recuperação. Para esse teste foram adicionadas concentrações conhecidas de padrão de ácido fólico (0,1; 1,5 e 3,0 ppm) na farinha isenta, a qual foi extraída (n=6) de acordo com o descrito na seção 2.3.

2.6 ANÁLISE DE BIOACESSIBILIDADE

As análises de bioacessibilidade do ácido fólico em pão francês foram baseadas no método de digestão *in vitro* proposto por Reboul *et al.* (2006) com adição da simulação da fase oral baseado em Thakkar *et al.* (2007) e adaptação da fase intestinal (adição de lipase),

de acordo com Ferruzzi *et al.* (2001). A simulação da digestão *in vitro* foi realizada através de diferentes etapas, simplificadas na Figura 1.

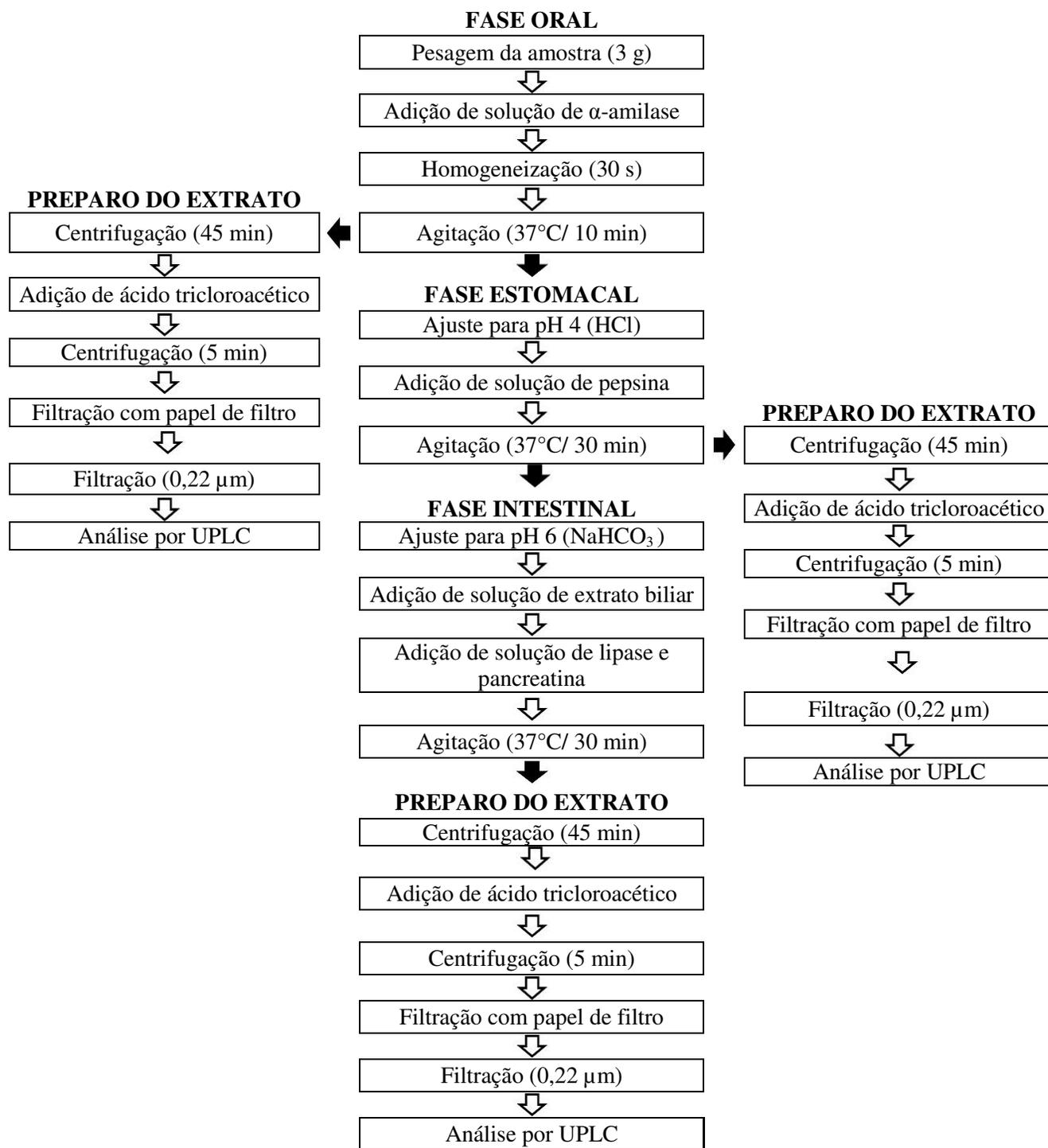


Figura 1: Diagrama da digestão *in vitro* em amostra de pão francês.

De cada fornada 10 pães foram cortados em cubos pequenos e homogeneizados. Então, para a fase oral 3 g dessa amostra foi pesada e foram adicionados 7 mL de uma solução tampão (pH 7) contendo α -amilase (9000 U), pirogalol ($12,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e 150 mmol.L^{-1} de NaCl, KCl e CaCl_2 . A mastigação foi simulada através da homogeneização em Turrattec TE-102 por 30 s. Posteriormente, essa suspensão foi incubada em banho-maria a 37°C com agitação por 10 min.

Para a fase gástrica, o pH do extrato da boca foi ajustado para 4,0 com aproximadamente $90 \mu\text{L}$ de HCl 1M e então 2 mL de solução de pepsina (40 mg.mL^{-1} em HCl 0,1 M) foram adicionados. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C sob agitação por 30 min. Para a fase intestinal, o pH foi ajustado para 6,0 com aproximadamente $800 \mu\text{L}$ de NaHCO_3 0,9 M e, em seguida foram adicionados 4 mL de solução biliar ($0,13 \text{ g.mL}^{-1}$ em NaHCO_3 0,1M) e 2 mL de uma solução de lípase e pancreatina (5 e 10 mg.mL^{-1} em NaHCO_3 0,1M). A mistura parcialmente digerida foi incubada em banho-maria a 37°C sob agitação por 30 min para a finalização da digestão.

Em seguida, centrifugou-se o extrato digerido a $6000 \times \text{G}$ a 4°C por 45 min. Então, foi adicionado ao sobrenadante $0,5 \text{ mL}$ de ácido tricloroacético que permaneceu em repouso por 5 min. Logo em seguida o extrato foi centrifugado a $6000 \times \text{G}$ a 4°C por 5 min. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel de filtro comum e depois filtrado em membrana Millex® (PVDF) de $0,22 \mu\text{m}$ de poros. Por fim, o extrato obtido foi analisado imediatamente em UPLC nas mesmas condições utilizadas para a análise do ácido fólico nas amostras de pão e farinha de trigo.

Para a avaliação da retenção de ácido fólico nos extratos obtidos após a simulação de cada fase da digestão foram realizadas 3 triplicatas, uma simulando apenas a fase oral, outra simulando a fase oral seguida da fase estomacal e a última foi realizada a simulação completa da digestão. Após a obtenção dos extratos da boca e do estômago foram realizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o extrato da digestão completa.

A avaliação da retenção de ácido fólico na boca e no estômago e a bioacessibilidade do ácido fólico no pão francês foi calculada de acordo com Öhrvik *et al.*, (2010).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatística foram realizadas com a utilização do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA) mediante a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VALIDAÇÃO

A validação foi realizada em amostra de farinha de trigo. O método utilizado para a análise de ácido fólico obteve limite de detecção de 0,03 ppm e um limite de quantificação de 0,1 ppm. A curva de calibração apresentou linearidade entre as concentrações de 0,01 a 3,0 ppm ($Y = 52693,875x + 1462,190$; $R^2 = 0,995$). A linearidade foi confirmada através da aleatoriedade dos resíduos, da significância da regressão e do ajuste do modelo.

A repetibilidade do método de quantificação de ácido fólico em farinha de trigo apresentou um coeficiente de variação igual 4,9% e a precisão intermediária apresentou um coeficiente de 6,5%. Póo-Prieto *et al.* (2006) encontraram em farinha de trigo comercial fortificada coeficientes de variação para repetibilidade e precisão intermediária de 2% e 7,2%, respectivamente. Chandra-Hioe *et al.* (2011) obtiveram valores de coeficiente de variação de 3% e 2,6 % para repetibilidade e precisão intermediária em pão fortificado. Portanto, os dados obtidos de repetibilidade e reprodutibilidade no presente trabalho estão de acordo com os encontrados na literatura.

A exatidão foi avaliada através da análise de recuperação, que apresentou um valor de 70%, considerado aceitável, segundo Ribane *et al.*(2004), para os níveis de ácido fólico presentes nas amostras.

3.2 ANÁLISE DA AMOSTRA DE FARINHA DE TRIGO E PÃO FRANCÊS

As amostras de farinha de trigo e pão francês apresentaram teor de umidade média de 12% e 28%, respectivamente. O valor obtido para a farinha de trigo foi inferior ao

encontrado por Gutkoski *et al.* (2007), que foi de 14,95%. No entanto, estavam de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, do Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para a Classificação de Farinha de Trigo, que estabelece que o máximo teor de umidade na farinha de trigo deve ser de 15% (BRASIL, 2005).

A farinha de trigo utilizada no trabalho foi analisada para certificar a ausência de ácido fólico (Tabela 1). Após a adição de 261 µg ácido fólico/ 100 g de farinha de trigo a farinha fortificada foi analisada e verificou-se que ela apresentou uma concentração média de 225,01 ± 18,55 µg ácido fólico/ 100 g de farinha de trigo, sendo assim, foi observada uma retenção de em média 85% após o processo de homogeneização.

Tabela 1: Concentração e retenção de ácido fólico em amostras de farinha de trigo e pão francês.

Dias	Concentração de ácido fólico (µg / 100g farinha)			Retenção (%)	
	Farinha de trigo isenta	Farinha de trigo fortificada	Pão	Farinha	Pão
1	Nd	220,7±12,1	167,6±4,2	85,5	75,9
2	Nd	245,3±17,7	119,7±0,8	92,8	68,1
3	Nd	209,0±5,4	100,1±16,2	79,9	66,9
Média		225,0±18,6	113,3±11,4	85,1±7,02	70,3±4,9

Nd – Não detectado teor de ácido fólico

A perda de ácido fólico pode estar relacionada ao tempo de homogeneização da farinha de trigo, o qual foi maior que o empregado nos moinhos comerciais. O maior tempo foi empregado pois, para a realização do presente trabalho era necessário garantir a completa homogeneização do ácido fólico. Segundo BOEN *et al.* (2008) há uma grande variação no teor de ácido fólico nas farinhas de trigo comercial, provavelmente devido a problemas durante a homogeneização (BOEN *et al.*, 2008). Segundo Andreson *et al.* (2010), essa dificuldade pode estar relacionada com a tendência do ácido fólico de se aglomerar, dificultando sua dispersão. Outros motivos para a dificuldade de homogeneização poderiam ser devido a diferença de massa específica entre a farinha de trigo e o ácido fólico e a baixa quantidade da adição do segundo.

Após o assamento o pão francês apresentou uma concentração de ácido fólico de 113,3 ± 11,4 µg / 100g pão, sendo assim, a retenção de ácido fólico no pão francês foi

estimada em aproximadamente 70%. Resultado semelhante ao obtido por Chandra-Hioe *et al.* (2013), que fortificaram farinha de trigo com 250 µg de ácido fólico /100 g farinha e obtiveram uma concentração de 156,9 µg/ 100 g de pão. Öhrvik *et al.* (2010) observaram uma retenção de ácido fólico em pão integral de $76 \pm 5\%$, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho e por Anderson *et al.*(2010), os quais obtiveram uma retenção de 76,4% para pão de forma. Segundo Gujska e Majewska (2005), dependendo do processo de forneamento pode haver perda de 12 a 21% de folato em pães produzidos com farinha de trigo e centeio. De acordo com Omar *et al.* (2009), a retenção de ácido fólico foi de 84,25% em pão tipo baladi produzido com farinha de trigo fortificado.

Os valores de retenção de ácido fólico em pão encontrados neste e em outros trabalhos confirmam a viabilidade da fortificação de farinhas de trigo para a produção de pão. Visto que apesar dessa vitamina ser instável a temperatura sua retenção em pães é igual ou superior a 70%.

3.3 BIOACESSIBILIDADE DE ÁCIDO FÓLICO EM PÃO FRANCÊS

O teor de ácido fólico encontrados nos extratos das diferentes etapas da digestão *in vitro* obtidos a partir das amostras de pão francês (Tabela 2) demonstraram que não houve perdas significativas durante a análise. Também não houve diferença significativa entre o teor de ácido fólico na amostra de pão francês e no extrato da digestão *in vitro* obtido após a simulação da digestão. Portanto, a bioacessibilidade do ácido fólico encontrada foi de $100 \pm 8\%$. Chandra-Hioe *et al.* (2013), utilizaram para a simulação da digestão pH 2 por 1 h na fase estomacal e de pH 7 por 2 h para a fase intestinal, obtendo 100% de biacessibilidade em pães fortificados. Portanto, o ácido fólico presente no pão demonstrou ser estável as variações de pH utilizados para a simulação da digestão *in vitro*.

Öhrvik *et al.* (2010) obtiveram 76% de bioacessibilidade após a avaliação *in vitro* de pão integral em sistema modelo gastrointestinal dinâmico (TIM). O menor valor encontrado por esses autores pode estar relacionado com a diferença na amostra de pão e no tipo de análise *in vitro* realizada.

Tabela 2: Concentração de ácido fólico em $\mu\text{g} / 100\text{g}$ pão e a retenção de ácido fólico em relação a amostra de pão.

Dia	Concentração de ácido fólico ($\mu\text{g} / 100\text{g}$ pão)			
	Pão	Boca	Estomago	Intestino
1	120,1 \pm 4,2 ^a	128,8 \pm 7,2 ^a	120,1 \pm 0,3 ^a	131,3 \pm 16,8 ^a
2	119,7 \pm 0,8 ^a	136,6 \pm 0,7 ^a	135,7 \pm 9,2 ^a	111,7 \pm 3,8 ^a
3	100,1 \pm 16,2 ^a	113,9 \pm 9,5 ^a	96,3 \pm 5,9 ^a	97,7 \pm 0,5 ^a
Média	113,3 \pm 11,4 ^A	126,4 \pm 9,1 ^A	117,4 \pm 16,9 ^A	113,6 \pm 14,9 ^A

*Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

4 CONCLUSÃO

O ácido fólico apresentou uma retenção de 85% e aproximadamente 70% após o processo de homogeneização e produção do pão, respectivamente. Apesar disso, 100% do ácido fólico presente no pão encontrava-se disponível no intestino para ser absorvido. Deste modo, a fortificação da farinha de trigo com ácido fólico provavelmente vem sendo eficaz para o aumento da concentração sanguínea de ácido fólico, o que pode proporcionar a redução de diversos problemas no organismo.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.; MURPHY, R. F.; AGRAWAL, D. K. DNA methylation in breast and colorectal Cancers. **Modern Pathology**. 20: 711–721, 2007.
- ANDERSON, W. A.; SLAUGHTER, D.; LAFFEY, C.; LARDNER, C. Reduction of folic acid during baking and implications for mandatory fortification of bread. **International Journal of Food Science and Technology**. 45(6): 1104–1110, 2010.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 16th ed. Gaithersburg. 1997. 1141pp.
- BALK, E. M.; RAMAN, G.; TATSIONI, A.; CHUNG, M.; LAU, J.; ROSENBERG, I. H. Vitamin B6, B12, and folic acid supplementation and cognitive function. **Archives of Internal Medicine**. 167: 21-30, 2007.
- BATES, C. J. Folic Acid. In: CABALLERO, B. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2 ed. Academic Press: Cambridge. 2003. p. 2559-2564.
- BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA-FILHO, E. R.; LIMA-PALLONE, J. A. Folic acid and iron evaluation in Brazilian enriched corn and wheat flours. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 19(1): 53-59, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa no 8 de 2 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da

Farinha de Trigo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 3 de junho de 2005.

CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Otimização da determinação de ácido fólico em leites enriquecidos através da análise de superfície de resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 21(3): 326-329, 2001.

CHANDRA-HIOE, M. V.; ADDEPALLI, R.; OSBORNE, S. A.; SLAPETOVA, I.; WHAN, R.; BUCKNALL, M. P.; ARCOT, J. Transport of folic acid across Caco-2 cells is more effective than 5-methyltetrahydrofolate following the *in vitro* digestion of fortified bread. **Food Research International**. 53: 104-109, 2013.

CHANDRA-HIOE, M.; BUCKNALL, M. P.; ARCOT, J. Folate analysis in food by UPLC-MS: development and validation of a novel, high throughput quantitative assay; folate levels determination in Australian fortified breads. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 401: 1035-1042, 2011.

CHEUNG, R. H. F.; HUGHES, J. G.; MARRIOT, P. J.; SMALL, D. M. Investigation of folic acid stability In fortified instant Asian noodles by use of capillary electrophoresis. **Food Chemistry**. 112: 507-514, 2009.

CODY, M. M. Substances without vitamin status. In: MACHLING, L. J. **Handbook of vitamins**. 2 ed. Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 595.

FENECH, M. Folate, DNA damage and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**. 131: 236-241, 2010.

FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVES. In vitro bioaccessibility assesment as a prediction tools of nutritional efficiency. **Nutrition Research**. 29: 751-760, 2009.

FERRUZZI, M. G.; SCHAWARTZ, S. J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and Caco-2 human cell model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 2082-2089, 2001.

GALVÁN-PORTILLO, M. V.; OÑATE-OCAÑA, L. F.; PÉREZ-PÉREZ, G. I.; CHEN, J.; HERRERA-GOEPFERT, R.; CHIHU-AMPARAN, L.; FLORES-LUNA, L.; MOHAR-BETANCOURT, A.; LÓPEZ-CARRILLO, L. Dietary folate and vitamin B12 intake before diagnosis decreases gastric cancer mortality risk among susceptible MTHFR 677TT carriers. **Nutrition**. 26: 201-208, 2010.

GUIMARÃES, A. C. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 86(2): 83-84, 2006.

GUJSKA, E.; MAJEWSKA, K. Effect of Baking Process on Added Folic Acid and Endogenous Foliates Stability in Wheat and Rye Breads. **Plant Foods for Human Nutrition**. 60: 37-42, 2005.

GUTKOSKI, L. C.; KLEIN, B.; KASTER, B; GONÇALVES, F. T.; LAMAISON. F. C.; SPIER, F.; FRIEDRICH, M. T. Armazenamento da farinha de trigo enriquecida com ferro e

ácido fólico e seu efeito na produção de pão de forma. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**. 18(1): 93-100, 2007.

GUYTON, A.; HALL, J. **Tratado de fisiologia médica**. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1264.

HINES, J. D. Megaloblastic Anemia. In: MAZZA, J. J. **Manual of Clinical Hematology**. 3 ed. Filadélfia: Lippincott Williams e Wilkins, 2002. p. 39-54.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Pesquisa de Orçamentos Alimentares. Consumo alimentar domiciliar “per capita”: Brasil e Grandes regiões. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 22/07/2012.

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.

KRUMAN, I. I.; KUMARAVEL, T. S.; LOHANI, A.; PEDERSEN, W. A.; CUTLER, R. G.; KRUMAN, Y.; HAUGHEY, N.; LEE, J.; EVANS, M.; MATTSON, M. P. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer’s disease. **The Journal of Neuroscience**. 22(5): 1752–1762, 2002.

MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **The Nutrition Society**. 63: 529–536, 2004.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; ROMARÍS-HORTAS, V.; MOSCOSO-PÉREZ, C.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; BERMEJO-BARRERA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. *In vivo* and *in-vitro* testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**. 30 (2): 324-345, 2011.

NETZEL, M.; NETZEL, G.; ZABARAS, D.; LUNDIN, L.; DAY, L.; ADDEPALLI, R.; OSBORNE, S. A.; SEYMOUR, R. Release and absorption of carotenes from processed carrots (*Daucus carota*) using *in vitro* digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model. **Food Research International**. 44: 868–874, 2011.

NUKOLOVA, N. V.; OBEROI, H. S.; COHEN, S. M.; KABANOV, A. V.; BRONICH, T. K. Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer. **Biomaterials**. vol 32: 5417-5426, 2011.

OHRVIK, V. E.; WITTHOFT, C. M. Human Folate Bioavailability. **Nutrients**. 3: 475-490, 2011.

ÖHRVIK, V.; ÖHRVIK, H.; TALLKVIST, J.; WITTHÖFT, C. Folates in bread: retention during bread-making and *in vitro* bioaccessibility. **European Journal of nutrition**. 49: 365-372, 2010.

OMAR, R. M., ISMAIL, H.M.; EL-LATEEF, B. M. A.; YOUSEF, M.I.; GOMAA, N. F. G.; SHETA, M. Effect of processing on folic acid fortified Baladi bread and its possible effect on the prevention of colon cancer. **Food and Chemical Toxicology**. 47: 1626–1635, 2009.

- PÓO-PRIETO, R.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M.; ROGERS, G.; CHOUMENKOVITCH, S. F.; JACQUES, P. F.; SELHUB, J. Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products. **American Society for Nutrition**. 136: 3079–3083, 2006.
- REBOUL, E.; RICHELLE, M.; PERROT, E. DESMOULINS-MALEZET, C.; PIRISI, V.; BOREL, P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54: 8749-8755, 2006.
- REYNOLDS, E. H. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. **Journal of Neurology, Neurosurgery e Psychiatry**. 72: 567-571, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. 27 (5): 771-780, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**. 23: 726–740, 2010.
- SACHDEV, P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 26(1): 50-56, 2004.
- SANDLER, A.D. Children with spina bifida: key clinical issues. **Pediatric Clinics of North America**. 57: 879–892, 2010.
- SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Caderno de Saúde Pública**. 23(1): 17-24, 2007.
- SIE, K. K.Y. A; CHEN, J.; SOHN, K.; CROXFORD, R.; THOMPSON, L. U.; KIM, Y. Folic acid supplementation provided in utero and during lactation reduces the number of terminal end buds of the developing mammary glands in the offspring, **Cancer Letters**. 280: 72–77, 2009.
- SWIGLO, A. G. Folates as antioxidants. **Food Chemistry**. 101: 1480–1483, 2007.
- THAKKAR, S. K.; MAZIYA-DIXON, B.; DIXON, A. G.; FAILLA, M. L. β -carotene micellarization during *in vitro* digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. **Journal of Nutrition**. 137: 2229-2233, 2007.
- VERWEI, M.; ARKBÅGE, K.; HAVENAAR, R.; BERG, H. V. D.; WITTHÖFT, C.; SCHAAFSMA, G. Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. **The Journal of Nutrition**. 133: 2377–2383, 2003.
- WANAT, S.; BRAZIER, M.; BOITTE, F.; LEMAY, C. Études concentrations sériques en vitamines B9 et B12 dans une population de femmes ayant porté un fœtus atteint de malformation du tube neural. **Immuno-analyse & Biologie spécialisée**. 20: 28–31, 2005.
- WANG, W.; SUN, Y.; LIU, J.; WANG, J.; LI, Y.; LI, H.; ZHANG, W. Protective effect of theaflavins on homocysteine-induced injury in huvec cells *in vitro*. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 59: 434–440, 2011.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE ÁCIDO FÓLICO LIVRE E MICROENCAPSULADO.

Daniela Andrade Neves¹, Rômulo Simões Angelica², Helena Teixeira Godoy¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP,
²Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará, CP 1611, 66075-110, Belém, PA.

RESUMO

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B normalmente encontrado na forma de pó cristalino de cor amarela e é a principal forma de folato utilizada no enriquecimento de alimentos. As tabelas presentes na literatura apresentam dados sobre os folatos, como 5-metiltetrahydrofolato e tetrahydrofolato, mas ainda são divergentes os dados sobre a estabilidade, principalmente a térmica, do ácido fólico. Uma opção interessante para aumentar a estabilidade é, a utilização de ácido fólico microencapsulado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a degradação térmica do ácido fólico livre (AF) e microencapsulado (AFE) através das técnicas de análises térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) e difração de raios-X (DRX). A estabilidade do AF e AFE foi avaliada a diferentes temperaturas (80°C, 100°C, 125°C, 150°C e 175°C) por 15 min. Posteriormente, foi verificada a estabilidade a 155°C durante diferentes tempos de exposição (5, 10, 15, 20 e 30 min). Os resultados demonstraram que o AF iniciou sua decomposição a 100°C, e apresentou degradação completa a 155 °C por 30 min e a 175 °C por 5 min, enquanto que o AFE degradou-se completamente a 100°C por 15 min.

Palavras-chave: vitamina B9, análise térmica, ATD-TG, difração de raios-X.

ABSTRACT

Folic acid is a B-complex vitamin that is usually found in the form of a yellow crystalline powder and is the folate form most used for food fortification. The tables present in literature shows folate data, like 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrofolate, however folic acid stability data, especially thermal, are divergent. One option to increase its stability is to use microencapsulation technique. The aim of this study was to evaluate free (AF) and microencapsulated (AFE) folic acid thermal degradation using a thermogravimetric and differential thermal analysis (TG-DTA) and X-ray diffraction (DRX). The AF and AFE stability was evaluated at different temperatures (80°C, 100°C, 125°C, 150°C and 175°C) during 15 min. After that, their stability was verified at 155°C during different exposition time (5, 10, 15, 20 e 30 min). The results demonstrated that AF started to decompose at 100°C, and was totally decomposed after 30 min at 155°C and at 175°C for 15 min, while the AFE deteriorated completely after 15 min below 100°C.

Keyword: B9-vitamin, thermal analysis, DTA-TG, X-ray diffraction.

1 INTRODUÇÃO

O ácido fólico ou ácido pteroilmonoglutâmico é um pó cristalino de cor amarela, que não apresenta odor nem sabor (VORA *et al.*, 2004). É uma vitamina hidrossolúvel do complexo B pertencente ao grupo dos folatos. Sua estrutura molecular é totalmente oxidada, possuindo apenas uma molécula de ácido glutâmico ligado ao ácido pterico. Essa vitamina é essencial para o organismo, pois participa de reações metabólicas de transferência de carbono, sendo fundamentais nos ciclos de “síntese de DNA” e de “metilação” (SCOTT *et al.*, 2000, VORA *et al.*, 2004; SWIGLO, 2007). Logo, sua deficiência pode estar relacionada com problemas no fechamento do tubo neural, doenças cardiovasculares, anemia megaloblástica, cerebrovascular e neurodegenerativas, entre outras (UEHARA e ROSA, 2010).

Na tentativa de minimizar a deficiência de folatos, a fortificação de farinhas de trigo e milho com ácido fólico tornou-se obrigatória em muitos países, entre eles o Brasil, onde a partir de 2002 iniciou-se a obrigatoriedade da fortificação através da implantação da Resolução nº344, de 13 de dezembro de 2002 (BRASIL, 2002). Apesar de pouco se conhecer a respeito da estabilidade do ácido fólico durante o processamento e estocagem dos produtos, sabe-se que fatores como temperatura, pH, luz, e agentes oxidantes são responsáveis pela sua degradação (LIMA-PALLONE *et al.*, 2008; BASSET e SAMMÁN, 2010; GREGORY, 2010). Na tentativa de minimizar a instabilidade dessa vitamina técnicas de microencapsulação têm sido estudadas, com o objetivo de manter a vitamina isolada de outros compostos do alimento e do meio ambiente (THIES, 2003; MADZINA *et al.*, 2005; SHRESTHA *et al.*, 2012; LI e DIOSADY, 2012; LIU *et al.*, 2012; TOMIUK *et al.*, 2012).

O acompanhamento da degradação térmica, desses e de outros compostos, pode ser realizado através de análises térmicas, como a análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG). Essas técnicas geralmente são realizadas simultaneamente, deste modo, é possível avaliar concomitantemente a perda de massa e as variações térmicas de uma amostra submetida a uma rampa de aquecimento (BERNAL *et al.*, 2002; VUATAZ, *et al.*, 2010). Esses métodos permitem determinar a especificação das faixas de temperatura nas quais a amostra é termicamente estável (MOCANU, *et al.*, 2012).

Os resultados das análises térmicas podem ser confirmados e complementados através da análise de difração de raios-X (DRX). Porém, este método pode ser aplicado

apenas para compostos cristalinos. Todavia, é uma técnica simples, confiável, rápida, além de ser um método não destrutivo, não necessitar de grande quantidade de amostra, não gerar resíduos tóxicos e de exigir pouco ou nenhum preparo adicional ao acondicionamento no porta-amostra (WANG e GEIL, 2012).

Deste modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a degradação térmica do ácido fólico livre (AF) e microencapsulado (AFE) através das técnicas de análises térmicas diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) e por difração de raios-X (DRX).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O padrão de ácido fólico (97% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EUA). O ácido fólico microencapsulado (BA-FM31) foi gentilmente doado pela empresa Funcional Mikron (Valinhos, SP). A farinha de trigo isenta de ácido fólico e ferro foi gentilmente doada por um moinho de Belém-PA. Os demais ingredientes como margarina, melhorador, açúcar, sal, fermento biológico seco foram adquiridos no comércio local de Campinas-SP.

2.2 UMIDADE

O teor de umidade da farinha de trigo foi determinado de acordo com AOAC (1997), onde 3 g da amostra foram pesadas, em triplicata, em cadinhos previamente tarados, então, permaneceram em estufa (Nova Ética, 400/3ND, nº série 0766/00) a 105°C até atingirem peso constante.

2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras de ácido fólico (AF) e ácido fólico microencapsulado (AFE) foram secas à vácuo a temperatura ambiente em dessecador com sílica gel. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de metalização com Au em um equipamento da marca EMITECH, modelo K550.

As imagens por microscopia foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura, da marca Zeiss, modelo LEO 1430, sendo as imagens geradas por detecção de elétrons secundários, utilizando-se voltagem de 8 e 10 kV.

2.4 ANÁLISES TERMICAS

As análises térmicas (DTA-TG) do AF, AFE, da farinha de trigo e da farinha de trigo fortificadas com ácido fólico foram realizadas em um equipamento modelo *PL Thermal Sciences*, que possui um analisador térmico simultâneo STA 1000/1500, da Stanton Redcroft Ltd, equipado com um programador de temperatura e microbalança eletrônica o qual permite a realização simultânea da análise térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) em forno cilindro vertical. O sinal gerado devido à variação de temperatura e de massa foi obtido através da utilização de um conversor digital acoplado a um microcomputador. O termopar utilizado foi da liga Pt-Rh.

Para a análise foram utilizados cadinhos de alumina com 16 mg de amostra. A temperatura de análise variou de 20°C até 240 °C, com uma velocidade de aquecimento de 10°C.min⁻¹, e 20°C.min⁻¹, sem fluxo de ar.

2.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

As amostras AF e AFE foram preparadas pela técnica de micropreparação, sendo uma pequena quantidade de amostra espalhada, sem a utilização de nenhum solvente, na superfície de um porta-amostra específico para micropreparação. A amostra AFE foi preparada de duas formas, a primeira foi realizada da forma comum e na segunda (AFET) a amostra foi triturada em gral de ágata e posteriormente espalhada sobre a superfície do porta-amostra.

As análises de DRX nas amostras de AF, farinha de trigo isenta e fortificada com ácido fólico foram realizadas por um difratômetro de raios-X de modelo X'Paert Pro (PW 3040/60) PANalytical, com goniômetro PW3050/60 (Θ-Θ) e com tubo de Raios-X cerâmico de anodo de Cu ($K_{\alpha 1} = 1,540598 \text{ \AA}$) modelo PW3373/00, foco fino longo, filtro K_{β} de Ni, detector X'Celerator RTMS (*Real Time Multiple Scanning*) no modo *scanning* e com *active length* 2,122°.

Para a leitura das amostras foram usadas as seguintes condições instrumentais: varredura 4° a 75° 2 θ , 40 KV, 30 mA, passo 0,02° em 2 θ e tempo/passos de 30 s, fenda divergente 1/8° e anti-espalhamento 1/4°, máscara 10 mm, movimento da amostra spinning, com 1 rps.

A aquisição de dados foi feita com o software *X'Pert Data Collector*, versão 2.1ª da PANalytical. E os dados foram tratados com a utilização do software *X'Pert HighScore* versão 2.1b da PANalytical.

2.6 ANÁLISE DE ESTABILIDADE TÉRMICA DO ÁCIDO FÓLICO

O estudo realizado foi planejado de modo a possibilitar a avaliação da estabilidade térmica das amostras AF e AFE. Os ensaios consistiram na utilização de duas metodologias. Na primeira as duas amostras foram submetidas a aquecimento a temperaturas de 80, 100, 125, 150 e 175 \pm 3°C com um tempo fixo de 15 min. Esse experimento teve como objetivo de verificar a temperatura na qual o ácido fólico perde a cristalinidade, ou seja, se decompõe.

A segunda metodologia consistiu na manutenção da temperatura de aquecimento fixa a 155 \pm 3°C variando-se o tempo de exposição em 5, 10, 15, 20 e 30 min.

Para a realização dos ensaios as amostras de AF e AFE foram dispostas em recipientes metálicos e aquecidas em mufla (Quimis – modelo Q-318M21). As análises foram realizadas em triplicata, sendo apenas uma replicata analisada por vez.

2.7 LEVANTAMENTO DAS CURVAS DE TEMPERATURA NO INTERIOR DO FORNO E DO PÃO DURANTE ASSAMENTO

O pão foi preparado utilizando-se uma formulação que consiste nos seguintes ingredientes: farinha de trigo fortificada (5000 g), açúcar (40 g), melhorador (60 g), margarina (100 g), sal (130 g), fermento biológico fresco (150 g) e água (2500 g).

A fortificação foi realizada adicionando-se 150 μ g de ácido fólico por 100g de farinha isenta, como determina a legislação (BRASIL, 2002).

Para a fabricação do pão adicionou-se na batedeira (Superfecta, modelo AE 15) a farinha de trigo, o açúcar, o melhorador e a margarina sendo homogeneizados por 2 min.

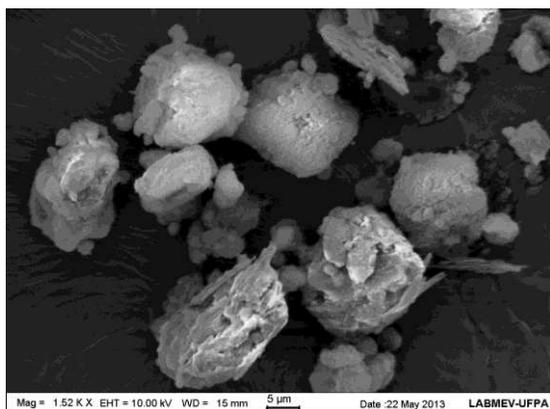
Em seguida, adicionou-se a água e homogeneizou-se por mais 5 min. Então, adicionou-se o sal e bateu-se por mais 2 min, por fim, adicionou-se o fermento biológico e homogeneizou-se até a massa apresentar-se lisa, atingindo o ponto de véu. A massa descansou por 10 min. Posteriormente, foi modelada manualmente. Em seguida, os pães foram fermentados por 90 min a temperatura ambiente. Por fim, foram assados por 30 min com a temperatura do forno marcando 210°C.

O levantamento das temperaturas durante o assamento foi realizado através da utilização de dois termopares tipo K (Gubintec, modelo TD-910D), um colocado no forno e outro no pão antes do início da fermentação. As medidas de ambas as temperatura foram realizadas de 2 em 2 minutos durante um tempo de 30 min de assamento.

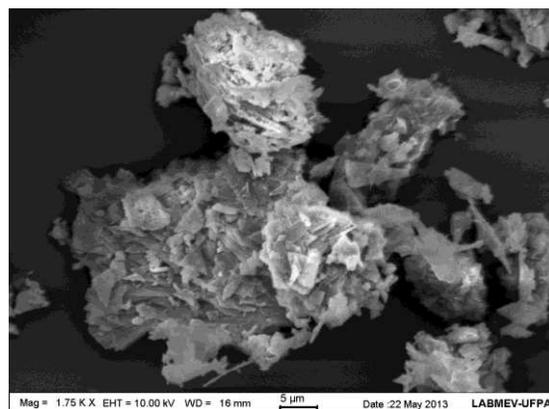
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ÁCIDO FÓLICO

Nas micrografias eletrônicas de varredura (Figura 1) pode-se observar que o AF apresentou-se sob a forma de aglomerados com morfologia arredondada, enquanto que o AFE apresentou-se sob a forma de aglomerados de morfologia irregular, e apresentou grande quantidade de partículas lamelares na sua superfície, possivelmente referente ao material encapsulante.



(a)



(b)

Figura 1: Micrografias eletrônicas de varredura: (a) ácido fólico - AF e (b) ácido fólico microencapsulado - AFE

3.2 ANÁLISES TERMICAS DO ÁCIDO FÓLICO

3.2.1 Ácido fólico livre

A curva de análise térmica diferencial (ATD) (Figura 2) do AF com velocidade de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ mostrou inicialmente que durante o aquecimento feito da temperatura ambiente (25°C) até 100°C ocorreu uma transformação endotérmica que pode ser atribuída a uma perda de umidade de 2,5% em massa, como pode ser determinada pela curva de TG.

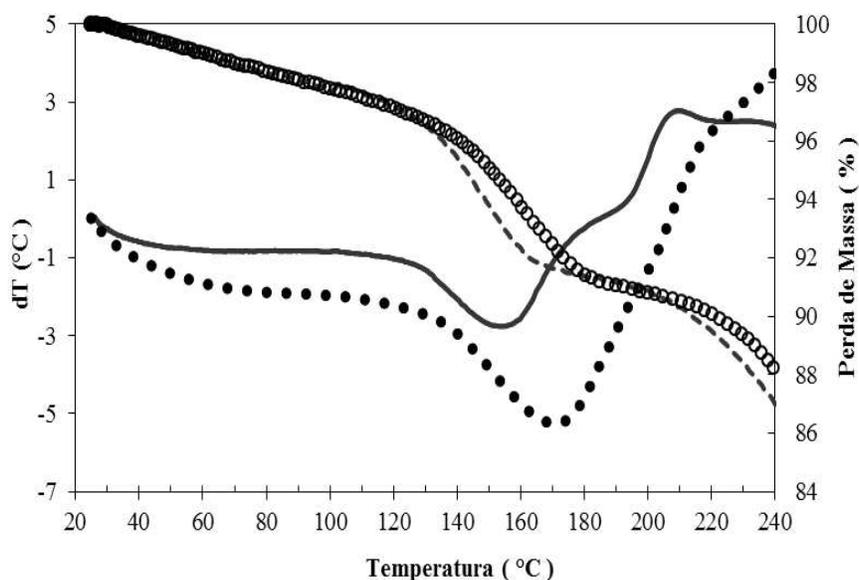


Figura 2: Curvas das análises térmicas diferencial (ATD) e termogravimétrica (TG) do ácido fólico com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sem fluxo de ar, onde: (-) ATG $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; (●) ATG $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; (--) TG $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, (○) TG $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Entre 120°C e 180°C observou-se, pela curva de ADT, que houve uma transformação endotérmica acentuada, a qual atingiu um máximo a aproximadamente 155°C . Pela curva de TG determinou-se que essa transformação apresentou uma perda de massa de 6,5%.

Acima de 190°C iniciou-se uma forte reação exotérmica atingindo um máximo em 209°C , em seguida, a uma temperatura em torno de 230°C houve outra banda exotérmica.

Nessas duas transformações exotérmicas com máximo em 190°C e 230°C observou-se uma perda de massa de aproximadamente 8% na curva de TG.

Segundo Vora *et al.*(2004), o ácido fólico ao ser analisado com fluxo de nitrogênio perdeu moléculas de água em torno de 100°C. Em temperaturas próximas a 180°C observaram o início uma reação altamente endotérmica de perda de ácido glutâmico. Enquanto que a 250°C ocorreu outra reação endotérmica, relacionada ao início da fusão do ácido fólico seguido pela sua degradação. As variações entre as temperaturas encontradas por Vora *et al.*(2004) e pelo presente trabalho podem estar relacionadas a utilização de fluxo de nitrogênio no primeiro, o que pode ter retardado a degradação do ácido fólico devido a ausência de oxigênio no meio, o qual encontra-se presente durante o processo de assamento de produtos alimentícios. No entanto, reações semelhantes podem ter ocorrido em ambos os trabalhos.

Os dados desse trabalho corroboram com os observados por Janković (2009), que verificou a estabilidade térmica do Folvax®, produto fármaco comercial contendo ácido fólico, amido de milho, sacarose, ácido esteárico e polietileno glicol 4000. Para isso, foram realizadas análises de ATD e TG com fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, nas quais foi possível observar através da curva de TG que houve desidratação dos compostos entre a temperatura ambiente (25°C) e 110°C. Enquanto que entre as temperaturas de 170°C e 280°C houve uma banda endotérmica intensa com máximo a 215°C, relacionada ao processo de degradação do ácido fólico. Sendo que a 170°C iniciou-se a perda de ácido glutâmico e a 215°C iniciou-se a fusão do ácido fólico seguido de sua decomposição (JANKOVIĆ, 2009). As diferentes temperaturas encontradas por esse autor pode ser devido a utilização de fluxo de nitrogênio e também devido a presença de outros compostos que podem ter protegido o ácido fólico, retardando sua degradação.

As curvas de ATD e TG do ácido fólico com uma rampa de aquecimento de 20°C.min⁻¹ apresentaram um comportamento semelhante as obtidas a 10°C.min⁻¹. Entretanto, a reação endotérmica iniciada a 120°C obteve seu máximo deslocado em torno de 20°C em relação ao da curva de 10°C.min⁻¹, sendo também mais intenso que a banda anterior. Outra diferença observada foi nas bandas referentes as duas reações exotérmicas que ocorreram em maiores temperaturas, e perderam definição quando comparadas com a curva a 10°C.min⁻¹. Esses resultados estão de acordo com os observados por Janković

(2009), que verificou que devido a diferença na transferência de calor o aumento da taxa de aquecimento provocou uma elevação das temperaturas características (temperatura inicial, máxima e final) das reações.

3.2.2 Ácido fólico microencapsulado

A curva de ATD (Figura 3) da amostra AFE obtida com uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ demonstrou que ocorreram duas reações endotérmicas intensas entre 35°C e 90°C com um máximo em 60°C e 69°C . Em seguida ocorreu outra reação endotérmica pequena com um máximo em torno de 105°C . Na curva de TG foi possível observar que ocorreram três perdas de massa, a primeira de 9% entre as temperaturas de 35 a 86°C , a segunda foi de 3% entre 86 a 124°C , e a última de 11% entre 124 a 210°C . A última perda de massa na curva de TG pode ter sido decorrente de degradação, no entanto, a energia utilizada por essa reação pode ter sido muito pequena, não sendo possível sua detecção na curva de ATD.

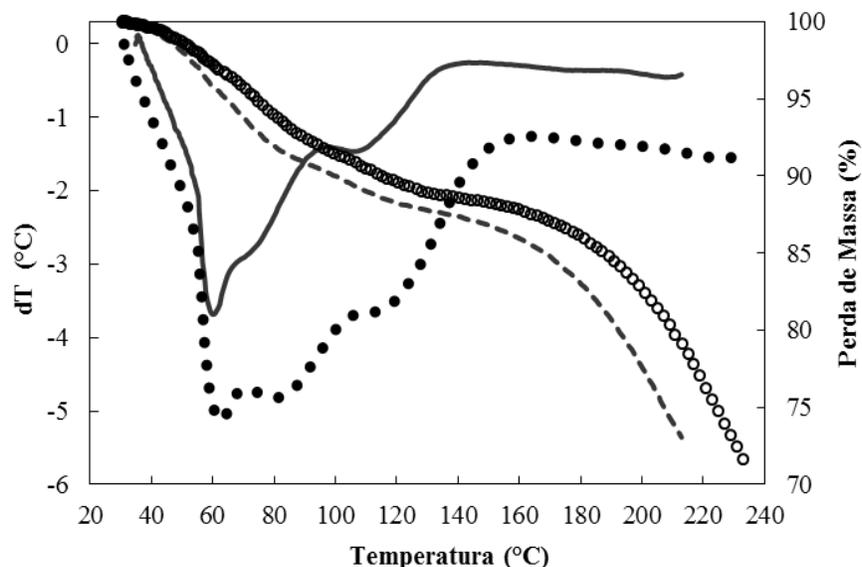


Figura 3: Curvas das ATD e TG do AFE com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sem fluxo de ar, onde: (-) ATG $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; (●) ATG $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; (--) TG $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, (○) TG $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Em torno de 100°C houve uma perda de massa semelhante nas curvas de TG da amostra AF e AFE, portanto pode ser que essa perda de massa na amostra encapsulada também esteja relacionada a perda de moléculas de água.

Comparando-se as curvas de TG das amostras AF e AFE foi possível observar que a perda de massa das amostras apresentaram comportamentos diferentes, visto que na amostra AFE houve uma perda de massa 3 vezes maior entre 35 e 86°C, enquanto na amostra AF a maior perda de massa ocorreu entre 120 e 180°C. Nas curvas de ATD foi possível verificar um comportamento de degradação semelhante para ambos os compostos, no entanto na curva da amostra AFE a banda apresentou-se mais intensa e deslocada aproximadamente -95°C em relação a amostra AF. De acordo com Yokoyama (2007), durante o processo de microencapsulação ocorre o aumento da área superficial do composto encapsulado. Logo, a presença de poros grandes e a deposição de compostos bioativos na superfície das microcápsulas aumentam sua susceptibilidade a degradação em relação a sua forma livre. Desse modo, a menor temperatura de degradação térmica do ácido fólico microencapsulado obtida nesse trabalho pode estar relacionada a estrutura da partícula e ao modo de dispersão do ácido fólico.

O aumento da taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ para 20 °C.min⁻¹ provocou um aumento na intensidade das bandas e o deslocamento de aproximadamente 13°C na temperatura máxima da segunda banda. O aumento da intensidade e aumento da temperatura de banda também foi observado para a amostra AF quando se aumentou a taxa de aquecimento da análise térmica.

3.3 ANÁLISES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO ÁCIDO FÓLICO

Através dos difratogramas de raios-X da amostra de AF (Figura 4) foi identificada a presença de ácido fólico como única fase cristalina, comprovado pelos picos a 16,26 Å, 8,16 Å e 6,79 Å característicos do ácido fólico conforme a ficha 00-053-01579 ICDD-PDF.

As posições dos picos característicos do ácido fólico encontrados no presente trabalho estão de acordo com os encontrados por Vora *et al.* (2004) para o ácido fólico puro e Pardeike *et al.* (2011) para uma nanosuspensão de ácido fólico produzida com materiais não cristalinos.

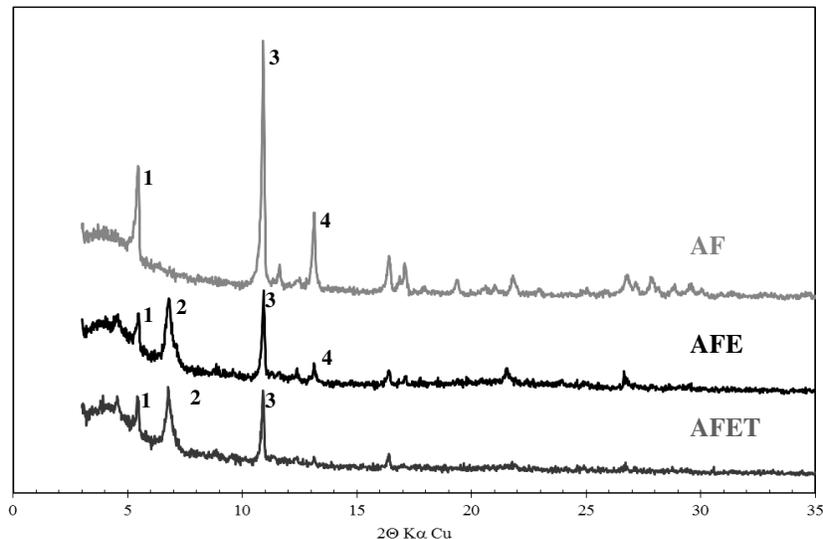


Figura 4: Difratoograma de raios-X a temperatura ambiente do ácido fólico (AF) e do ácido fólico microencapsulado (AFE) e ácido fólico microencapsulado triturado (AFET), onde: (1) 16,26 Å, (2) 13,04 Å, (3) 8,16 Å, (4) 6,79 Å.

Na identificação do AFE foram feitos dois ensaios de microanálise, no primeiro a amostra AFE foi espalhada pela superfície do porta-amostra e no segundo AFET a amostra AFE foi triturada e em seguida dispersa no porta amostra, isto com a finalidade de verificar um possível mascaramento dos picos referentes ao ácido fólico devido a presença das substâncias utilizadas como encapsulantes. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença entre os difratogramas.

Na amostra AFE e AFET foram identificadas a presença de ácido fólico acompanhada de material não cristalino e de um material cristalino com a presença de um pico não identificados 13,04 Å, os quais podem estar relacionados aos materiais utilizados na microencapsulação. Em comparação com o difratograma da amostra AF foi observado uma menor intensidade dos picos característicos do ácido fólico, entretanto, isto pode ser atribuído a forma e tipo de preparação. Constatou-se assim, que os materiais analisados foram amostras de ácido fólico.

3.3.1 Difração de raios-X de ácido fólico livre submetidos a aquecimento

Neste grupo de ensaios foi realizado um processo de aquecimento do ácido fólico a diferentes temperaturas com a finalidade de verificar sua estabilidade térmica. Nos difratogramas de raios-X da Figura 5 observou-se que o aumento da temperatura provocou uma diminuição nas intensidades dos picos, até sua completa perda de cristalinidade a 175°C. Essa tendência indica um processo de degradação térmica do material. Logo, os dados obtidos através da análise de difração de raios-X comprovam o início da degradação do ácido fólico a uma temperatura de 100°C e a total degradação dessa vitamina quando submetidas a temperaturas de 175°C por 15 min.

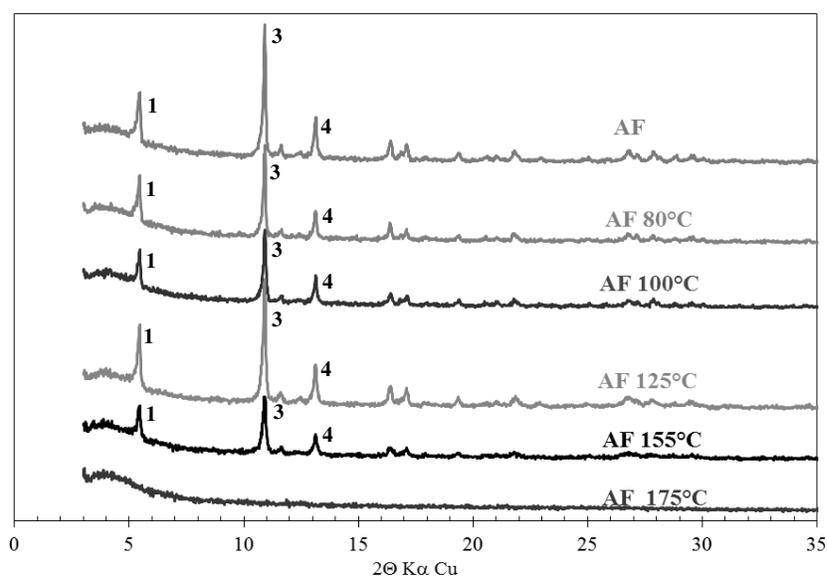


Figura 5: Difratogramas de raios-X do ácido fólico (AF) a temperatura ambiente (25°C) e submetidos por 15 min a aquecimento a temperaturas de 80°C, 100°C, 125°C, 155°C e 175°C, onde: (1) 16,26 Å, (3) 8,16 Å, (4) 6,79 Å.

Na curva de ATD do ácido fólico (Figura 2) foi observada uma banda endotérmica com máximo em 155°C, indicando a temperatura na qual ocorreu o máximo de degradação do ácido fólico. Assim, amostras de ácido fólico foram submetidas a essa temperatura durante tempos diferentes (Figura 6).

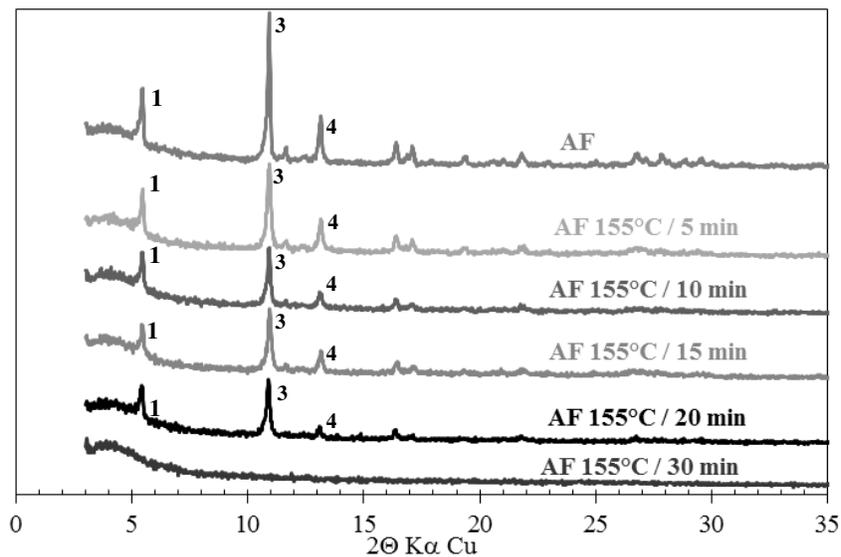


Figura 6: Difratoigramas de raios-X do ácido fólico (AF) a temperatura ambiente (25°C) e submetidos a aquecimento a temperatura de 155°C por períodos de 5, 10, 15, 10 e 30 min, onde: (1) 16,26 Å, (3) 8,16 Å, (4) 6,79 Å.

De acordo com os difratogramas obtidos verificou-se que houve uma diminuição da intensidade dos picos característicos do ácido fólico com o aumento do tempo de exposição a temperatura de 155°C, comprovando-se que o mesmo degradou-se totalmente após 30 min nessas condições.

3.3.2 Difração de raios-X de ácido fólico microencapsulado

Como mencionado anteriormente, o difratograma de raios-X da amostra de ácido fólico microencapsulado (Figura 7), demonstrou ser constituído por ácido fólico (picos 16,26 Å, 8,16 Å e 6,79 Å) e pela presença de um pico a 13,04 Å não identificados, o qual deve ser referente ao material encapsulante.

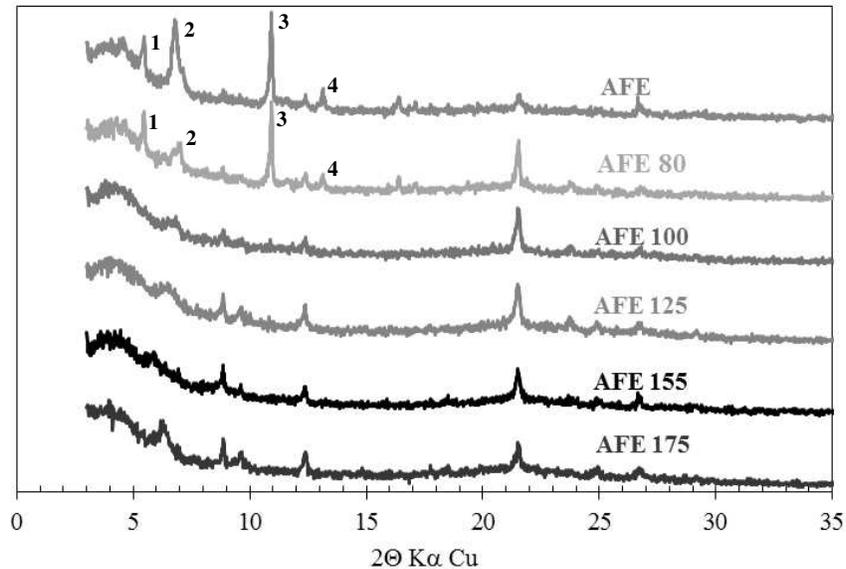


Figura 7: Difratogramas de raios-X do ácido fólico microencapsulado (AFE) a temperatura ambiente (25°C) e submetido a aquecimento por 15 min as temperaturas de 80°C, 100°C, 125°C, 155°C e 175°C, onde: (1) 16,26 Å, (2) 13,04 Å, (3) 8,16 Å e (4) 6,79 Å.

Os difratogramas obtidos com o aumento da temperatura indicaram que o processo de rompimento da estrutura cristalina ocorreu a 100°C, onde os picos característicos do ácido fólico não se encontravam mais presentes. Não houve reações endotérmicas após 100°C.

A exposição do ácido fólico microencapsulado a temperatura constante de 155°C por tempos diferentes (Figura 8) confirmou que esse composto foi totalmente degradado mesmo sendo aquecido por apenas 5 min a essa temperatura.

As análises de difração de raios-X demonstraram que o processo de encapsulação utilizado não foi eficiente no que se refere a estabilidade térmica do ácido fólico, pois a vitamina microencapsulada foi totalmente degradada a 100°C, temperatura inferior a encontrada para degradação do ácido fólico livre. Isto pode ter ocorrido devido a deposição do ácido fólico na superfície das micropartículas, aumentando, assim, a sua área superficial.

Nguyen *et al.* (2003) verificaram que o ácido fólico livre apresenta maior estabilidade térmica que o 5-metiltetraidrofolato, sendo que ambos pertencem ao mesmo grupo de vitaminas, e Shrestha *et al.* (2012) observaram que durante o processo de extrusão (120-150°C), a estabilidade térmica do 5-metiltetraidrofolato microencapsulado é maior

do que na forma livre. Desse modo, pode se inferir que embora o ácido fólico microencapsulado avaliado no presente estudo seja mais susceptível a degradação térmica, a técnica de encapsulamento pode ser utilizada para o aumento de sua estabilidade. Isto depende dos materiais e também dos processos utilizados.

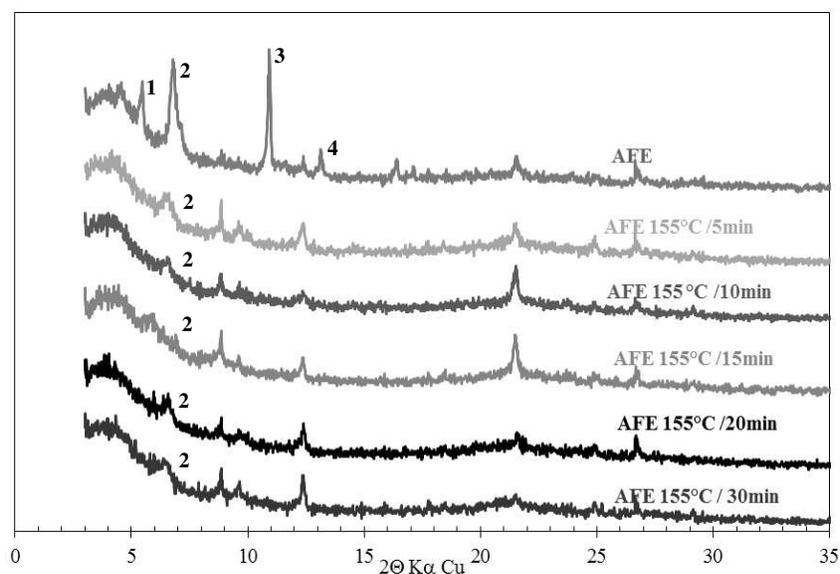


Figura 8: Difratoogramas de raios-X do ácido fólico microencapsulado (AFE) a temperatura ambiente (25°C) e submetido a aquecimento a temperatura de 155°C por períodos de 5, 10, 15, 10 e 30 min, onde: (1) 16,26 Å, (2) 13,04 Å (3) 8,16 Å e (4) 6,79 Å.

3.4 DEGRADAÇÃO TÉRMICA DA FARINHA DE TRIGO

Através da curva de ATD (Figura 9) pode-se observar que a farinha pura apresentou uma banda endotérmica acentuada com um máximo a 80°C. Essa reação apresentou uma perda de massa de aproximadamente 11,5% na curva de TG, o que confirma o teor de umidade obtido pela análise em estufa ($12,7 \pm 0,1\%$). Janković (2009) observou através da avaliação da curva de ATD de um composto fármaco, contendo ácido fólico, amido, entre outros compostos, uma banda endotérmica entre 30-110°C, a qual foi atribuída a perda de moléculas de água.

Essa banda intensa endotérmica entre 20°C e 120°C pode ser justificada pela presença de 11% de umidade, pelo processo de gelatinização do amido contido da farinha de trigo e pela coagulação do glúten. Segundo Canella-Rawls (2005), quando a temperatura do pão atinge 50°C inicia-se a gelatinização do amido, a 60°C ocorre a formação e estabilização da crosta do pão, a 74°C o glúten é transformado em uma estrutura semi-rígida e, posteriormente, a 80°C ocorre a finalização da gelatinização amido. Após, a 100°C ocorre a evaporação da água (CANELLA-RAWLS, 2005).

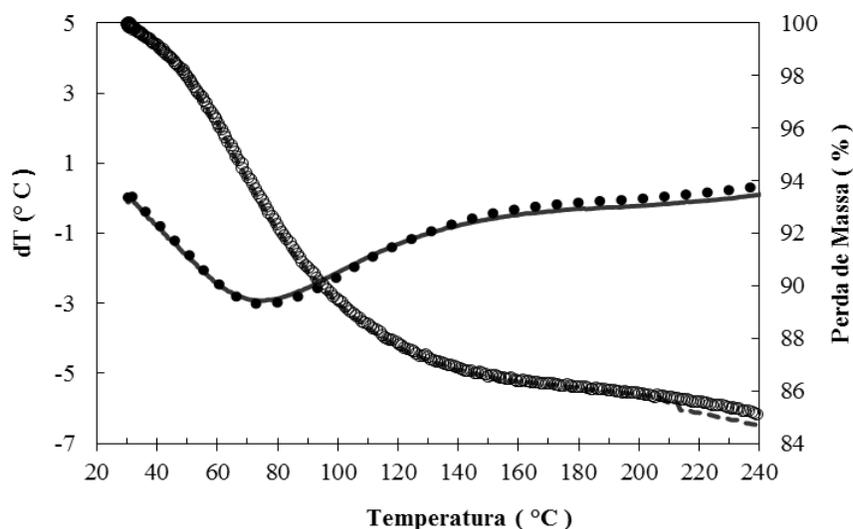


Figura 9: Curvas de ATD e TG da farinha de trigo, pura e na concentração de ácido fólico de 191 µg/g, sob aquecimento de 10°C.min⁻¹, onde: (-) ATG Farinha pura; (•) ATG Farinha 191 µg/g; (--) TG Farinha pura, (○) TG Farinha 191 µg/g.

Foram avaliadas amostras de farinha de trigo fortificadas com 1,5 µg de ácido fólico/ g farinha (BRASIL, 2002), no entanto não foi possível detectar ácido fólico. A análise foi, então, repetida com amostra de farinha de trigo fortificada mais concentrada (191 µg/g), porém, as curvas de ATD e TG também apresentaram comportamento muito semelhantes as curvas da amostra de farinha de trigo pura.

Nos difratogramas da farinha pura e fortificada com 191 µg/g (Figura 10) também não foi verificado a presença de ácido fólico, provavelmente devido a baixa concentração de ácido fólico na farinha. Foi possível identificar em ambos os difratogramas como única

fase cristalina, de baixo grau de cristalinidade, a α -amilose, comprovado pelos picos 5,86 Å, 5,17 Å e 4,93 Å característicos da α -amilose conforme a ficha 00-043-1858.

Como não foi possível detectar ácido fólico em amostras de farinha de trigo fortificadas não foram realizadas as análises na massa do pão, pois o ácido fólico apresentava-se ainda mais diluído devido a adição dos demais ingredientes utilizados no preparo da massa do pão.

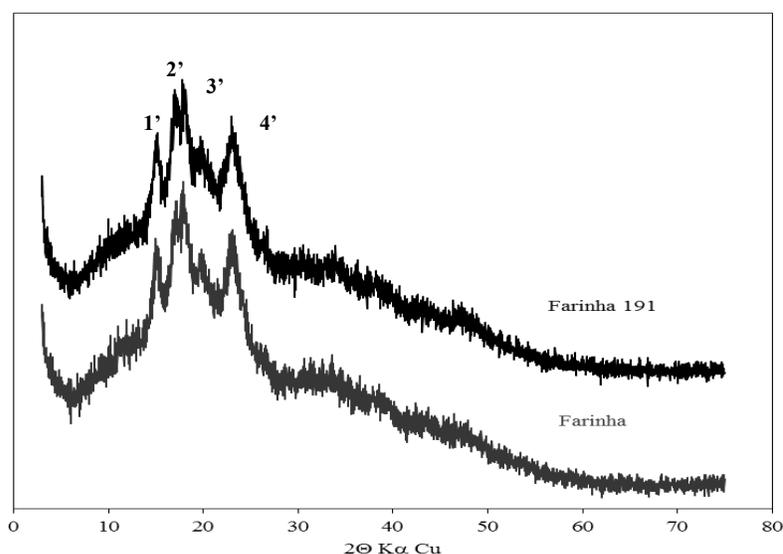


Figura 10: Difratogramas de raios-X de farinha de trigo, pura e na concentração de ácido fólico de 191 $\mu\text{g}/100\text{g}$, onde: (1') 5,86 Å, (2') 5,27 Å, (3') 5,17 Å e (4') 4,93 Å.

3.5 CURVA TÉRMICA DURANTE O ASSAMENTO DE PÃO

As curvas de temperatura desenvolvidas no interior do forno e no interior do pão (Figura 11) representaram o que ocorre com a temperatura interna do pão durante processo de assamento. Nelas pode ser verificado que a abertura do forno para a introdução do pão provocou uma queda brusca da temperatura de 210°C (temperatura inicial do forno) para 125°C. Em seguida, após o fechamento do forno, a temperatura voltou a aumentar gradativamente, atingindo 180°C após 14 min, e 195°C após 30 min.

No caso do pão houve um aumento gradual da temperatura interna com o tempo (Figura 11), atingindo um máximo de 97°C após 16 min de assamento, a qual permaneceu constante até o final do processamento, após 30min. Esse comportamento da temperatura

constante a 97°C indicou que enquanto havia umidade no interior do pão a temperatura não aumentou mesmo a temperatura do forno estando a 180°C. Segundo Canella-Rawls (2005), o pão apresenta-se assado quando sua temperatura interna atinge de 95-97°C.

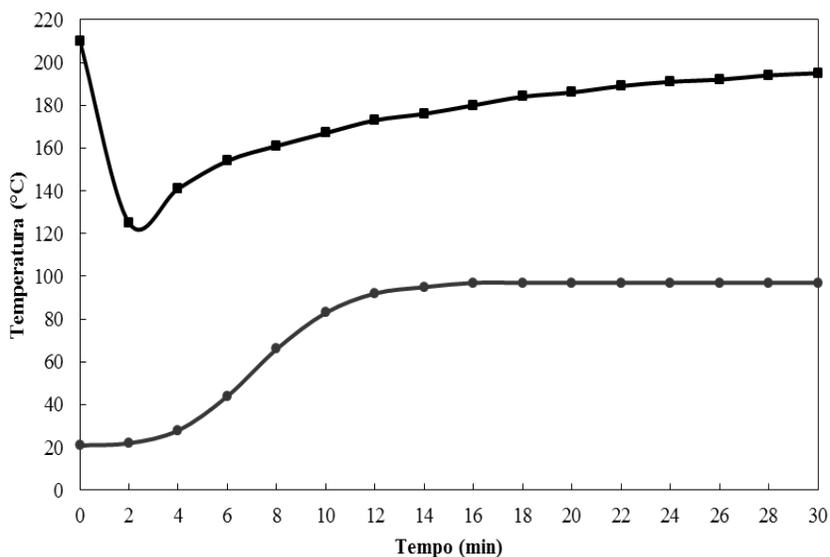


Figura 11: Curvas de temperatura interna do forno e do pão em função do tempo de assamento, onde: (■) Temperatura interna do forno e (●) Temperatura interna do pão.

A farinha de trigo é o composto majoritário do pão, e para ter-se uma noção geral das reações que ocorrem no assamento do pão foi correlacionado o assamento do pão com as curvas de análise térmica da farinha de trigo (Figura 9). Em comparação com a curva de ATD da farinha de trigo pode-se observar que pode ter havido uma reação endotérmica acentuada, a qual pode estar relacionada com reações como gelatinização do amido (50-80°C), formação da crosta do pão (60°C), coagulação da rede do glúten (74°C) e evaporação da água ($\pm 100^\circ\text{C}$), como mencionado anteriormente.

De acordo com a avaliação das curvas de degradação térmica (ATD, TG e DRX) do ácido fólico (Figura 2) é possível ter ocorrido uma pequena degradação na parte interna do pão, o qual atingiu uma temperatura inferior a da reação endotérmica intensa observada na curva de ATD (155°C). Também foi possível supor que o aquecimento do ácido fólico a temperaturas de 20°C a 100°C provocaria a ocorrência de uma pequena reação endotérmica com perda de massa de aproximadamente 2,5%. No entanto, poderia ocorrer uma maior

perda de ácido fólico nas partes mais superficiais do pão, visto que essas podem atingir uma temperatura superior que a sua parte interna.

Foi verificado através de análise por cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) uma perda em torno de 30% de ácido fólico após o assamento de pão francês fortificado (dados não publicados). Nos estudos Gujska e Majewska (2005), Anderson *et al.*, (2010), Öhrvik *et al.*, (2010), e Chandra- Hioe *et al.*, (2013) que produziram diferentes tipos de pães fortificados com o objetivo de avaliar a estabilidade dessa vitamina foram observadas perdas de ácido fólico durante o assamento variando de 12 a 30%. Esses valores foram superiores ao encontrado na curva de TG do ácido fólico, o que pode ser devido o pão ser uma matriz complexa composta de lipídios, proteínas, pro-oxidantes (melhorador), que podem favorecer a degradação do ácido fólico a altas temperaturas.

De acordo com Shrestha *et al.* (2012), o ácido fólico apresentou uma retenção entre 73 – 99% em matrizes líquidas (leite de soja, leite desnatado, solução de amido) em condições de aquecimento em banho com água fervente e em autoclave a 121°C entre 5 e 120 min de exposição, demonstrando que o ácido fólico é estável a cocção em altas pressões e durante a fervura. A menor retenção verificada foi na solução de amido, o que pode ser devido ao aprisionamento do ácido fólico na matriz, provocando a subestimação do teor de ácido fólico durante a extração. De acordo com Shrestha *et al.*, (2000), seria necessário uma extração enzimática para liberação dessa vitamina.

As temperaturas e tempos utilizados durante o assamento de pães podem estar relacionados a uma perda em torno de 30% do ácido fólico, como demonstrado nos trabalhos citados anteriormente. Entretanto, as temperaturas atingidas e os tempos aplicados não são suficientes para degradação completa dessa vitamina.

4 CONCLUSÃO

A degradação do ácido fólico microencapsulado iniciou-se em temperatura inferior a temperatura de degradação do ácido fólico livre. O que pode estar relacionada com a estrutura da partícula e ao modo de dispersão do ácido fólico nas microcápsulas, tornando-o mais susceptível a degradação.

Não foi possível avaliar a degradação do ácido fólico em amostras de farinha de trigo e pão fortificados de acordo com a legislação, devido suas baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, W. A.; SLAUGHTER, D.; LAFFEY, C.; LARDNER, C. Reduction of folic acid during baking and implications for mandatory fortification of bread. **International Journal of Food Science and Technology**. 45(6): 1104–1110, 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 16th ed. Gaithersburg. 1997. 1141pp.

BASSETT, M. N.; SAMMÁN, N. C. Folate content and retention in selected raw and processed foods. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 60(3): 298-305, 2010.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**. 25(5): 849-855, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº344, de 13 de dezembro de 2002. **Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico**. Diário Oficial da União. Brasília, 2002.

CANELLA-RAWLS, S. **Pão: Arte e Ciência**. São Paulo: SENAC, 2005.

CHANDRA-HIOE, M. V.; ADDEPALLI, R.; OSBORNE, S. A.; SLAPETOVA, I.; WHAN, R.; BUCKNALL, M. P.; ARCOT, J. Transport of folic acid across Caco-2 cells is more effective than 5-methyltetrahydrofolate following the *in vitro* digestion of fortified bread. **Food Research International**. 53: 104-109, 2013.

GREGORY III, J. F. Vitaminas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Artmed, Porto Alegre. 2010. p. 345-408.

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: 37–42, 2005.

JANKOVIĆ, B. Thermal stability investigation and the kinetic study of folnak® degradation process under nonisothermal conditions. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. 11(1): 103-112, 2009.

LI, Y. O.; DIOSADY, L. L. Microencapsulation and its application in micronutrient fortification through “engineered” staple foods. **Agrofood industry hi-tech**. 23(2): 18-21, 2012.

LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Determinação de folatos em espinafre: avaliação da influência do tipo de cultivo, época de colheita e cozimento. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 58(1): 81-86, 2008.

- LIU, Y.; GREEN, T. J.; WONG, P.; KITTS, D. D. Microencapsulation of L-5-methyltetrahydrofolic acid with ascorbate improves stability in baked bread products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61: 247–254, 2012.
- MADZIVA, H.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Alginate–pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. **Journal of Microencapsulation**. 22(4): 343–351, 2005.
- MOCANU, A. M.; MOLDOVEANU, C.; ODOCHIAN, L.; PAIUS, C. M.; APOSTOLESCU, N.; NECULAU, R. Study on the thermal behavior of casein under nitrogen and air atmosphere by means of the TG-FTIR technique. **Thermochimica Acta**. 546: 120–126, 2012.
- NGUYEN, M. T.; INDRAWATI; 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: 3352–3357, 2003.
- ÖHRVIK, V.; ÖHRVIK, H.; TALLKVIST, J.; WITTHÖFT, C. Folates in bread: retention during bread-making and in vitro bioaccessibility. **European Journal of nutrition**. 49: 365–372, 2010.
- PARDEIKEA, J.; STROHMEIERA, D. M.; SCHRÖDLB, N.; VOURAB, C.; GRUBERB, M.; KHINASTB, J. G.; ZIMMERA, A. Nanosuspensions as advanced printing ink for accurate dosing of poorly soluble drugs in personalized medicines. **International Journal of Pharmaceutics**. 420(1): 93–100, 2011.
- SCOTT, J.; RÉBEILLÉ, F.; FLETCHER, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food Agriculture**. 80:795–824, 2000.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. L. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**. 71: 545–552, 2000.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; YULIANI, S. Susceptibility of 5-methyltetrahydrofolic acid to heat and microencapsulation to enhance its stability during extrusion processing. **Food Chemistry**. 130: 291–298, 2012.
- SWIGLO, A. G. Folates as antioxidants. **Food Chemistry**. 101: 1480–1483, 2007.
- THIES, C. Microcapsules. In: CABALLERO, B. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2 ed. Academic Press: Washington, 2003. p. 3892–3903.
- TOMIUK, S.; LIU, Y.; GREEN, T. J.; KING, M. J.; FINGLAS, P. M.; KITTS, D. D. Studies on the retention of microencapsulated L-5-methyltetrahydrofolic acid in baked bread using skim milk powder. **Food Chemistry**. 133: 249–255, 2012.
- UEHARA, S. K.; ROSA, G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. **Revista de Nutrição**. 23(5): 881–894, 2010.
- VORA, A.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. S. Thermal stability of folic acid in the solid-state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. 75: 709–717. 2004.

VUATAZ, G.; MEUNIER, V.; ANDRIEUX, J. C. TG–DTA approach for designing reference methods for moisture content determination in food powders. **Food Chemistry**. 122: 436–442, 2010.

WANG, Y.; GEIL, P. H. X-ray diffraction. In: **Nanotechnology Research Methods for Foods and Bioproducts**. 1 ed. Oxford: John Wiley & Sons, Inc, 2012. 163-179p.

YOKOYAMA, T. Basic properties and measuring methods of nanoparticles. In: **Nanoparticle Technology Handbook**. Editado por: HOSOKAMA, M.; NOGI, K.; NAITO, M.; YOKOYAMA, T. Elsevier: Reino Unido. 2007. p .5-9

CONCLUSÃO GERAL

Apesar das perdas de ácido fólico durante o processamento, o teor de vitamina que permaneceu retido no pão apresentou-se totalmente disponível no intestino para ser absorvido pelo organismo. Isso indica que a fortificação pode favorecer o aumento da concentração do ácido fólico na corrente sanguínea, o que pode reduzir os riscos de ocorrência dos problemas causados pela sua deficiência.

Os materiais e/ou os métodos utilizados para a encapsulação não foram eficientes para aumentar a estabilidade térmica do ácido fólico.

Devido a baixa concentração de ácido fólico exigido para a fortificação da farinha de trigo não foi possível avaliar a degradação do ácido fólico através de análises de ATD-TG e DRX. Portanto, seriam necessários mais estudos utilizando-se outras técnicas para a elucidação da temperatura e tempo de exposição térmica do ácido fólico em amostras de farinha de trigo e massa de pão.