

ERYKA MARIA DOS SANTOS ALVES

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO POR CLAE EM  
FARINHAS DE TRIGO E DE MILHO FORTIFICADAS E  
AVALIAÇÃO DA SUA RETENÇÃO EM PREPARAÇÕES  
SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO

RECIFE

2018

ERYKA MARIA DOS SANTOS ALVES

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO POR CLAE EM  
FARINHAS DE TRIGO E DE MILHO FORTIFICADAS E  
AVALIAÇÃO DA SUA RETENÇÃO EM PREPARAÇÕES  
SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nutrição. Área de concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Emmanuela Prado de Paiva Azevedo

RECIFE

2018

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

- A474e Alves, Eryka Maria dos Santos.  
Determinação de Ácido Fólico por CLAE em farinhas de trigo e de milho fortificadas e avaliação da sua retenção em preparações submetidas a diferentes métodos de cocção / Eryka Maria dos Santos Alves. – 2018.  
91 folhas : il. ;30 cm.
- Orientadora: Margarida Angélica da Silva Vasconcelos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2018. Inclui referências e apêndices.
1. Farinha. 2. Alimentos Fortificados. 3. Ácido Fólico. I. Vasconcelos, Margarida Angélica da Silva. (Orientadora). II. Título.
- 612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-119)

ERYKA MARIA DOS SANTOS ALVES

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO POR CLAE EM FARINHAS DE TRIGO E DE MILHO FORTIFICADAS E AVALIAÇÃO DA SUA RETENÇÃO EM PREPARAÇÕES SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nutrição. Área de concentração: Ciência dos Alimentos.

Dissertação aprovada em: 26 / 02/ 2018

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ester Ribeiro de Andrade  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Antônio Gomes de Castro Neto  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro  
Universidade de Pernambuco - UPE

Recife  
2018

*À **Deus**, que sempre me protege, ampara e concede forças e a quem devo tudo o que tenho e sou. A minha mãe, Maria, por sempre me apoiar e incentivar.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me proteger, abençoar, conceder sabedoria, discernimento, força e coragem para lutar por meus objetivos e me guiar em todos os momentos da minha vida, especialmente nos mais obscuros e de grande dificuldade.

Aos meus pais, José Virgínio Alves e Maria das Dôres dos Santos Alves, por todo amor, carinho, apoio, incentivo e sacrifícios realizados para me propiciar uma educação de qualidade.

Aos meus irmãos, Lúcia Maria Lima Alves, Ednaldo José dos Santos Alves e Edna Maria dos Santos Alves, por torcerem e vibrarem junto comigo a cada vitória alcançada.

A minha orientadora, a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margarida Angélica da Silva Vasconcelos, pela orientação, confiança e disponibilidade.

A minha co-orientadora, a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Emmanuela Prado de Paiva Azevedo, por quem eu nutro um profundo carinho e admiração, pela brilhante co-orientação. Sua presença constante, ativa e tão solícita durante todo desenvolvimento deste trabalho foram fundamentais para que eu conseguisse alcançar todos os objetivos propostos. Obrigada por ter sido, e ser, um ser de fato humano além de iluminado, que muitas vezes foi mais que co-orientadora, foi amiga, sendo capaz de me compreender e apoiar, principalmente em tantos momentos difíceis para mim.

A Anne Jaciele, colega e companheira de laboratório, por ter transmitido com tanta paciência e humildade toda sua bagagem de conhecimentos referentes ao uso do HPLC, meu muito obrigada, sem sua ajuda eu não teria alcançado autonomia no de maneira tão rápida.

Aos companheiros de laboratório, Marcella de Melo Assis e Leonardo dos Santos, pelo grande auxílio prestado durante a realização das minhas análises.

A José Alberto da Costa Medeiros, amigo e companheiro de jornada acadêmica, por toda ajuda, apoio e incentivo, especialmente no primeiro ano do curso de mestrado o qual fora tão difícil para mim. Agradeço de coração.

Aos companheiros de turma do mestrado em especial a galerinha de alimentos, Alberto, Edvaldo, Emanuele, Marina e Roberta, pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN) pelos conhecimentos repassados durante a realização das disciplinas do curso.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pela colaboração deixada na leitura deste trabalho.

À Pós-Graduação em Nutrição da UFPE pela oportunidade cedida para obtenção do título de Mestre e a Cecília, pela disponibilidade sempre que solicitei os serviços da Secretaria da Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muitíssimo obrigada!

***“Tudo posso naquele que me fortalece”.***

**(Filipenses 4,13)**

## RESUMO

O ácido fólico é uma vitamina sintética comumente utilizada para fortificação alimentar. Trata-se de um composto essencial, que deve ser ingerido pelos humanos a fim de evitar manifestações patológicas graves tais como defeitos de formação do tubo neural. O ácido fólico é considerado uma molécula estável, contudo, são limitados os estudos direcionados para a avaliação da sua estabilidade em alimentos submetidos a diferentes métodos de cocção. O presente estudo teve como objetivo avaliar o teor de ácido fólico em farinhas fortificadas e a sua estabilidade em preparações submetidas a diferentes métodos de cocção. O teor de ácido fólico foi determinado em farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas, fortificadas em laboratório bem como em suas preparações submetidas ao calor seco e úmido por meio do emprego de três diferentes métodos de cocção: forno convencional (bolo de trigo, pão de forma e bolo de milho), imersão em água (molho branco) e vapor de água (cuscuz). As análises para determinação do ácido fólico foram realizadas empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector por arranjo de diodos e à espectrometria de massas e também por espectroscopia de infravermelho. A curva de calibração construída utilizando-se a técnica cromatográfica com detecção por arranjo de diodos apresentou boa faixa de linearidade com  $R^2$  de 0,9996. A taxa de recuperação apresentou valor de 51,3% e 52,6% para as farinhas de trigo e de milho, respectivamente. O LD obtido foi de  $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e o LQ  $0,06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os parâmetros de linearidade, detecção e quantificação foram satisfatórios, contudo, o de exatidão se mostrou menos adequado. Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas de determinação de ácido fólico para as diferentes marcas de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas demonstraram ausência do composto nas matrizes avaliadas. As amostras de farinhas fortificadas com ácido fólico em laboratório apresentaram teores de  $487\pm 0,5$  e  $474\pm 0,2 \mu\text{g}$  de ácido fólico/100 g de farinha trigo e de milho, respectivamente. Os métodos de cocção empregados para as diferentes preparações elaboradas com as farinhas fortificadas em laboratório levaram a variadas retenções no conteúdo de ácido fólico. Os teores da vitamina encontrados nas amostras cruas foram de  $335\pm 0,3$ ,  $218\pm 0,2$ ,  $431\pm 0,4$ ,  $272\pm 0,4$ ,  $310\pm 0,3 \mu\text{g}$  para bolo de trigo, molho branco, pão de forma, bolo de milho e cuscuz, respectivamente. Para as preparações elaboradas com farinha de trigo, a maior retenção foi observada para o pão de forma ( $87\pm 7\%$ ) seguida do bolo ( $80\pm 17\%$ ) e molho branco ( $57\pm 4\%$ ). Para as formulações elaboradas com farinha de milho, a maior retenção ocorreu para o bolo ( $99,8\%$ ) seguida do cuscuz ( $97,11\%$ ). Os testes estatísticos empregados demonstraram que a cocção por calor úmido promove perdas significativas de ácido fólico em comparação ao calor seco com valor de  $p < 0,0001$ . Portanto, a retenção no conteúdo de ácido fólico em alimentos coccionados é influenciada pelo método de cocção empregado, sendo a cocção por calor seco a técnica que melhor contribui para a retenção do ácido fólico nos alimentos.

**Palavras-chave:** Farinhas. Fortificação. Vitamina B<sub>9</sub>. Estabilidade térmica.

## ABSTRACT

Folic acid is a synthetic vitamin commonly used for food fortification. It is an essential compound that must be ingested by humans in order to avoid serious pathological manifestations such as, neural tube defects. Folic acid is considered a stable molecule, however, studies focused at evaluating its stability in foods submitted to different cooking methods are limited. The aim of this study was to evaluate the folic acid content in fortified flours. Also, their stability in preparations submitted to different cooking methods. The folic acid content was determined in wheat and corn flours (commercially and manually fortified) as well as in its preparations submitted to dry and humid heat using three different cooking methods: conventional oven (wheat cake, bread of form and corn cake), immersion in water (white sauce) and water vapor (couscous). The analyzes for folic acid determination were performed using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to the detector by diode array and mass spectrometry, also by infrared spectroscopy. The calibration curve constructed using the chromatographic technique with detection by diode array showed good linearity range with  $R^2$  of 0.9996. The recovery rate was 51.3% and 52.6% for wheat and corn flour, respectively. The detection limit (LD) obtained was  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the quantification limit (QL)  $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The linearity, detection and quantification limits were satisfactory; however, the accuracy was unsuitable. The results obtained by the different techniques of folic acid determination, for the different brands of commercially fortified wheat flour and corn, showed absence of the vitamin in the evaluated matrix. Samples of manually fortified flours with folic acid showed levels of  $487 \pm 0.5$  and  $474 \pm 0.2 \mu\text{g}$  of folic acid / 100 g of wheat and corn flour, respectively. The cooking methods used for the different preparations made with manually fortified flours have led to different retention rates in the folic acid content. The vitamin contents found in the raw samples were  $335 \pm 0.3$ ,  $218 \pm 0.2$ ,  $431 \pm 0.4$ ,  $272 \pm 0.4$ ,  $310 \pm 0.3 \mu\text{g}$  for wheat cake, white sauce, corn cake and couscous, respectively. For preparations made with wheat flour, the highest retention was observed for bread of form ( $87 \pm 7\%$ ) followed by cake ( $80 \pm 17\%$ ) and white sauce ( $57 \pm 4\%$ ). For formulations made with corn flour, the highest retention occurred for the cake (99.8%) followed by couscous (97.11%). The statistical tests used showed that wet heat cooking method promotes significant loss of folic acid compared to dry heat method with a value of  $p < 0.0001$ . Therefore, the retention in the content of folic acid in cooked foods is influenced by the cooking method used, with dry heat cooking being the technique that best contributes to the retention of folic acid in foods.

**Keywords:** Flours. Fortification. Vitamin B<sub>9</sub>. Thermal stability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Estrutura química do ácido fólico.....	20
<b>Figura 2</b>	Cromatograma e espectro de absorção obtido por CLAE-DAD referente ao padrão de ácido fólico ( $1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	40
<b>Figura 3</b>	Curva de calibração referente ao ácido fólico obtida a partir da solução padrão de concentração igual a $1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	41
<b>Figura 4</b>	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes a uma das amostras de farinha de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no primeiro lote com possíveis isoformas de folatos: (1) 5-formiltetrahidrofolato; (2) 5-metiltetrahidrofolato; (3) ácido pteróico. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	43
<b>Figura 5</b>	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes a uma das amostras de farinha de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no segundo lote. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	45
<b>Figura 6</b>	Cromatogramas e espectros de absorção obtidos por CLAE-DAD referentes as amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $330\mu\text{g.100g}^{-1}$ ) em laboratório. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	47
<b>Figura 7</b>	Cromatograma obtido por UPLC-EM referente ao padrão de ácido fólico ( $1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	48
<b>Figura 8</b>	Cromatogramas obtidos por UPLC-EM referentes a uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no primeiro lote. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	49

<b>Figura 9</b>	Cromatogramas obtidos por UPLC-EM referentes a uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no segundo lote. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	50
<b>Figura 10</b>	Cromatogramas obtidos por UPLC-EM referentes as amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico (330 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	52
<b>Figura 11</b>	Espectros de absorção molecular na região do infravermelho (IV) do ácido fólico de uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas .....	54
<b>Figura 12</b>	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes as amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $1000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	56
<b>Figura 13</b>	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes as preparações elaboradas com farinha de trigo fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	58
<b>Figura 14</b>	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes as preparações elaboradas com farinha de milho fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório. As condições cromatográficas estão descritas na imagem .....	60
<b>Figura 15</b>	Comparação entre as preparações coccionadas em meio seco e úmido. 1 - cocção por calor seco; 2 - cocção por calor úmido .....	63
<b>Figura 16</b>	Comparação entre os tratamentos de farinha de trigo fortificada com ácido fólico. Letras diferentes indicam diferenças entre as médias ( $p < 0.0001$ ). 1-farinha de trigo fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ); 2 - bolo de trigo antes da cocção; 3 - bolo de trigo	

após a cocção; 4 - pão de forma antes da cocção; 5 - pão de forma após a cocção ..... 64

**Figura 17** Comparação entre os tratamentos de farinha de milho fortificada com ácido fólico. Letras diferentes indicam diferenças entre as médias ( $p < 0.0001$ ). 8 - cuscuz antes da cocção; 9 cuscuz após a cocção; 10 - bolo de milho antes da cocção; 11 - bolo de milho após a cocção; 12 - farinha de milho fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) ..... 65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Conteúdo de ácido fólico quantificado por CLAE-DAD em farinhas fortificadas ( $1.000 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório (n=5) .....	57
<b>Tabela 2</b>	Conteúdo de ácido fólico determinado por CLAE-DAD nas preparações cruas (n = 5) .....	61
<b>Tabela 3</b>	Retenção real do ácido fólico nas preparações elaboradas com farinha de trigo fortificada com ácido fólico ( $1.000 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório (n=5) .....	62
<b>Tabela 4</b>	Retenção real do ácido fólico nas preparações elaboradas com farinha de milho fortificada com ácido fólico ( $1.000 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório (n=5) .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos
UPLC-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à espectrometria de massas
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DFTN	Defeitos de Formação do Tubo Neural
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Farinha de Milho
FT	Farinha de Trigo
IV	Infravermelho
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
MS	Ministério da Saúde
NaOH	Hidróxido de Sódio
PABA	Ácido p-aminobenzóico
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SVS	Serviço de Vigilância em Saúde

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g	Grama
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimolar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
m/v	Concentração massa/volume
v/v	Concentração volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 ÁCIDO FÓLICO.....	20
2.2 EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ÁCIDO FÓLICO SOBRE A SAÚDE DA POPULAÇÃO.....	22
2.3 ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO EM ALIMENTOS SUBMETIDOS A DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO .....	24
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>27</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 GERAL .....	28
4.2 ESPECÍFICOS .....	28
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
5.1 MATERIAIS .....	29
<b>5.1.1 Amostras</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1.2 Reagentes e padrão</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1.3 Equipamentos</b> .....	<b>30</b>
5.2 MÉTODOS .....	30
<b>5.2.1 Protocolo de homogeneização do ácido fólico às matrizes farináceas</b> ....	<b>30</b>
<b>5.2.2 Protocolo de fortificação das matrizes farináceas em laboratório</b> .....	<b>33</b>
<b>5.2.3 Elaboração das preparações</b> .....	<b>34</b>
<b>5.2.4 Avaliação da retenção de ácido fólico</b> .....	<b>35</b>
<b>5.2.5 Análise de ácido fólico por cromatografia líquida</b> .....	<b>35</b>
5.2.5.1 Preparo da solução do padrão .....	35
5.2.5.2 Adequação do protocolo de extração de ácido fólico .....	35
5.2.5.3 Determinação de ácido fólico por cromatografia líquida acoplada do detector por arranjo de diodos .....	36
5.2.5.3.1 Identificação e quantificação .....	36
5.2.5.3.2 Taxa de recuperação.....	37
5.2.5.4 Determinação de ácido fólico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas .....	38
<b>5.2.6 Análise de ácido fólico por Espectroscopia de Infravermelho com ATR</b> ..	<b>38</b>
<b>5.2.7 Análise estatística</b> .....	<b>39</b>

<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE A - Ficha técnica de preparo de bolo de trigo .....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE B - Ficha técnica de preparo de molho branco .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE C - Ficha técnica de preparo de pão de forma .....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE D - Ficha técnica de preparo de bolo de milho .....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE E - Ficha técnica de preparo de cuscuz .....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE F - Dados para cálculo da retenção real (RR%) do ácido fólico nas diferentes preparações.....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos essenciais para o funcionamento normal do corpo humano. Elas são micronutrientes, sendo algumas não sintetizadas pelo homem, mas necessárias, mesmo em pequenas quantidades, pois desempenham uma grande variedade de funções químicas e fisiológicas como controle das funções celulares, prevenção de doenças, dentre outras, que são fundamentais para a manutenção das funções metabólicas (BALL, 2006). As vitaminas são subdivididas em dois grupos: as vitaminas lipossolúveis, representadas pelas vitaminas A, D, E e K e as vitaminas hidrossolúveis que inclui as vitaminas do complexo B e a vitamina C (BONNER-SHERGILL, 2017).

É consenso o entendimento que a baixa ingestão de alimentos fonte de micronutrientes pode conduzir a estados de carência nutricional e, conseqüentemente, a manifestações patológicas (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ et al., 1997). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 2 bilhões de pessoas apresentam deficiência de importantes nutrientes com destaque para o ferro, zinco, vitamina A, D, tiamina e ácido fólico (BONNER-SHERGILL, 2017; LÍBERA et al., 2008).

O ácido fólico, conhecido como a forma sintética da vitamina B9, é um composto cristalino, de coloração amarelo sinteticamente produzido pelas indústrias alimentícias e utilizado em suplementos nutricionais e na fortificação de cereais e farinhas (LUCOCK, 2000; SWIGLO, 2007; SUZART, 2016). Sua baixa ingestão tem sido apontada como um fator que induz a manifestação de doenças graves que atingem o homem, como as malformações congênitas, doenças cardiovasculares, cerebrovascular, entre outras (JUZENIENE et al., 2016; SCOTT, RÉBEILLÉ, FLETCHER, 200; SUZART, 2016; UEHARA, ROSA, 2010).

Em virtude dos elevados índices de problemas relacionados com a carência de ácido fólico, diversos países deram início à fortificação de cereais e farinhas, de forma voluntária ou por meio de legislação (LUCOCK, 2000; LYNOTT, 2006). No Brasil, a obrigatoriedade da fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico (150 µg/100g) foi primeiramente instituída por meio da implantação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 344 de 13 de dezembro de 2002 (BRASIL, 2002). No entanto, os requisitos para enriquecimento das referidas matérias-primas foram atualizados em

abril de 2017 através da publicação da Resolução - RDC nº 150 de 13 de abril de 2017 (BRASIL, 2017) que revogou a Portaria SVS/MS n. 344/2002. Dentre as atualizações está o estabelecimento de um limite máximo para adição da vitamina nas farinhas de modo a evitar a exposição a um risco desnecessário por parte da população brasileira. Por meio das novas regras, todos os produtores são obrigados a enriquecer as farinhas de trigo e de milho com 140 a 220 µg de ácido fólico para cada 100g do produto (BRASIL, 2017).

A fortificação de alimentos com vitaminas, em especial o ácido fólico, é uma importante intervenção na prevenção primária, com repercussão na prevenção dos defeitos do tubo neural (BRASIL, 2009). No entanto, as vitaminas constituem o grupo de nutrientes mais susceptíveis a perdas durante a preparação dos alimentos, especialmente na etapa de cocção (TORRES, 2009).

A cocção é um processo que usa o efeito do calor promovendo trocas químicas, físico-químicas e estruturais nos componentes dos alimentos (ALVES et al., 2011). Quando comparadas diferentes técnicas de cocção são observadas diferentes intensidades nas perdas das vitaminas (TORRES, 2009). Em virtude da característica termolábil destes nutrientes o tratamento térmico é, portanto, um importante fator de degradação das vitaminas podendo seu efeito variar de acordo com o tipo de alimento, o método e o tempo de cocção empregados (LEŠKOVÁ et al., 2006).

O ácido fólico é uma molécula instável, sensível à luz e sofre degradação oxidativa, que é reforçada por condições de pH, oxigênio, do calor e de ácidos (JUZENIENE et al., 2016), porém pouco se sabe a respeito da sua estabilidade frente a diferentes métodos de cocção. O conhecimento das concentrações de nutrientes em matrizes alimentares, entre eles as vitaminas, é fundamental para a elaboração de planos alimentares além da análise de estudos de ingestão de nutrientes e adequação nutricional (DELLA LUCIA et al., 2011).

Desta forma, levando em consideração os aspectos acima citados e a necessidade do desenvolvimento de estudos que tenham por finalidade o conhecimento do comportamento das vitaminas em preparações comumente consumidas, a presente pesquisa teve como objetivo investigar a presença do ácido fólico em farinhas de trigo e de milho fortificadas e avaliar a sua retenção em preparações submetidas a diferentes métodos de cocção.

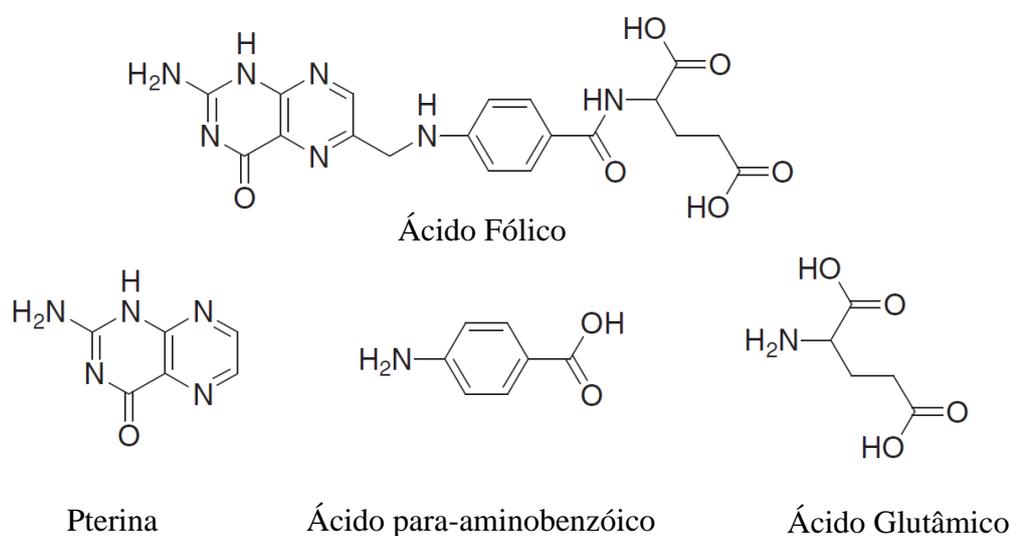
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ÁCIDO FÓLICO

Quimicamente o ácido fólico (Figura 1) é formado por um anel de pteridina, uma molécula de ácido para-aminobenzóico e uma de L-glutamato (PANE, 2007). Ele é um monoglutamato no estado mais oxidado, não encontrado naturalmente nos alimentos, mas que, quando comparado a outras formas de folato, apresenta maior estabilidade sendo normalmente empregado para a prática de fortificação de alimentos, na produção de suplementos nutricionais e medicamentos (BALUZ, CARMO, ROSAS, 2002; BALL, 2006; NEVES, 2013; PAIVA, 2012; SAWAENGSRRI et al., 2016; SUZART, 2016; VORA et al., 2004).

O ácido fólico tem sido relatado como sendo uma das vitaminas essenciais para o metabolismo humano. Indispensável para as reações metabólicas específicas no meio celular além de vital para o desempenho e desenvolvimento normal do organismo, ele participa de processos biológicos fundamentais atuando como co-fator. Tais processos acontecem em dois ciclos importantes, o “ciclo da biossíntese do DNA” (co-fator na síntese do material genético) e o “ciclo de metilação” (co-fator na formação da metionina) (NEVES, 2013; SUZART, 2016).

**Figura 1:** Estrutura química do ácido fólico e as diferentes partes; pterina, ácido para-aminobenzóico (PABA) e ácido glutâmico que formam sua estrutura



**Fonte:** Adaptado de GAZZALI et al. (2016)

No ciclo da biossíntese do DNA a deficiência em ácido fólico interfere na replicação do DNA reduzindo sua capacidade de síntese e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de divisão celular. Esta redução de capacidade ocorre especialmente em células que sofrem divisão mais rapidamente, como as do tecido hematopoiético na medula óssea, causando anemia megaloblástica (SCOTT; RÉBEILLÉ; FLETCHER, 2000; BALL, 2006).

No ciclo da metilação a carência de ácido fólico pode ocasionar neuropatias em virtude da dificuldade na síntese da mielina, além de acúmulo de homocisteína no plasma sanguíneo que pode ocasionar doenças cardiovasculares (ANDERSON et al., 2004; DE KONING et al., 2003). Níveis elevados de homocisteína pode estar associado ao desenvolvimento de diabetes e artrite reumatóide (SUZART, 2016).

O reduzido consumo de ácido fólico tem sido mencionado como um fator que predispõe à manifestação de graves enfermidades que atingem o homem, como as doenças cardíacas, o câncer e as malformações congênitas (SUZART, 2016).

Durante a gestação o ácido fólico é fundamental em virtude do elevado número de células em divisão celular associada ao acelerado crescimento do feto e da placenta (CZEIZEL, DUDÁS, 1992). Sua deficiência é apontada como sendo a principal causa responsável pela incidência de malformações congênitas, os chamados defeitos da formação do tubo neural (DFTN). Tais defeitos são malformações do sistema nervoso central do embrião, consequência de modificações em sua configuração física durante a primeira etapa de gestação, com repercussão na formação do cérebro (CABRERA et al., 2004; GONZÁLEZ, CARBALLO, 2003; RAMAEKERS, BLAU, 2004).

As formas clínicas do DFTN mais comuns são anencefalia (ausência total ou parcial do crânio e do cérebro devido seu subdesenvolvimento) (AGUIAR et al., 2003; GONZÁLEZ, CARBALLO, 2003; ROURE, 2010); encefalocele (tecidos cerebrais projetados para fora através de uma abertura anormal do crânio) (PIETRO et al., 2006); e a espinha bífida (má formação das vértebras com exposição ou não da medula óssea) (GONZALÉZ, CARBALLO, 2003; SANDLER, 2010).

Outros problemas congênitos associados à carência de ácido fólico nas gestantes incluem os lábios leporinos, o defeito de septo ventricular e a fenda palatina (UEHARA, ROSA, 2010; NEVES, 2013).

O folato é um constituinte bioquímico essencial às células vivas e a maioria dos alimentos contribui com quantidades variáveis para a dieta. O teor varia em função do tipo, estado de maturação e parte do alimento em questão (SUZART, 2016). O folato está presente em vegetais como espinafre, aspargo e brócolis (HASSAN, 2015; NEVES, 2013). Também pode ser encontrado em alimentos como acelga, couve, abobrinha, feijão, gema de ovo, cereais, abacate, banana e em algumas raízes (QUIRÓS et al., 2005).

O consumo de uma dieta pobre em frutas, legumes e cereais pode contribuir para a diminuição dos níveis séricos desta vitamina no corpo. A deficiência leve de ácido fólico geralmente é assintomática, no entanto, em estados mais graves sintomas como dor na língua, diarreia, dores de cabeça, fraqueza, esquecimento e fadiga podem se desenvolver (HASSAN, 2015).

A dose diária recomendada de ácido fólico para um adulto normal é de 240 µg/dia. Durante a gestação a quantidade de ácido fólico requerida aumenta cerca de 5 a 10 vezes, devido à maior necessidade de multiplicação celular, a formação da placenta e desenvolvimento do bebê (NEVES, 2013).

## 2.2 EFEITOS DA FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ÁCIDO FÓLICO SOBRE A SAÚDE DA POPULAÇÃO

O enriquecimento ou fortificação é a adição de um ou mais nutrientes essenciais a um alimento, com o propósito de prevenir ou corrigir a deficiência de um ou mais nutrientes em uma população (CODEX, 2015). Trata-se de uma forma de fornecer nutrientes usando alimentos básicos como agentes, com o objetivo de complementar a dieta através da ingestão desses nutrientes (ROSELL, 2016). O processo de fortificação também deve garantir que a quantidade de nutrientes essenciais seja suficiente para corrigir ou prevenir a deficiência visada, especialmente quando o alimento é consumido em quantidades normais pela população em risco (FATHIMA, NALLAMUTHU, KHANUM, 2017).

Em virtude do elevado índice de problemas relacionados à carência de vitaminas no corpo humano, especialmente o ácido fólico, o FDA publicou, em março de 1996, uma normatização determinando que todos os cereais e produtos de origem

cereal tais como arroz, farinhas, cereais matinais e macarrão, deveriam sofrer uma adição média de 140 µg de ácido fólico a cada 100g de produto (FDA, 1996).

No Brasil, a fortificação de farinhas de trigo e milho foi instituída pela Resolução RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002, emitida pela Anvisa. A resolução determinou a adição obrigatória de 4,2 mg de ferro e de 150 µg de ácido fólico nas farinhas de trigo e milho, com a finalidade de reduzir o risco de malformações congênitas e anemia ferropriva (BRASIL, 2002). Em 2017 os requisitos para fortalecimento das farinhas de trigo e de milho foram atualizados. A publicação da Resolução RDC nº 150 de 13 de abril de 2017 (BRASIL, 2017) estabelece, dentre outros requisitos, limites mínimo e máximo para adição do ácido fólico nas farinhas de trigo e de milho com o intuito de minimizar os riscos de ingestão excessiva (> 1 mg de ácido fólico/dia) (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010) evitando assim a exposição à um risco desnecessário por parte da população brasileira. Através das novas regras, todos os produtores são obrigados a enriquecer as farinhas de trigo e milho com 140 a 220µg de ácido fólico para cada 100g do produto (BRASIL, 2017).

Como resultado do processo de fortificação de alimentos com ácido fólico diversos estudos têm observado a redução de defeitos do tubo neural a partir da fortificação de farinhas com ácido fólico (CASTILLO-LANCELOTTI et al., 2013). Os países que apresentaram a maior taxa de diminuição nos defeitos do tubo neural devido à fortificação foram a Costa Rica (58%), o Canadá (49%) e a Argentina (49,7%). As maiores reduções de espinha bífida foram observadas na Costa Rica (61%), no Canadá (55%) e no Chile (55%). A menor redução observada para os defeitos do tubo neural (15,5%) e espinha bífida (3,4%) foi relatada para os Estados Unidos (PHILLIPS, 2017).

Em países como o Canadá, a prática da fortificação de alimentos com ácido fólico tem demonstrado, para além dos efeitos positivos na prevenção de defeitos do tubo neural e espinha bífida, benefício adicional dessa intervenção na redução da prevalência de nascidos com doença cardíaca congênita. Em recente estudo desenvolvido por Liu et al. (2016) constatou-se que as taxas da maioria dos subtipos de doença cardíaca congênita diminuíram entre 1990 e 2011, sendo a fortificação associada a menores taxas de defeitos da aorta, septo ventricular e atrial, dentre outros.

No Brasil, após a implementação da prática de fortificação das farinhas com ácido fólico, verificou-se redução significativa (aproximadamente 30%) na prevalência de doenças do tubo neural em bebês. Tal informação foi obtida através da comparação entre os registros de nascimento do período antes (2001-2004) e após o enriquecimento obrigatório das farinhas de trigo e de milho (2005-2014). No período pré-enriquecimento, foram registrados 0,79 casos de DFTN por mil nascidos vivos, ao passo que, no período pós-enriquecimento, foram encontrados 0,55 casos por mil nascidos vivos (ANVISA, 2017).

No entanto, nos últimos anos, estudos demonstram evidências que sugerem que altas ingestões de ácido fólico podem estar associadas a efeitos adversos à saúde. Há preocupação a respeito da ligação do excesso da ingestão de ácido fólico e aumento de episódios convulsivos em mulheres grávidas com epilepsia (PHILLIPS, 2017). Existem também evidências que o excesso de ácido fólico contribua para o desenvolvimento de câncer colo retal especialmente pela capacidade de facilitar a progressão de lesões cancerosas já presentes (CRIDER, 2011).

### 2.3 ESTABILIDADE DO ÁCIDO FÓLICO EM ALIMENTOS SUBMETIDOS A DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO

A fortificação com ácido fólico em itens alimentares comumente consumidos tais como farinha de trigo e milho, tem sido proposta como o melhor método de assegurar que o aumento da ingestão de ácido fólico reduza os riscos associados à deficiência desse micronutriente (PENALVA et al., 2015). Contudo, são necessários estudos do comportamento dos nutrientes após o enriquecimento com o objetivo de avaliar o teor presente da vitamina após o processamento, estocagem e cozimento do alimento fortificado, uma vez que tais condições podem alterar a sua concentração (PHILIPS et al., 2005).

A cocção ou cozimento é o processo que usa o efeito do calor promovendo trocas químicas, físico-químicas e estruturais nos componentes dos alimentos (ALVES et al., 2011) além de contribuir para a perda de micronutrientes, como as vitaminas.

O ácido fólico, em virtude de sua reatividade química e solubilidade, é susceptível a consideráveis perdas durante o processamento, armazenamento e

cozimento dos alimentos. Sua estabilidade química é afetada principalmente pelo pH, calor, exposição ao oxigênio e intensidade da luz. Além disso, sua natureza hidrossolúvel contribui para que as perdas ocorram principalmente devido a lixiviação em alimentos cozidos (LIMA, 2005).

Na grande maioria dos casos, o ácido fólico apresenta-se substancialmente mais estável que os folatos na forma reduzida. É sinteticamente produzido pelas indústrias em virtude do baixo custo envolvido na produção além de apresentar maior estabilidade se comparado aos folatos, sendo a forma da vitamina utilizada em suplementos nutricionais e na fortificação de cereais matinais e farinhas (LUCOCK, 2000, SWIGLO, 2007, SUZART, 2016).

Alguns dados provenientes da literatura relatam sobre a estabilidade do ácido fólico frente a diferentes condições. Lima-Pallone, Catharino, Godoy (2008a), ao estudarem a estabilidade do folato em espinafre e brócolis, verificaram que sua perda esteve mais relacionada à lixiviação durante o cozimento, e não devido o processamento térmico.

O estudo da estabilidade do ácido fólico adicionado ao leite durante a etapa de esterilização demonstrou que a oxidação térmica ocasionou perda média de 10% no conteúdo dessa vitamina (LIMA-PALLONE, CATHARINO, GODOY, 2006). No entanto, Boeneke; Aryana (2008) observaram que a pasteurização (65°C por 30 min) não proporcionou uma diferença significativa no teor de ácido fólico em iogurtes de limão.

A avaliação de macarrão instantâneo frito demonstrou que o ácido fólico se apresentou estável durante as etapas envolvidas em sua produção; preparo da massa, corte, cocção por vapor e fritura, além de ter possuído recuperações entre 96-103% (CHEUNG et al., 2009).

São escassos os dados a respeito da estabilidade do ácido fólico em alimentos elaborados a partir de matérias-primas fortificadas. A grande maioria dos estudos reporta, predominantemente, sobre a estabilidade das formas nativas, os folatos, em matrizes alimentares vegetais. Outros apresentam ainda enfoque para os processos executados em ambiente industrial e, em menor quantidade, estão os estudos voltados para avaliar a estabilidade do ácido fólico em alimentos submetidos a diferentes métodos de cocção. Contudo, se observa que, embora seja mais estável

que suas formas nativas, o ácido fólico, quando submetido a diferentes técnicas de cozimento, apresenta o mesmo comportamento de degradação sendo seu conteúdo nos alimentos reduzido principalmente devido a extração aquosa da vitamina na água de cocção processo conhecido como lixiviação (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

### **3 HIPÓTESE**

A estabilidade térmica do ácido fólico presente em farinhas de trigo e de milho fortificadas bem como em preparações elaboradas com estas, pode sofrer influência dos métodos de cocção empregados.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Avaliar o conteúdo de ácido fólico em farinhas de trigo e de milho fortificadas e o efeito do tratamento térmico sob sua retenção em preparações submetidas a diferentes métodos de cocção.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de ácido fólico em farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas e fortificadas em laboratório;
- Elaborar preparações de bolo de trigo, molho branco e pão de forma com farinha de trigo e preparações de bolo de milho e cuscuz com farinha de milho ambas fortificadas com ácido fólico;
- Determinar o conteúdo de ácido fólico nas preparações elaboradas com farinha de trigo e de milho fortificadas;
- Verificar a retenção do ácido fólico em preparações submetidas a diferentes métodos de cocção.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAIS

#### 5.1.1 Amostras

As amostras de farinhas de trigo e de milho avaliadas no estudo, bem como os ingredientes utilizados para elaboração do bolo de trigo, molho branco, pão de forma, bolo de milho e cuscuz, foram adquiridos em supermercados localizados na região metropolitana da cidade do Recife-PE, Brasil.

Foram avaliadas farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas bem como farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico em laboratório. Para as farinhas comercialmente fortificadas o critério adotado para escolha foi o quantitativo de marcas comercializadas nos diferentes supermercados. Foi realizada uma busca a fim de identificar quantas e quais marcas eram vendidas. Foi possível identificar a comercialização em comum de seis e três diferentes marcas de farinhas de trigo e de milho, respectivamente, em todos os supermercados visitados. Assim, o contingente amostral relacionado às farinhas comercialmente fortificadas foi composto por seis diferentes marcas de farinha de trigo (FT1, FT2, FT3, FT4, FT5, FT6) e três diferentes marcas de farinha de milho (FM1, FM2, FM3) que foram coletadas de dois lotes distintos e avaliados em meses diferentes do ano (julho e setembro), totalizando 18 amostras. O tamanho dos pacotes das farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas foram de 1 kg e 500g, respectivamente.

As farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico em ambiente laboratorial tiveram adição da vitamina seguindo o protocolo de fortificação descrito no item 5.2.1. sendo as mesmas utilizadas para a elaboração das diferentes preparações para avaliação da estabilidade térmica do ácido fólico.

Os procedimentos de amostragem seguiram as instruções da RDC 12/2001 (BRASIL, 2001) onde, para cada lote das diferentes marcas avaliadas, o conteúdo total de três pacotes de farinha do mesmo lote foi manualmente homogeneizado e sucessivamente quarteado até obtenção da amostra de trabalho, aproximadamente 100 g de farinha, a qual foi utilizada para análise de ácido fólico. Todas as determinações foram realizadas em quintuplicata.

### 5.1.2 Reagentes e padrão

Foram utilizados no preparo da fase móvel metanol (Merck®, Brasil), fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich®, Alemanha) e ácido ortofosfórico (Fluka®, Suíça), todos em grau de pureza superior a 99% ou grau cromatográfico. A solução extratora foi composta por acetato de amônio (Vetec®, Brasil) e ácido ascórbico (Vetec®, Brasil) ambos em grau analítico.

O padrão utilizado foi ácido fólico (Sigma-Aldrich®, EUA) em grau de pureza analítico (superior a 99%) para identificação e quantificação dos picos.

A água utilizada no preparo de soluções e fase móvel foi obtida a partir de um sistema de ultrapurificação apresentando 18M $\Omega$ .cm e Carbono Orgânico Total 10 ppb a 25°C.

### 5.1.3 Equipamentos

Todas as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu (Shimadzu®, Japão), composto pelos seguintes módulos: sistema controlador modelo CBM-20A, detector de arranjos de diodos (DAD) modelo SPD-20AV, bomba quaternária modelo LC-20TA, forno para coluna modelo CTO-20AC, amostrador automático modelo SIL-20AC. Todos os comandos foram realizados utilizando software LC Solution (versão 1,25, Shimadzu®, Japão).

Foram utilizados pHmetro (Mettler toledo®), balança analítica (Tecnal®), agitador de bancada (Fisatom®), centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810®), banho termostaticado (Quimis®), os quais durante todo período de execução deste estudo passaram por calibrações diárias seguindo as orientações do fabricante.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Protocolo de homogeneização do ácido fólico às matrizes farináceas

Diferentes procedimentos de homogeneização do ácido fólico às matrizes farináceas de trigo e de milho foram testados em ambiente laboratorial. Tais testes foram realizados a fim de detectar o procedimento homogeneizador que melhor promovesse a mistura da vitamina às diferentes amostras de farinhas que

posteriormente seriam utilizadas para estudo da retenção do ácido fólico nas preparações submetidas a diferentes métodos de cocção. Para tanto, foram executados quatro diferentes métodos de homogeneização: saco plástico, liquidificador, batedeira e *cutter*. Em todos os testes, a quantidade de ácido fólico adicionada nas farinhas foi determinada com base no limite máximo estipulado na legislação brasileira ( $220\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) (BRASIL, 2017) com acréscimo de 50% para compensar as possíveis perdas da vitamina durante o processo de mistura. Desta forma, adicionou-se o equivalente a 0,0017g de ácido fólico a 500g de farinha de trigo ou de milho, a fim de alcançar uma concentração de  $330\mu\text{g}$  de ácido fólico. $100\text{g}^{-1}$  de farinha.

O primeiro procedimento de homogeneização foi executado usando sacos plásticos. Foram utilizados sacos plásticos transparentes, normalmente destinados ao acondicionamento de vegetais, com capacidade de 5kg. O conteúdo total (500g) das diferentes amostras de farinhas a serem adicionadas do ácido fólico foram pesados diretamente nos sacos e, em seguida, tiveram a adição da vitamina (0,0017g). Os sacos foram lacrados com fita e iniciou-se o processo de homogeneização. Diferentes movimentos em diferentes direções foram executados a fim de promover a mistura dos diferentes sólidos. Movimentos do tipo “para cima”, “para baixo”, “para a direita” e “para a esquerda” foram realizados em três diferentes intervalos de tempo, a saber: 5, 10 e 15 min. O tempo de 5 minutos foi o tempo inicial empregado. A partir da análise dos resultados foi observada a necessidade de aumentar o tempo de homogeneização. Desta forma, 10min e 15min foram o segundo e terceiro tempos, respectivamente, empregados. Para os testes de homogeneização seguintes foram utilizados o liquidificador, a batedeira e o *cutter* como homogeneizadores. Assim como na homogeneização utilizando sacos plásticos, nas homogeneizações utilizando liquidificador, batedeira e *cutter* também foram empregadas as quantidades de 500g de farinha de trigo ou de milho e 0,0017g de ácido fólico. Para as três diferentes técnicas, o conteúdo da vitamina foi adicionado diretamente à matriz farinácea e, sem prévia homogeneização manual, o conjunto vitamina mais amostra foi despejado nos homogeneizadores (liquidificador, batedeira ou *cutter*) e agitados durante 10 minutos. Dentre as diferentes técnicas de homogeneização empregadas (saco plástico, liquidificador, batedeira e *cutter*), a técnica por *cutter* foi a escolhida e, portanto, utilizada para os testes seguintes. A quantidade de ácido fólico, porém, se mostrou

baixa para o estudo de retenção da vitamina após os diferentes processos de cocção. Assim, para o estudo da retenção do ácido fólico, optou-se por utilizar quantidade maior de ácido fólico no processo de fortificação (item 5.2.2). Contudo, para comparação das técnicas cromatográficas (CLAE-DAD e UPLC-EM) e avaliação do procedimento de homogeneização, os cromatogramas provenientes do teste de mistura utilizando *cutter* como homogeneizador e a concentração de 0,0017g de ácido fólico ( $330\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) foram os apresentados na sessão resultados.

Os testes de homogeneização utilizando diferentes homogeneizadores para mistura (saco plástico, liquidificador, batedeira e *cutter*) foram realizados com a matriz farinácea não peneirada. Ainda na tentativa de otimizar o processo de mistura da vitamina à matriz farinácea, a técnica por *cutter* foi executada nas amostras de farinhas peneiradas, de duas formas distintas: com a realização do peneiramento da farinha após o processo de homogeneização da vitamina às matrizes farináceas e com realização do peneiramento da farinha durante a execução do processo de homogeneização dos dois sólidos. Estes testes foram realizados já utilizando quantidades maiores ( $5.000\mu\text{g}$ ) de ácido fólico a fim de obter concentração de  $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de farinha, sendo esta também a quantidade de vitamina empregada no protocolo de fortificação das diferentes farinhas (item 5.2.2). Para o primeiro teste (farinhas peneiradas após o processo de homogeneização), o conteúdo de ácido fólico (0,0050 g) foi adicionado ao conteúdo total (500g) das matrizes farináceas, agitados em *cutter* durante 8 minutos e peneirados utilizando peneira doméstica. No segundo teste (farinhas peneiradas durante o processo de homogeneização), os 500 g das farinhas de trigo e de milho foram primeiramente agitados em *cutter* durante 1 minuto e, em seguida, peneirados sendo o resíduo retido na peneira descartado. Esse procedimento foi realizado na tentativa de diminuir a granulometria das farinhas, especialmente da farinha de milho, e assim dispersar melhor a vitamina. Tal procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, o conteúdo total das farinhas (500 g) foi fracionado em cinco porções (100g cada). A quantidade total (0,0050g) de ácido fólico a ser adicionado às matrizes farináceas também foi pesada em cinco diferentes frações (5 frações de 0,0010g cada). A seguir, cada fração de ácido fólico (0,0010g) foi então adicionada a cada uma das porções (100 g) das farinhas de trigo e de milho sendo a mistura (farinha mais vitamina), primeiramente, homogeneizada manualmente durante 1 min com auxílio de uma espátula e, em seguida,

homogeneizada em *cutter* também durante 1 minuto. Esse procedimento foi repetido para cada uma das cinco porções (100g cada) provenientes do fracionamento do conteúdo total (500 g) das farinhas de trigo e de milho. Após cada uma das porções da farinha serem adicionadas de ácido fólico e homogeneizadas, manual e mecanicamente, o conteúdo total (500g) foi misturado e homogeneizado em *cutter* durante 2 minutos. Ao final do procedimento de homogeneização, o tempo total empregado para a mistura da vitamina à matriz farinácea, incluindo a homogeneização manual (1 min para cada 100 g) e mecânica (1 min para cada 100g + 2 minutos para 500g), foi de 12 minutos. A partir dos resultados obtidos, este último método de homogeneização descrito foi o utilizado no protocolo de fortificação executado para as farinhas de trigo e de milho fortificadas em laboratório (item 5.2.2) e utilizadas na elaboração das diferentes preparações sendo também os mesmos demonstrados na sessão resultado.

### **5.2.2 Protocolo de fortificação das matrizes farináceas em laboratório**

Farinhas de trigo e de milho foram fortificadas com ácido fólico em laboratório sendo posteriormente utilizadas para determinação do teor de ácido fólico bem como para estudo da retenção da referida vitamina em preparações submetidas a diferentes métodos de cocção. Para tanto, foi utilizado o último protocolo de homogeneização descrito no item anterior (item 5.2.1). Desta forma, 500g das farinhas de trigo e de milho a serem fortificadas foram, inicialmente, agitados em *cutter* durante 1 minuto e, em seguida, peneirados. O resíduo retido na peneira foi descartado. Este procedimento foi executado três vezes. Em seguida, o conteúdo total das farinhas (500g) bem como de ácido fólico (0,0050g) foi fracionado em cinco porções iguais; de 100g cada para as farinhas de trigo e de milho e 0,0010g cada para o ácido fólico. Cada fração de ácido fólico (0,0010 g) foi então adicionada a cada uma das porções (100 g) das farinhas de trigo e de milho. Em seguida, a mistura (farinha mais vitamina) foi homogeneizada manualmente durante 1 min com auxílio de uma espátula e, em seguida, homogeneizada em *cutter* também durante 1 minuto. Esse procedimento foi repetido para cada uma das cinco porções das farinhas de trigo e de milho que seriam fortificadas. Após cada uma das porções da farinha serem adicionadas de ácido fólico e homogeneizadas, manual e mecanicamente, o conteúdo total (500 g) foi misturado e homogeneizado em *cutter* durante 2 minutos. O tempo total empregado para a

homogeneização da vitamina à matriz farinácea foi de 12 minutos, como detalhado no item 5.2.1.

Após serem fortificadas, as farinhas foram acondicionadas em sacos plásticos, embalagens plásticas comerciais destinadas ao acondicionamento de legumes e vegetais, sendo posteriormente utilizadas para determinação do ácido fólico bem como na elaboração das diferentes preparações alimentícias empregadas para avaliação da retenção da vitamina. Nestas matrizes fortificadas, bem como nas preparações delas provenientes, a determinação e quantificação do ácido fólico foi realizada apenas por CLAE-DAD sendo estes os resultados utilizados para discussão da fortificação das farinhas e retenção do ácido fólico nas diferentes preparações. As demais técnicas empregadas para determinação do ácido fólico, UPLC-EM e espectroscopia por infravermelho (subitens 5.2.4.4 e 5.2.5, respectivamente), foram utilizadas apenas para fortalecer os resultados referentes à análise do composto nas matrizes farináceas comercialmente fortificadas.

### **5.2.3 Elaboração das preparações**

A elaboração das diferentes preparações foi realizada no Laboratório de Técnica Dietética e Análise Sensorial no Centro de Ciências da Saúde (CCS), Departamento de Nutrição (DN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As preparações foram desenvolvidas utilizando-se farinhas de trigo e de milho fortificadas em laboratório (item 5.2.2). Foram elaboradas três preparações com farinha de trigo (bolo de trigo, molho branco e pão de fôrma) e duas preparações com farinha de milho (bolo de milho e cuscuz). A estabilidade do ácido fólico foi verificada nas preparações contendo farinha de trigo e de milho submetidas ao calor seco e úmido por meio do emprego de três diferentes métodos de cocção, a saber: forno convencional (bolo de trigo, pão de fôrma e bolo de milho), imersão em água (molho branco) e vapor de água (cuscuz). As preparações foram elaboradas de acordo com receitas pré-testadas, seguindo as fichas técnicas de preparo descritas nos apêndices A, B, C, D e E.

### 5.2.4 Avaliação da retenção de ácido fólico

A estabilidade do ácido fólico foi calculada pela porcentagem de retenção dessa vitamina nas preparações desenvolvidas com as farinhas de trigo e de milho fortificadas em laboratório após as diferentes técnicas de cocção. A porcentagem foi obtida considerando-se as alterações de peso sofridas pela mistura crua após a cocção juntamente com a quantidade de ácido fólico nas amostras cruas e tratadas termicamente. Para tanto, foi utilizada a fórmula de retenção verdadeira ou real (%RR) (MURPHY, CRINER, GRAY, 1975), como descrito na Equação 1:

$$\% RR = \frac{AF_{cu, cs} \text{ (mg/g)} \times M_{coz, ass} \text{ (g)}}{AF_c \text{ (mg/g)} \times M_c \text{ (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

AF<sub>cu,cs</sub>: conteúdo de ácido fólico em mg.g<sup>-1</sup> da preparação cozida

M<sub>coz,ass</sub>: peso da preparação cozida

AF<sub>c</sub>: conteúdo de ácido fólico em mg.g<sup>-1</sup> da preparação crua

M<sub>c</sub>: peso da mistura crua

### 5.2.5 Análise de ácido fólico por cromatografia líquida

#### 5.2.5.1 Preparo da solução do padrão

O padrão de ácido fólico utilizado neste estudo foi mantido a -18°C. A solução estoque foi preparada a partir desse padrão na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, usando 1 mL de NaOH 2% (m/v) e completando o volume com acetato de amônio 8 mmol.L<sup>-1</sup> pH 6,7 (PAIVA et al., 2012). As soluções de diluição foram preparadas a partir da solução estoque em diferentes concentrações e mantidas à 4°C durante o desenvolvimento do estudo.

#### 5.2.5.2 Protocolo de extração de ácido fólico

O procedimento metodológico do estudo em questão se tratou de uma extração sólido-líquido desenvolvida e utilizada para matrizes vegetais por Paiva e colaboradores (PAIVA et al., 2012). Foram pesados aproximadamente 2 gramas de amostra e adicionados 20 mL da solução extratora de acetato de amônio na

concentração 50 mmol. L<sup>-1</sup>. Em seguida, o conjunto amostra mais solução extratora foi agitado em vórtex durante um minuto. Os extratos foram submetidos a um tratamento em banho termostatizado à 40°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em rotação de 4500 rpm (5000 g) a uma temperatura de 4°C durante 15 minutos com subsequente filtração em membranas de acetato de celulose de porosidade 0,45 µm. A quantidade equivalente a 1 mL de cada extrato foi novamente filtrada em membranas de fluoreto de polivinidileno de porosidade 0,22 µm para o interior de *vials* que foram, em seguida, levados ao cromatógrafo (PAIVA et al., 2012)

#### 5.2.5.3 Determinação de ácido fólico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos

A coluna cromatográfica utilizada foi C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm, com 5 µm de tamanho de partícula (Allcrom Phenomenex). As soluções da fase móvel foram; tampão fosfato de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 2,0 (misturas equimolares de ácido ortofosfórico e fosfato de potássio monobásico) e metanol. Ambas filtradas em filtros Millipore com 0,22 µm de diâmetro. O fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> com injeções de 20 µL por análise para padrões e extratos. A eluição ocorreu no modo isocrático, na proporção de 85:15 tampão fosfato de potássio:metanol (v/v) e com o tempo de corrida de 25 minutos. O comprimento de onda de varredura foi na faixa de 200-400 nm (PAIVA et al., 2012).

As análises para determinação do ácido fólico por CLAE-DAD foram desenvolvidas no Laboratório Multiusuário para Caracterização Química de Alimentos, Medicamentos e Suplementos Nutricionais (CQAMOS) no Centro de Ciências da Saúde (CCS), Departamento de Nutrição (DN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

##### 5.2.5.3.1 Identificação e quantificação

A identificação dos picos foi realizada por similaridade espectral (recurso do equipamento que permite a comparação dos espectros de padrões e amostras), e por comparação dos tempos de retenção de padrões e amostras.

A quantificação foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva de calibração com 10 diferentes concentrações no intervalo de 0,05

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ácido fólico. As soluções utilizadas para traçar a curva de calibração foram preparadas individualmente por diluição da solução estoque ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ácido fólico) em acetato de amônio (8 mmol) a partir do padrão individual.

O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração do analito que alcançou um sinal 10 vezes acima da linha de ruído (ICH, 1994), utilizando a Equação 2:

$$\text{LQ} = (\text{DP} \times 10) / \text{IC} \quad \text{Equação 2}$$

O limite de detecção (LD) foi definido como a menor concentração do analito que alcançou um sinal 3 vezes acima da linha de ruído (ICH, 1994), utilizando a Equação 3:

$$\text{LD} = (\text{DP} \times 3) / \text{IC} \quad \text{Equação 3}$$

DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo “y” de no mínimo três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva de calibração.

#### 5.2.5.3.2 Taxa de recuperação

Para determinar as taxas de recuperação, uma quantidade conhecida de padrão de ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}$ ) foi adicionada às matrizes farináceas.

As análises foram realizadas em quintuplicata, seguindo a metodologia para extração do ácido fólico (ver seção 5.2.4.2). As recuperações foram dadas pela Equação 4:

$$\text{TR} = (\text{CE} - \text{CAm}) / \text{Ca} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

TR é a taxa de recuperação; CE é a concentração encontrada; CAm é a concentração da amostra; CA é a concentração adicionada (ICH, 1994).

#### 5.2.5.4 Determinação de ácido fólico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia foi realizada em um cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters). Foi empregada uma coluna HSS T3 C18 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,8 $\mu$ m. As fases móveis utilizadas consistiram de solução aquosa de formiato de amônio 10 mM (eluente A) e solução metanólica (eluente B) acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, que foram bombeadas a uma vazão de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>. A eluição foi realizada em modo gradiente e a condição inicial (99% A/ 1% B) foi mantida por 2 minutos. A proporção de B foi aumentando linearmente para 55% em 3 minutos, para 99% em 3 minutos e 1 segundo, seguida da imediata diminuição para 1%, onde foi mantida por 1 minuto e 59 segundos. Foram injetados 10 $\mu$ L de amostra. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C e o autoinjeter a 4°C. O sistema UPLC esteve acoplado a um espectrômetro de massa (detector SQ2 Single 2 Quadrupolo) (Waters®). A voltagem do capilar foi de 2,5 KV, a voltagem do cone 30 V, a temperatura de dessolvatação foi de 600°C, com fluxo de gás da fonte de 1200 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo *Single Ion Recording* (SIR) buscando a massa 440.7461 Da, referente ao ácido fólico. A aquisição dos cromatogramas foi feita através do software MassLynx™ (Waters®). A análise quantitativa foi realizada através da ferramenta TargetLynx™, presente no MassLynx.

Todos os testes de determinação de ácido fólico por UPLC-EM foram desenvolvidos no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC).

#### 5.2.6 Análise de ácido fólico por Espectroscopia de Infravermelho com ATR

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ácido fólico foram obtidos em um espectrômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo Frontier UATR Universal Transformada de Fourier. As análises para detecção dos grupos funcionais foram realizadas na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> visto que nesta faixa aparecem bandas relacionadas às vibrações estruturais do material em estudo.

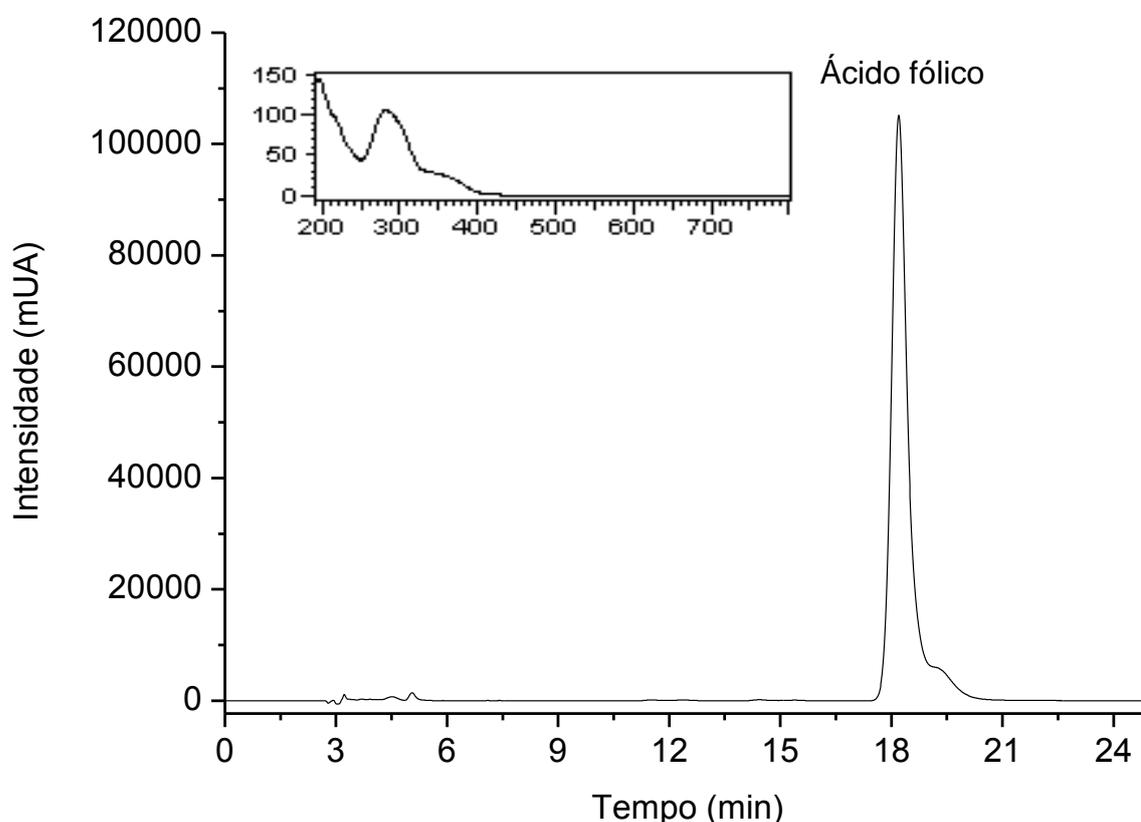
### 5.2.7 Análise estatística

Primeiramente foram realizados os testes de normalidade e homocedasticidade (teste de Bartlett). Na ausência de tais parâmetros, alguns dados foram então transformados em  $\log(x+1)$  para atender aos requisitos da análise de variância (ANOVA). Na presença de normalidade e homocedasticidade, foi utilizado o teste de variância (ANOVA) para observar as diferenças entre os tratamentos. Na ausência de normalidade e homocedasticidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Entre os tratamentos independentes, seco e aquoso, foi realizado o teste t. Para todas as análises foi utilizado o *software Statistica 7.0*.

## 6 RESULTADOS

Inicialmente, a determinação de ácido fólico nas farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas foi conduzida empregando-se a técnica por CLAE-DAD. Contudo, mediante os resultados obtidos, houve a necessidade de recorrer a outras técnicas a fim de fortalecer os resultados encontrados. Para tanto foram utilizadas as técnicas por UPLC-EM e a espectroscopia por infravermelho.

Na Figura 2 está representado o cromatograma e o espectro de absorção obtido por CLAE-DAD após a injeção do padrão de ácido fólico.

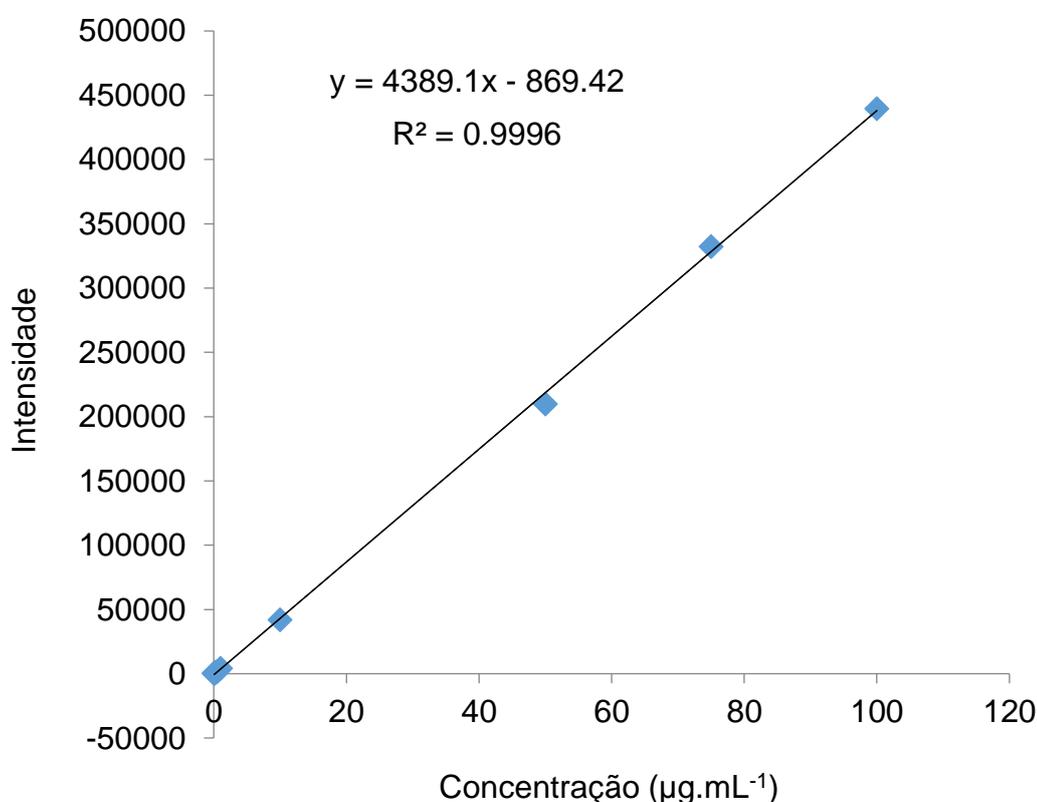


**Figura 2:** Cromatograma e espectro de absorção obtido por CLAE-DAD referente ao padrão de ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), usando coluna cromatográfica  $\text{C}_{18}$  (150 x 4,6mm 5 $\mu\text{m}$ ) (Allcrom Phenomenex) a 40 °C, eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm.  
Fonte: Autoria própria

Nele, o pico do ácido fólico apareceu isolado com tempo de retenção de aproximadamente 18,2 minutos. A pureza observada do pico, conforme disposto na

Tabela 1, foi verificada através de parâmetros fornecidos pelo *software* LC Solution® o qual confirmou a eficácia do sistema de separação cromatográfica.

A curva analítica traçada para o padrão de ácido fólico (Figura 3) demonstrou satisfatória linearidade numa faixa de 0,1-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com  $R^2$  de 0,9996, oferecendo condições adequadas para sua quantificação tanto nas amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas, fortificadas com ácido fólico em laboratório bem como nas preparações desenvolvidas a partir das matrizes fortificadas em laboratório. c.

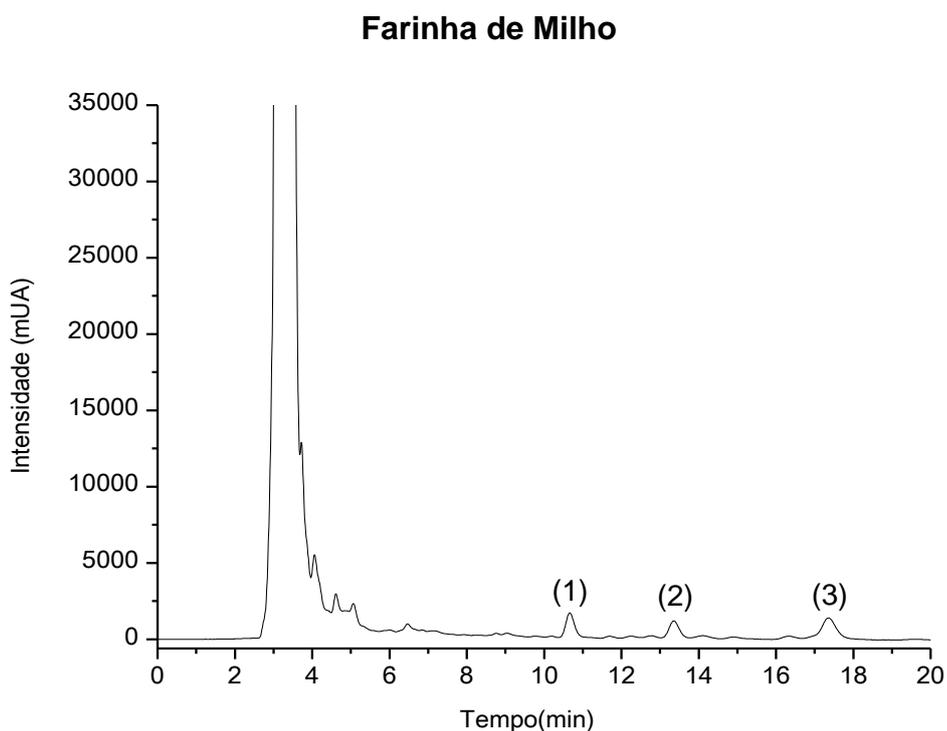
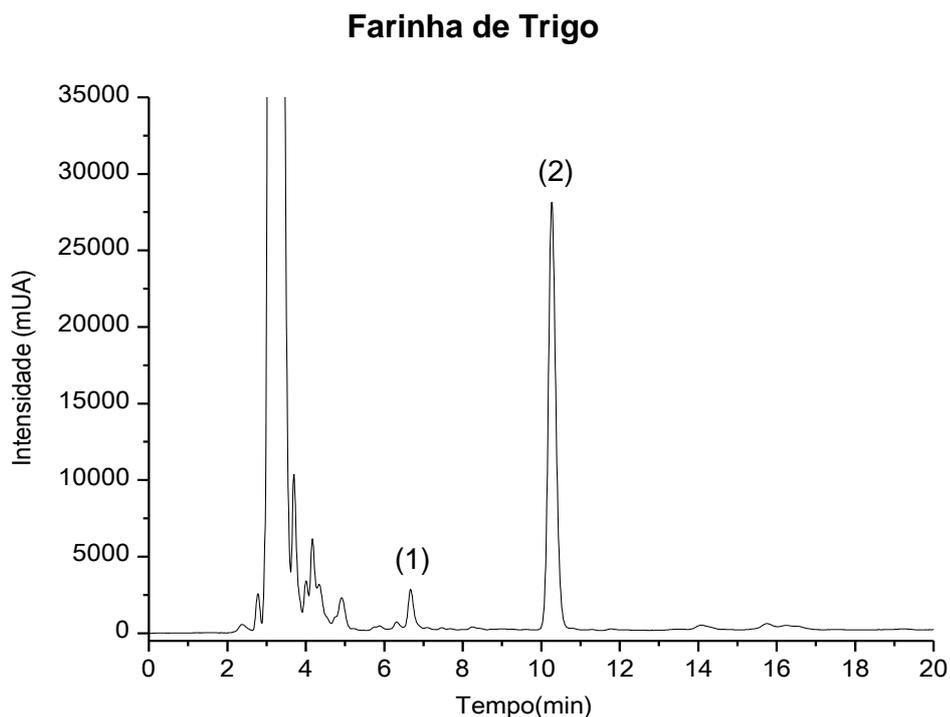


**Figura 3:** Curva de calibração referente ao ácido fólico obtida a partir da solução padrão de concentração igual a  $1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$ , usando coluna cromatográfica  $\text{C}_{18}$  (150 x 4,6mm 5 $\mu\text{m}$ ) (Allcrom Phenomenex) a 40 °C, eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de 0,5  $\text{mL.min}^{-1}$  e detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm.

Fonte: Autoria própria

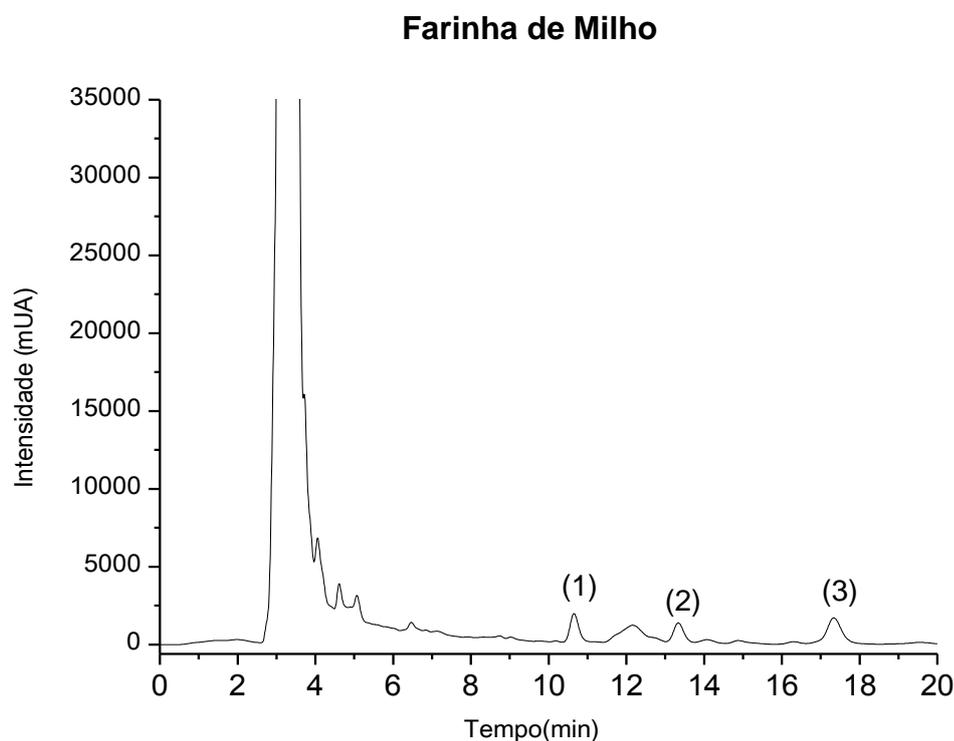
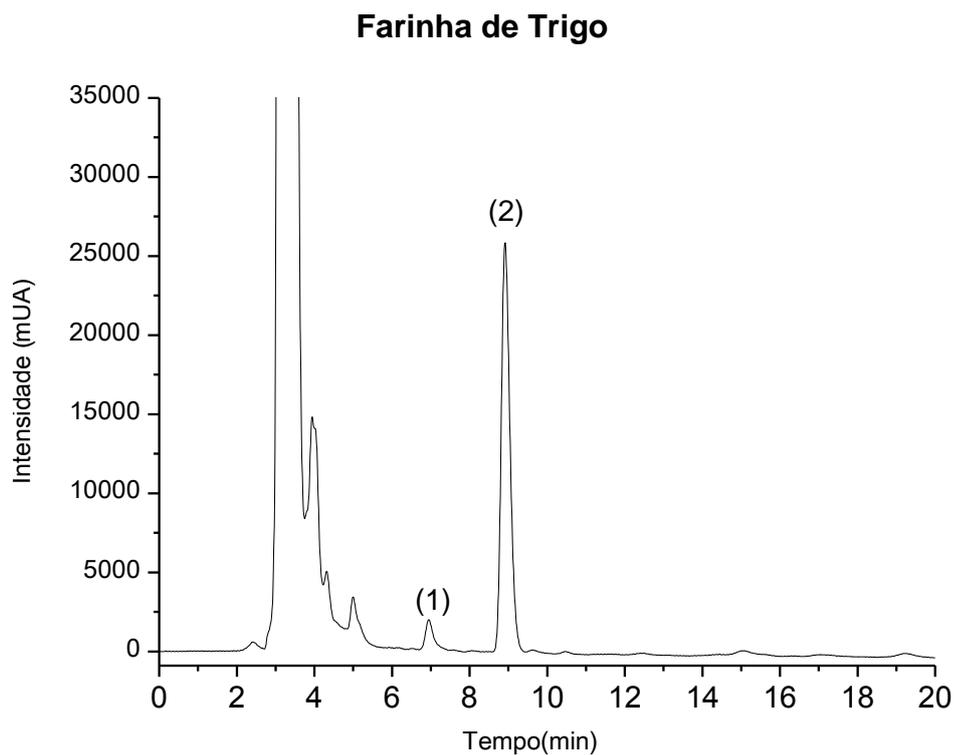
Na Figura 4 são exibidos os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de uma das amostras de farinha de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no primeiro lote. A análise dos cromatogramas obtidos permitiu constatar a ausência de

sinal no tempo de retenção do ácido fólico (18,2 minutos) para ambos tipos de farinhas. Este comportamento foi observado para todas as marcas de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no primeiro lote. Os picos (1) e (2) observados nos cromatogramas das amostras de farinhas de trigo, com tempo de retenção de aproximadamente 6,7 minutos e 10,2 minutos, respectivamente, e os picos (1), (2) e (3) observados nos cromatogramas das amostras de farinhas de milho, com tempo de retenção de 10,7 minutos, 13,4 minutos e 17,4 minutos, respectivamente, foram identificados como possíveis isômeros de folatos quando comparados a espectros de padrões registrados na biblioteca do software.



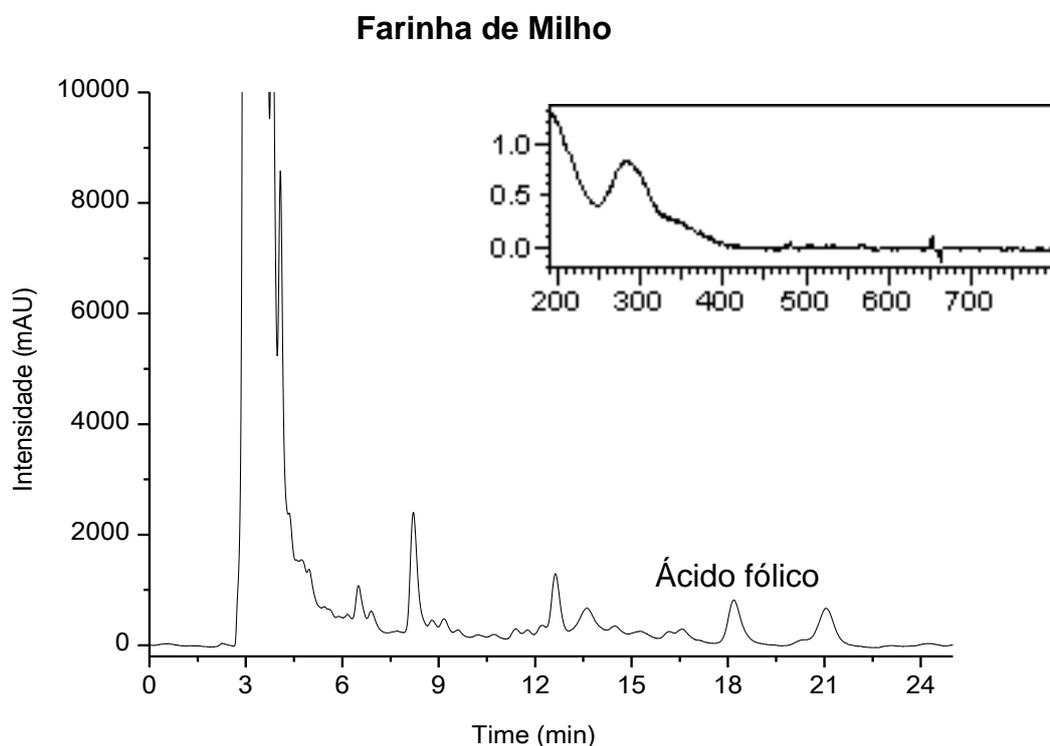
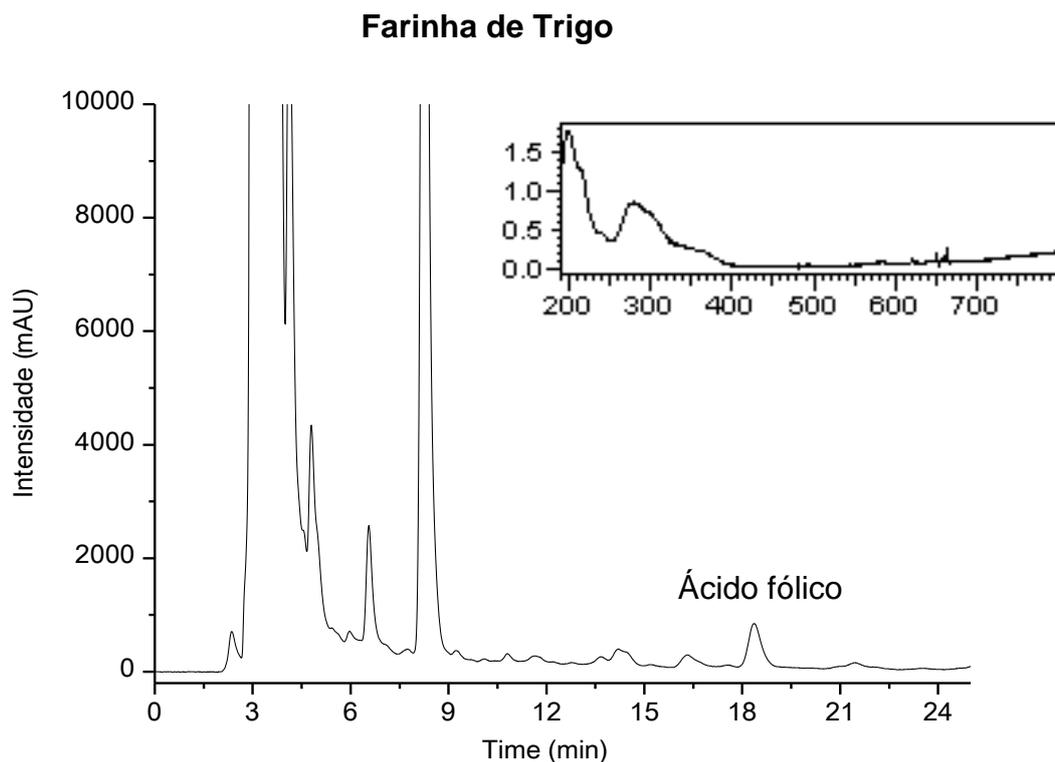
**Figura 4:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes a uma das amostras de farinha de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no primeiro lote com possíveis isoformas de folatos: (1) 5-formiltetrahydrofolato; (2) 5-metiltetrahydrofolato; (3) ácido pteróico; condições cromatográficas: coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (150 x 4,6mm 5µm) (Allcrom Phenomenex) a 40°C, eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm.  
Fonte: Autoria própria

Na Figura 5 são exibidos os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD de uma das amostras de farinha de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no segundo lote. De maneira semelhante aos cromatogramas obtidos para as amostras avaliadas no lote 1, os cromatogramas das amostras de farinhas do lote 2 não apresentaram sinal no tempo de retenção do ácido fólico e os picos (1) e (2) observado para as amostras de farinha de trigo, com tempo de retenção de 6,8 minutos e 8,33 minutos, respectivamente, e os picos (1), (2) e (3) observados nos cromatogramas das amostras de farinhas de milho, com tempo de retenção de 10,6 minutos, 13,2 minutos e 17,2 minutos, respectivamente, dizem respeito aos possíveis isômeros de folatos quando comparados a espectros de padrões registrados na biblioteca do software quando do desenvolvimento da metodologia analítica para determinação de folatos em matrizes vegetais utilizada no presente estudo para determinação de ácido fólico em matrizes farináceas.



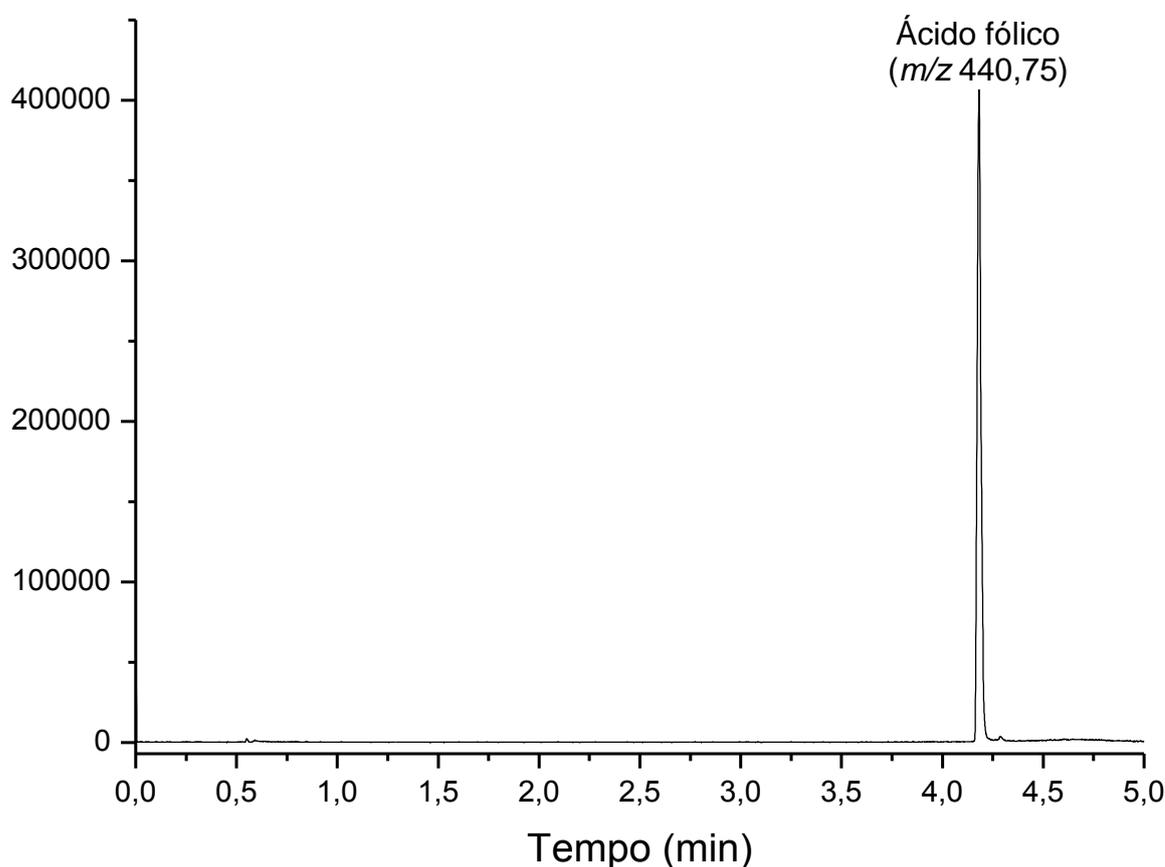
**Figura 5:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes a uma das amostras de farinha de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no segundo lote; condições cromatográficas: coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (150 x 4,6mm 5µm) (Allcrom Phenomenex) a 40 °C, eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm.  
Fonte: Autoria própria

Na Figura 6 são ilustrados os cromatogramas e os espectros de absorção obtidos por CLAE-DAD das amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico em laboratório na concentração de  $330\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  do produto. O tempo de retenção da vitamina foi de 18,4 minutos para farinha de trigo e 18,2 minutos para farinha de milho. Os outros picos cromatográficos, observados em tempos de retenção inferior comparado ao do ácido fólico, dizem respeito às possíveis isoformas de folatos as quais já foram reportadas também nas matrizes farináceas comercialmente fortificadas.



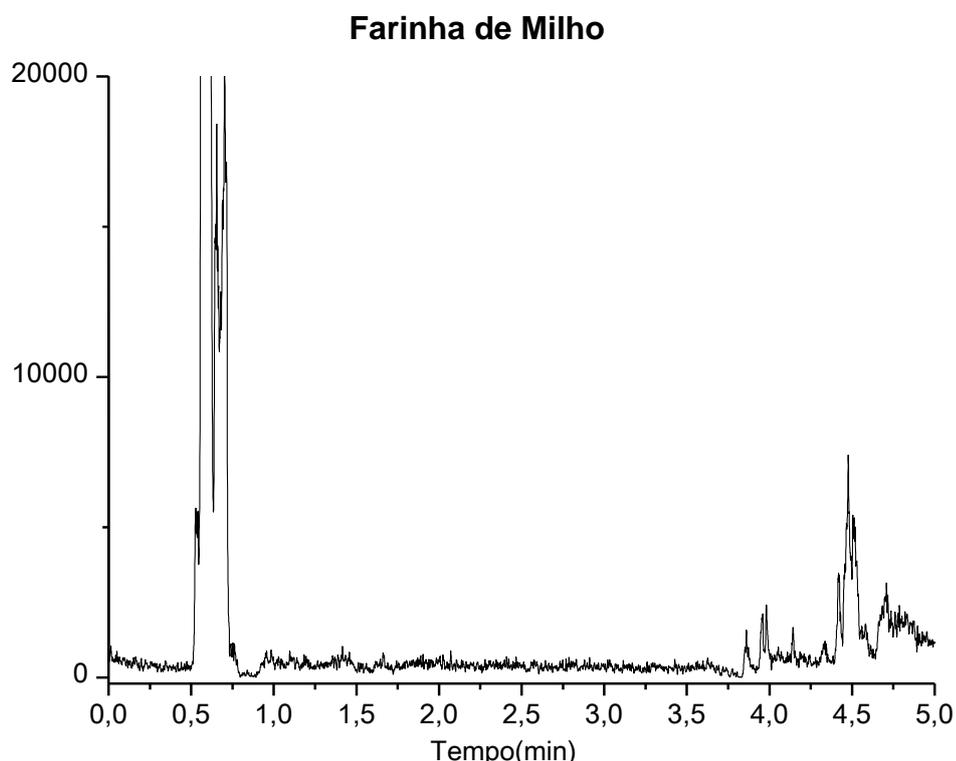
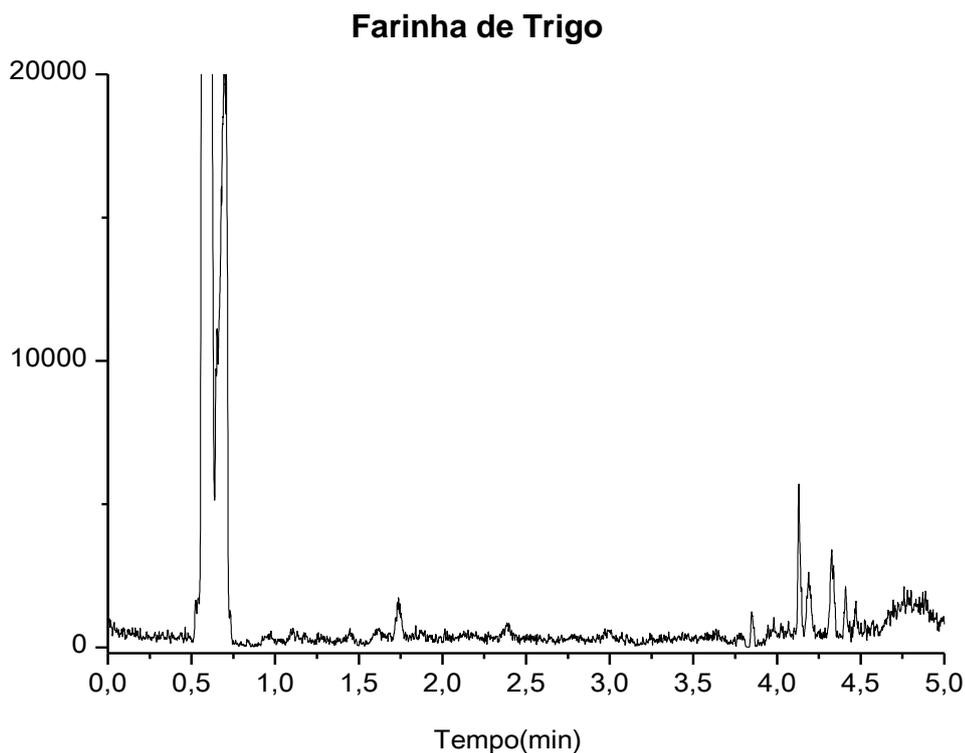
**Figura 6:** Cromatogramas e espectros de absorção obtidos por CLAE-DAD referentes as amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $330\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório; condições cromatográficas: coluna cromatográfica  $\text{C}_{18}$  (150 x 4,6mm, 5 $\mu\text{m}$ ) (Allcrom Phenomenex) a 40°C, eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio (pH 2,0) e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm  
Fonte: Autoria própria

A Figura 7 representa o perfil cromatográfico do padrão de ácido fólico determinado por UPLC-EM. A partir da injeção do padrão foi possível buscar a massa (440,75 Da) referente ao composto avaliado assim como determinar seu tempo de retenção, que foi de aproximadamente 4,2 min.



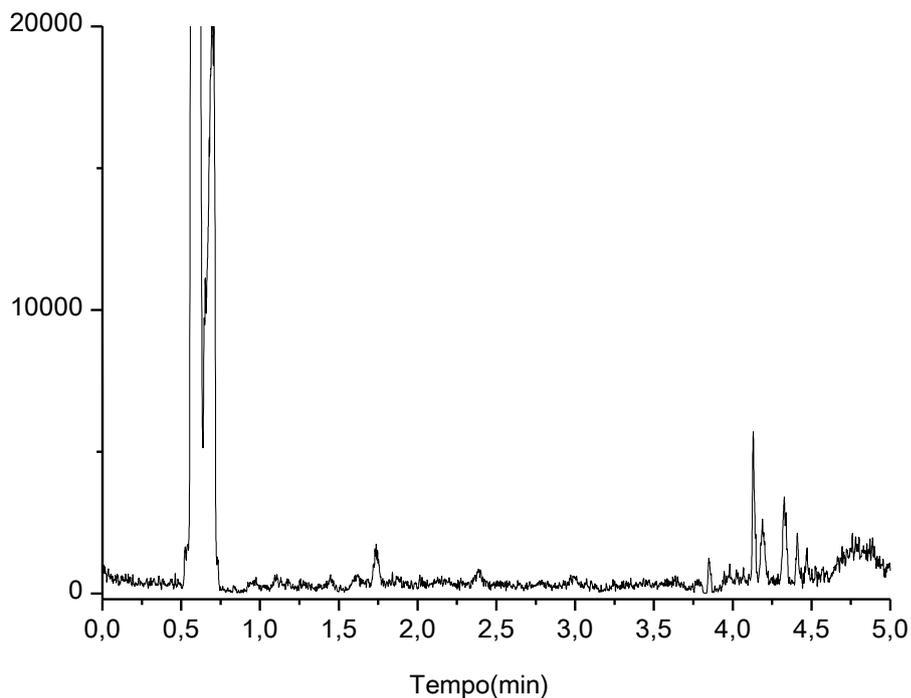
**Figura 7:** Cromatograma obtido por UPLC-EM referente ao padrão de ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), usando coluna analítica HSS T3 C18 ( $2,1 \times 100 \text{ mm } 1,8\mu\text{m}$ ) (Acquity UPLC) a  $40^\circ\text{C}$ , eluição gradiente utilizando solução aquosa de formiato de amônio 10 mM + 0,1% de ácido fórmico e solução metanólica + 0,1% de ácido fórmico como fase móvel a um fluxo de  $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detecção por espectrometria de massas.  
Fonte: Autoria própria

Os perfis cromatográficos obtidos por UPLC-EM de uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no primeiro lote e de uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no segundo lote, estão representados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Os cromatogramas demonstraram ausência de sinal no tempo de retenção do padrão de ácido fólico para todas as amostras avaliadas assim como não foi detectada a massa (440,75 Da) referente ao composto em análise.

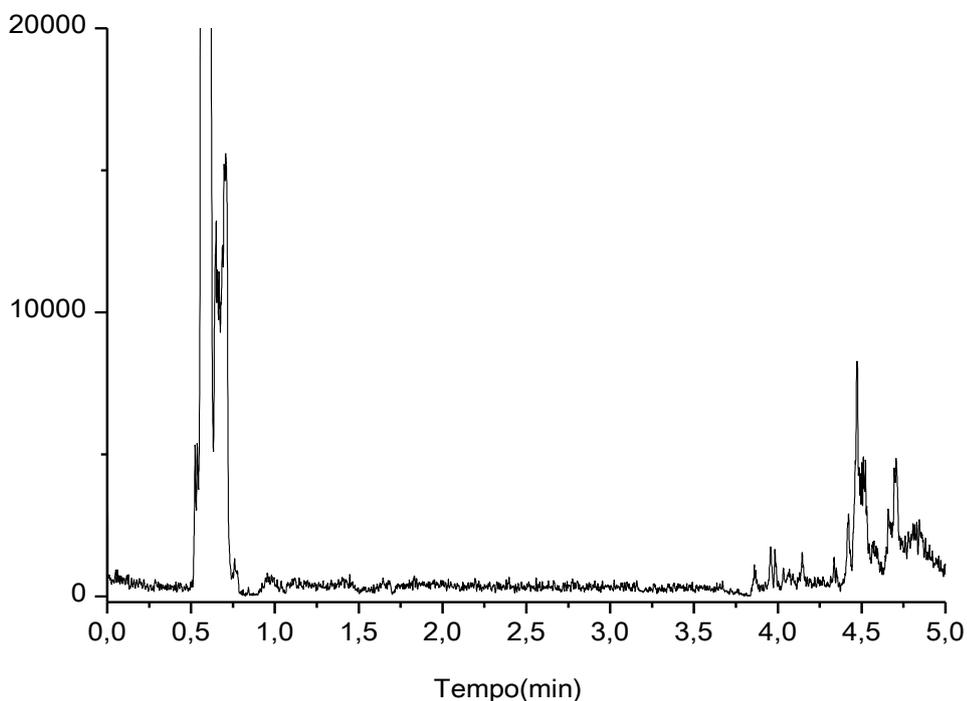


**Figura 8:** Cromatogramas obtidos por UPLC-EM referentes a uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no primeiro lote, usando coluna analítica HSS T3 C18 (2,1 x 100 mm 1,8 $\mu$ m) (Acquity UPLC) a 40 °C, eluição gradiente utilizando solução aquosa de formiato de amônio 10 mM + 0,1% de ácido fórmico e solução metanólica + 0,1% de ácido fórmico como fase móvel a um fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e detecção por espectrometria de massas.  
Fonte: Autoria própria

### Farinha de Trigo



### Farinha de Milho

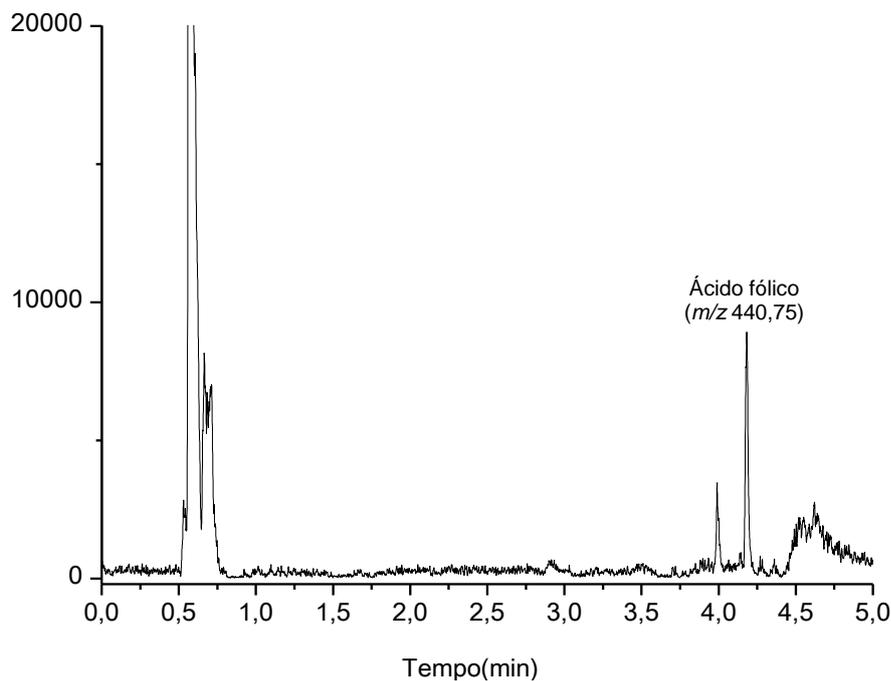


**Figura 9:** Cromatogramas obtidos por UPLC-EM referentes a uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas avaliadas no segundo lote, usando coluna analítica HSS T3 C18 (2,1 x 100 mm 1,8 $\mu$ m) (Acquity UPLC) a 40 °C, eluição gradiente utilizando solução aquosa de formiato de amônio 10 mM + 0,1% de ácido fórmico e solução metanólica + 0,1% de ácido fórmico como fase móvel a um fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> e detecção por espectrometria de massas.

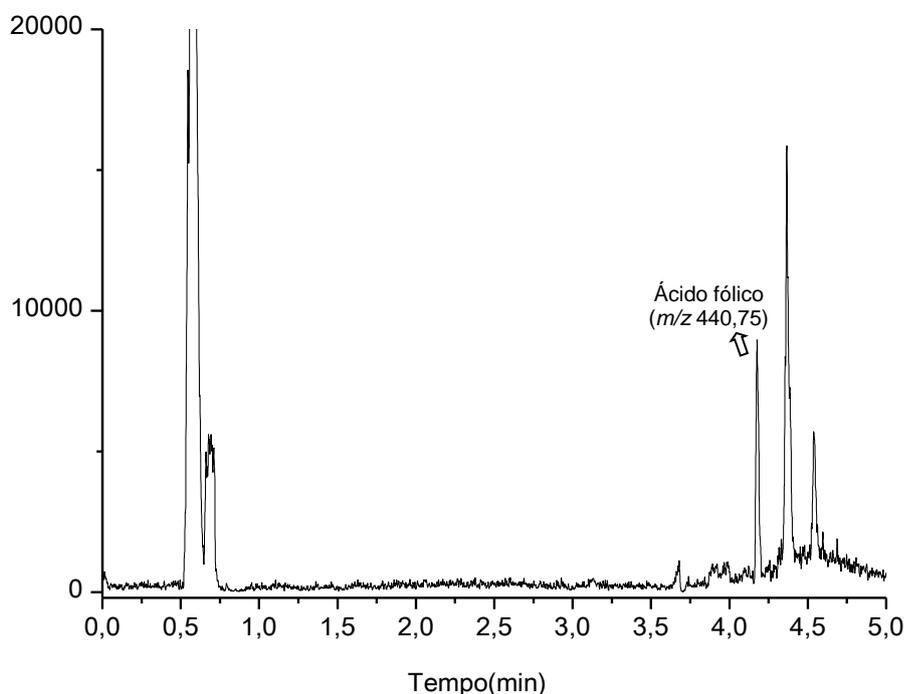
Fonte: Autoria própria

Na Figura 10 são exibidos os perfis cromatográficos obtidos por UPLC-EM das amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $330 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório. O composto apresentou tempo de retenção de aproximadamente 4,3 minutos para a farinha de trigo e 4,2 minutos para a farinha de milho.

### Farinha de Trigo

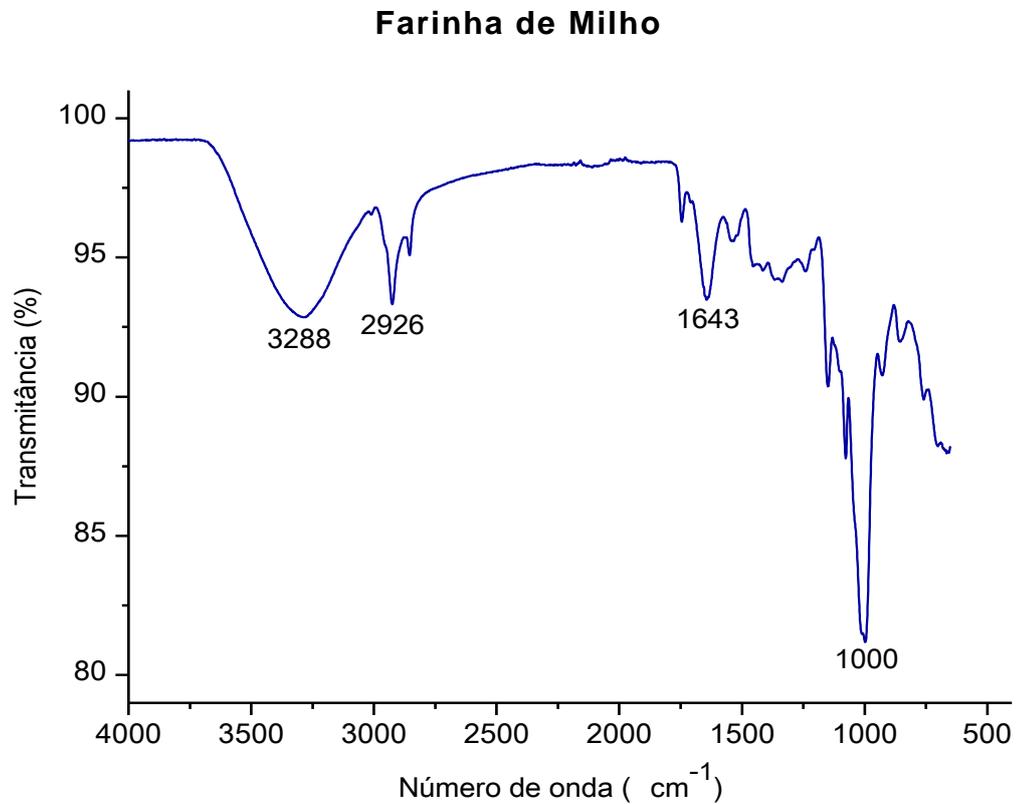
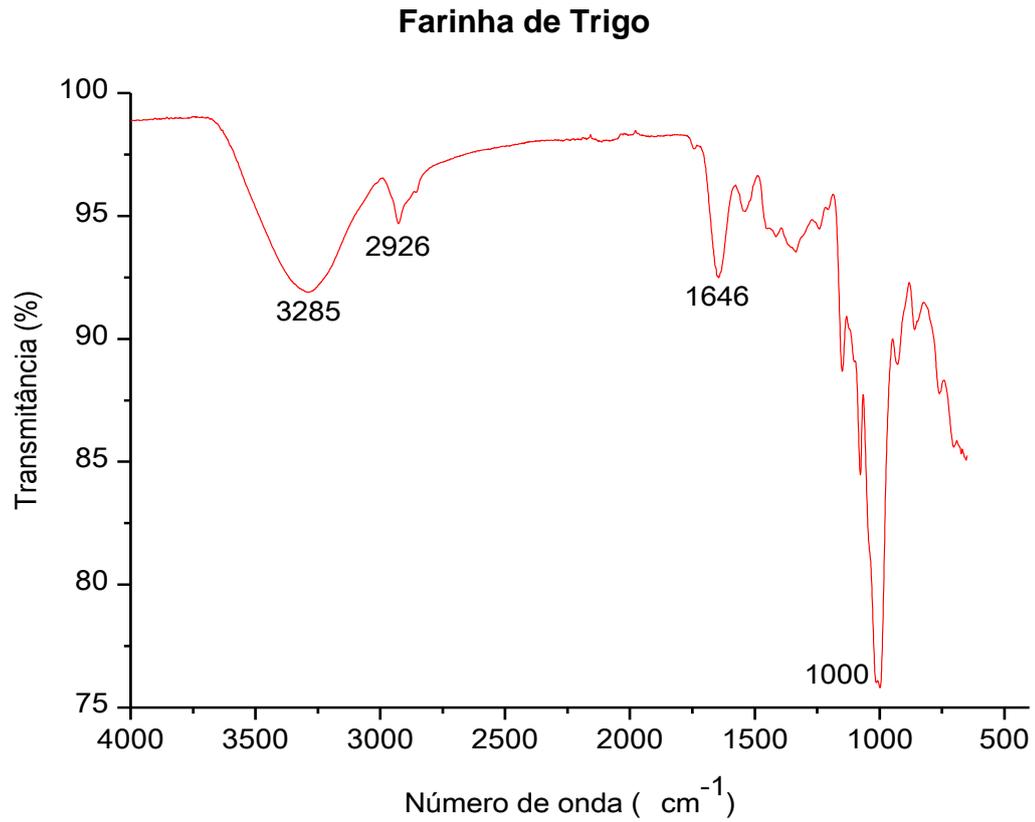


### Farinha de Milho



**Figura 10:** Cromatogramas obtidos por UPLC-EM referentes as amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $330 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório, usando coluna analítica HSS T3 C18 (2,1 x 100 mm,  $1,8\mu\text{m}$ ) (Acquity UPLC) a  $40^\circ\text{C}$ , eluição gradiente utilizando solução aquosa de formiato de amônio 10 mM + 0,1% de ácido fórmico e solução metanólica + 0,1% de ácido fórmico como fase móvel a um fluxo de  $0,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e detecção por espectrometria de massas.  
Fonte: Autoria própria

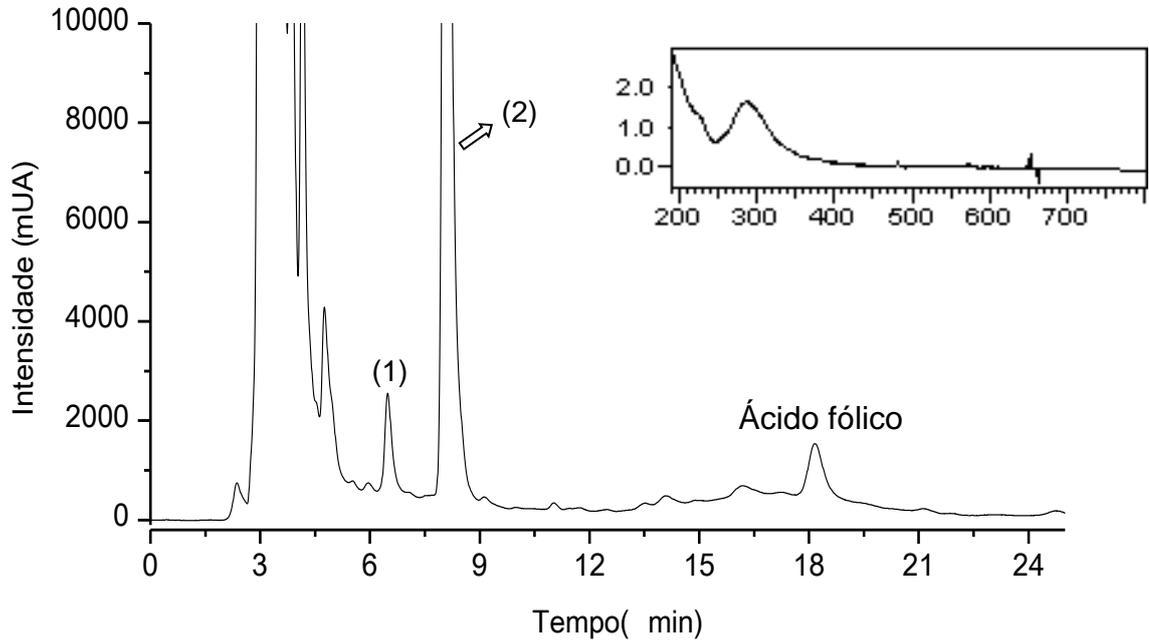
Na Figura 11 estão apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) extraído das farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas. Para as amostras de farinhas de trigo observou-se em  $3285\text{ cm}^{-1}$  uma banda larga e forte. Foi verificada também a presença de absorção em  $2926\text{ cm}^{-1}$ ,  $1646\text{ cm}^{-1}$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ . As amostras de farinhas de milho apresentaram valores de absorção semelhantes com uma banda larga e forte em  $3288\text{ cm}^{-1}$  e presença de absorção em  $2926\text{ cm}^{-1}$ ,  $1643\text{ cm}^{-1}$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ .



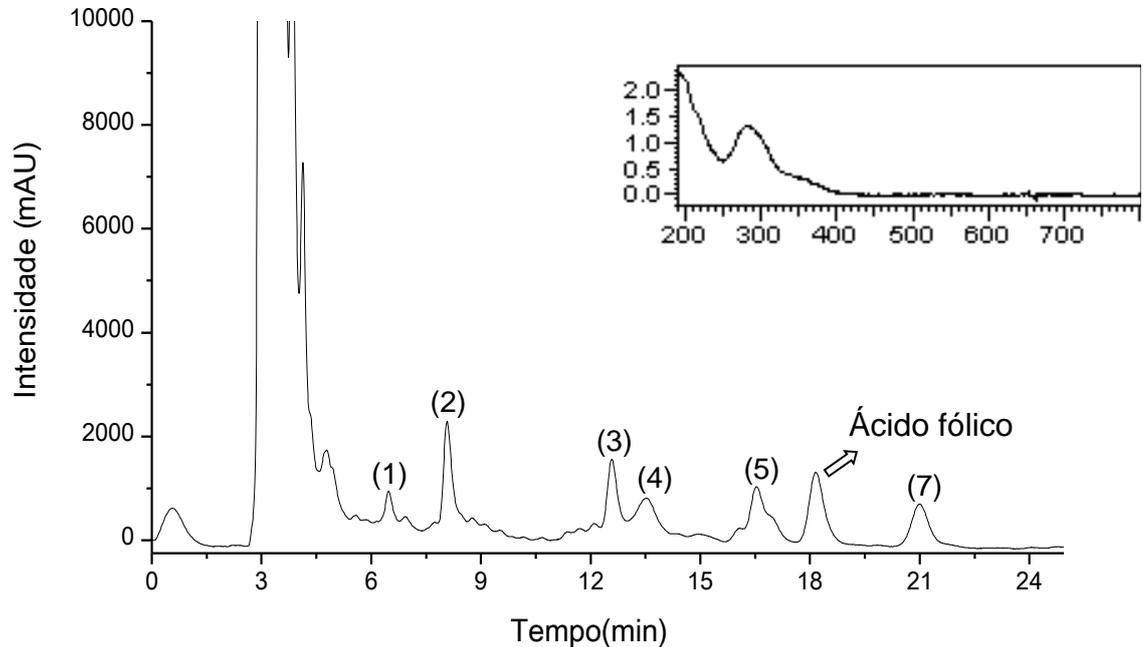
**Figura 11:** Espectros de absorção molecular na região do infravermelho (IV) do ácido fólico de uma das amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas  
Fonte: Autoria própria

Na Figura 12 estão ilustrados os cromatogramas e espectros de absorção obtidos por CLAE-DAD das amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em ambiente laboratorial. O pico referente ao composto analisado foi identificado com tempo de retenção de aproximadamente 18,2 minutos e 18,1 minutos para as amostras de farinhas de trigo e de milho, respectivamente. Além do pico referente ao ácido fólico, os picos (1) e (2), para as amostras de farinha de trigo e os picos (1), (2) e (3), para as amostras de farinha de milho, referentes as possíveis formas de folatos continuaram a ser observados. Ainda na avaliação do cromatograma obtido para a farinha de milho fortificada com ácido fólico em laboratório, foram observados também outros picos, (4), (5) e (7), além dos já mencionados nas análises anteriores. Estes também podem ser referentes a possíveis isômeros de folatos presentes na matriz farinácea.

### Farinha de Trigo



### Farinha de Milho



**Figura 12:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes as amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $1000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório; condições cromatográficas: coluna cromatográfica  $\text{C}_{18}$  ( $150 \times 4,6\text{mm } 5\mu\text{m}$ ) (Allcrom Phenomenex) a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio  $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 2,0 e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm.  
Fonte: Autoria própria

Na Tabela 1 são apresentados os teores de ácido fólico nas farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório as quais foram utilizadas para elaboração das diferentes preparações.

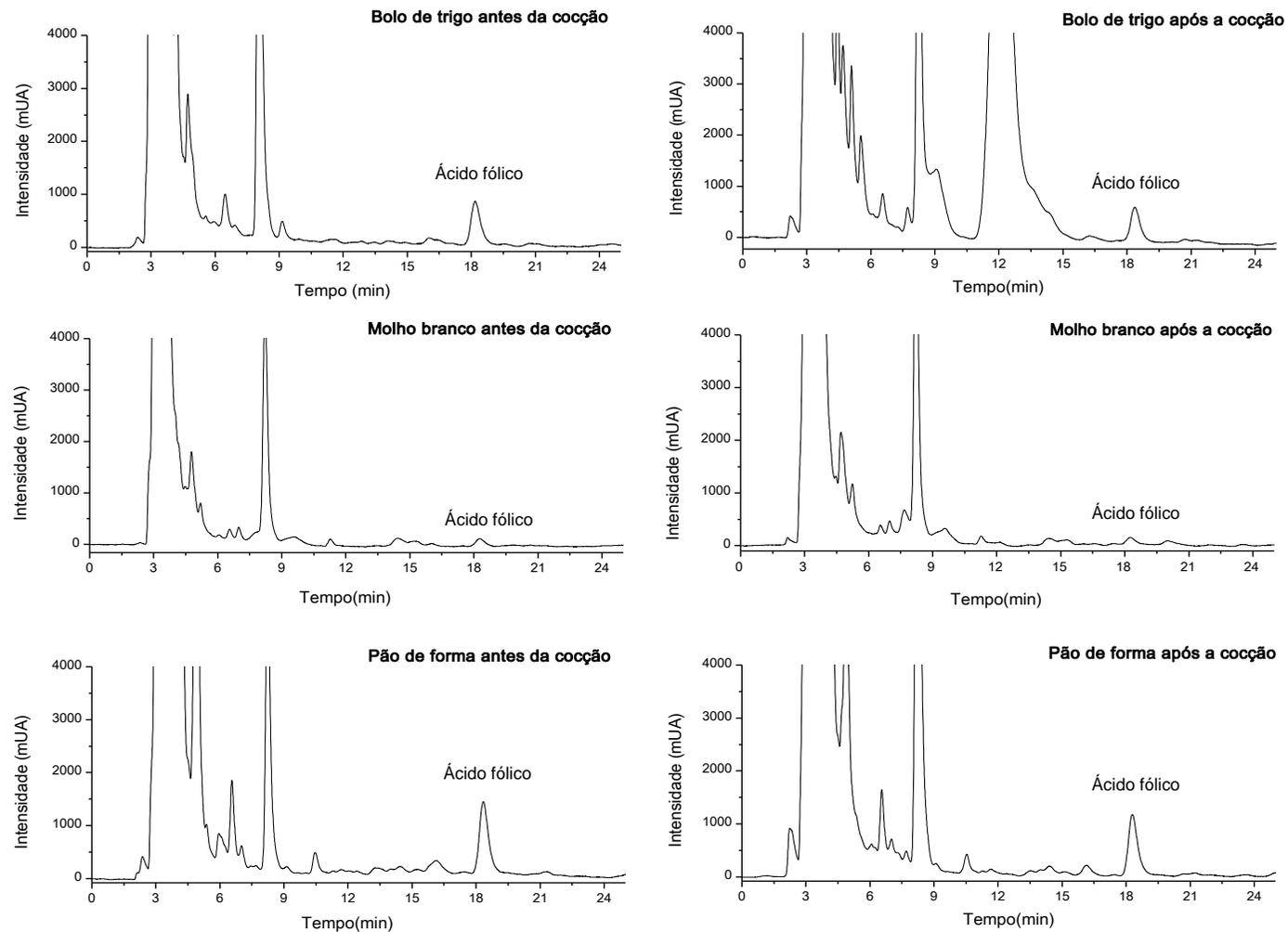
**Tabela 1:** Conteúdo de ácido fólico quantificado por CLAE-DAD em farinhas fortificadas ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório (n=5)

Amostras	$\mu\text{g}/100\text{g}$ de ácido fólico + DP	Retenção (%)	Taxa de Recuperação (%)	Similaridade com padrão de ácido fólico	Pureza do Pico
FT	$487 \pm 0,5$	48,7	51,3	1,00	1,00
FM	$474 \pm 0,2$	47,4	52,6	0,99	1,00

FT - farinha de trigo; FM - farinha de milho; DP - desvio padrão

As amostras de farinhas de trigo e de milho fortificadas com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}$  ácido fólico/  $100\text{g}$  de farinha) em ambiente laboratorial, apresentaram uma concentração média de  $487\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  para a farinha de trigo e  $474\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  para a farinha de milho. Observou-se, que os teores encontrados se mostraram bastante inferiores aos que foram adicionados às matrizes farináceas por meio do protocolo de fortificação ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ). A retenção do ácido fólico nas farinhas de trigo e de milho após serem fortificadas em laboratório foi de 48,7% e 47,4%, respectivamente. A taxa de recuperação calculada foi maior para a farinha de milho em comparação com a taxa de recuperação encontrada para farinha de trigo.

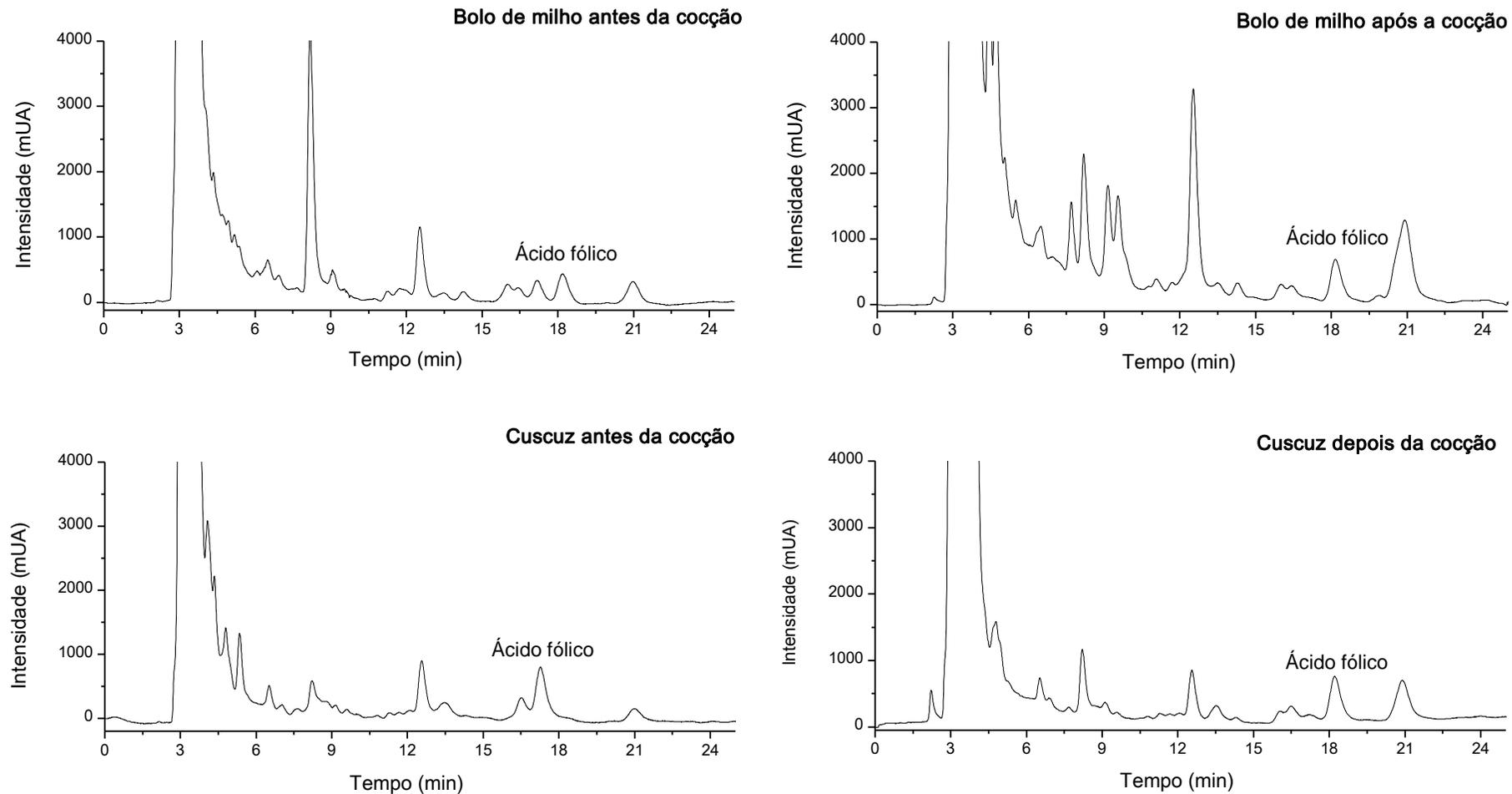
Na Figura 13 estão ilustrados os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das preparações elaboradas com farinha de trigo fortificada com ácido fólico em laboratório. Os cromatogramas são referentes às preparações de bolo de trigo, milho branco e pão de forma antes e após o processo de cocção, isto é, os cromatogramas obtidos das preparações cruas e das preparações cozidas. Nos cromatogramas o pico do ácido fólico aparece com tempo de retenção de aproximadamente 18,3 minutos. Outros picos com tempos de retenção anteriores à vitamina também foram observados e, assim como na farinha de trigo utilizada para sua elaboração, podem ser referentes à isômeros de folatos.



**Figura 13:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes as preparações elaboradas com farinha de trigo fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório, condições cromatográficas: coluna cromatográfica  $\text{C}_{18}$  (150 x 4,6mm 5 $\mu\text{m}$ ) (Allcrom Phenomenex) a 40 °C, eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio 0,1 mol.  $\text{L}^{-1}$  pH 2,0 e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de 0,5 mL. $\text{min}^{-1}$  e detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm

Fonte: Autoria própria

Na Figura 14 são representados os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD das preparações, antes e após o processo de cocção, formuladas com farinha de milho fortificada com ácido fólico ( $1.000 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório. Nas amostras de bolo de milho o tempo de retenção do ácido fólico foi de 18,3 minutos e a intensidade do sinal foi mais elevada na preparação crua comparada à preparação cozida, embora a diminuição não tenha se apresentado tão significativa. Nas amostras do cuscuz houve variação no tempo de retenção da vitamina, 17,2 para a preparação crua e 18,2 para a preparação cozida e a intensidade do pico, assim como para o bolo de milho, foi menor na preparação após a cocção.



**Figura 14:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD referentes as preparações elaboradas com farinha de milho fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório, condições cromatográficas: coluna cromatográfica  $\text{C}_{18}$  ( $150 \times 4,6\text{mm } 5\mu\text{m}$ ) (Allcrom Phenomenex) a  $40^\circ\text{C}$ , eluição isocrática utilizando tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 2,0 e metanol (85:15) como fase móvel a um fluxo de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detecção UV a 200-400nm com comprimento de onda de 280nm.

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 2 estão dispostos os teores de ácido fólico encontrados nas preparações cruas elaboradas com farinha de trigo e de milho fortificadas em laboratório.

**Tabela 2:** Conteúdo de ácido fólico determinado por CLAE-DAD nas preparações cruas (n = 5)

<b>Matriz farinácea</b>	<b>Preparações</b>	<b>Teor de ácido fólico na preparação crua (<math>\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}</math>) <math>\pm</math> DP</b>
Farinha de Trigo	Bolo de Trigo	335 $\pm$ 0,3
	Molho Branco	218 $\pm$ 0,2
	Pão de Forma	431 $\pm$ 0,4
Farinha de Milho	Bolo de Milho	272 $\pm$ 0,4
	Cuscuz	310 $\pm$ 0,3

DP - Desvio padrão

Nas preparações elaboradas com farinha de trigo o teor de ácido fólico encontrado na mistura crua variou de 218  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a 431  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , sendo o menor conteúdo encontrado para o molho branco e o maior teor encontrado para o pão de forma. Nas preparações elaboradas com farinha de milho o conteúdo de ácido fólico variou de 272  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  no bolo de milho a 310  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  no cuscuz. Em todas as preparações cruas o teor de ácido fólico encontrado variou de maneira significativa comparado ao teor presente nas matrizes farináceas (trigo e milho) utilizadas para sua formulação. Além disso, o conteúdo de ácido fólico também variou entre as diferentes preparações mesmo todas tendo sido avaliadas ainda no estado cru.

Os resultados para a retenção verdadeira do ácido fólico nas preparações de bolo de trigo, molho branco, pão de forma, bolo de milho e cuscuz, elaboradas com farinha de trigo e de milho fortificadas em laboratório, após serem cozidas são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

**Tabela 3:** Retenção real do ácido fólico nas preparações elaboradas com farinha de trigo fortificada com ácido fólico ( $1.000 \mu\text{g}.100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório (n=5)

Amostras	Condições da preparação		RR (%) $\pm$ DP
	Tempo (min)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	
Bolo de Trigo	40	180	$80 \pm 17$
Pão de Forma	40	180	$87 \pm 8$
Molho Branco	5	60-100	$57 \pm 3$

RR - retenção real; DP - desvio padrão

**Tabela 4:** Retenção real do ácido fólico nas preparações elaboradas com farinha de milho fortificada com ácido fólico ( $1.000 \mu\text{g}.100\text{g}^{-1}$ ) em laboratório (n=5)

Amostras	Condições da preparação		RR (%) $\pm$ DP
	Tempo (min)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	
Bolo de Milho	40	180	$99 \pm 9$
Cuscuz	5	100-40	$97 \pm 11$

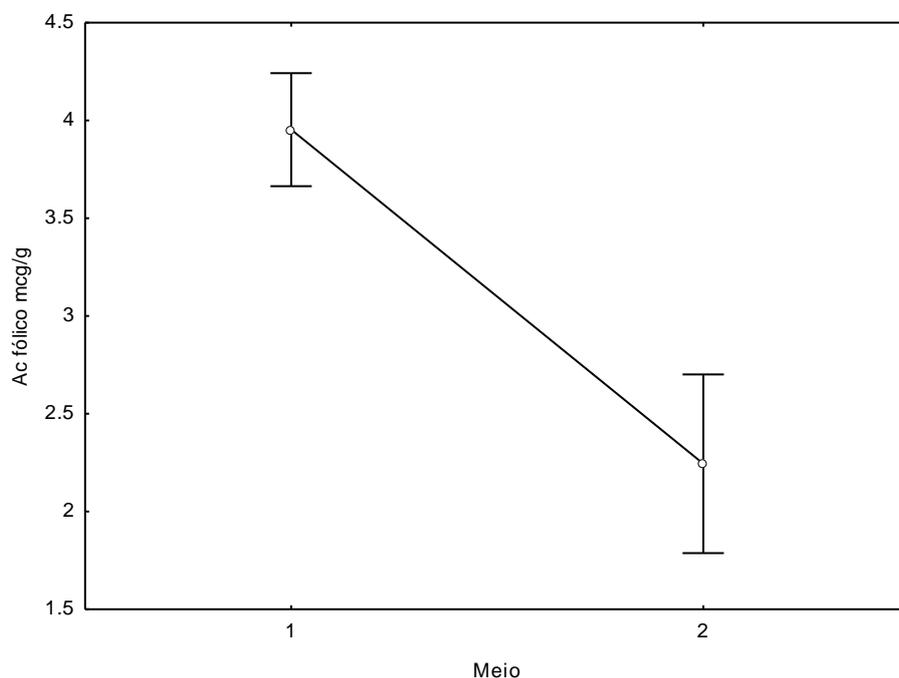
RR - retenção real; DP - desvio padrão

Nas preparações formuladas com farinha de trigo fortificada (Tabela 3) a maior retenção no conteúdo de ácido fólico foi observada para o pão de forma (87%) seguida do bolo de trigo (80%) e molho branco (57%).

Nas preparações elaboradas com farinha de milho fortificada com ácido fólico em laboratório (Tabela 4) a retenção da vitamina se apresentou bastante elevada sendo o maior valor observado para o bolo de milho (99%) seguido do cuscuz (97%). As perdas encontradas foram bastante pequenas sendo os percentuais de 3% e 1% para bolo de milho e cuscuz, respectivamente.

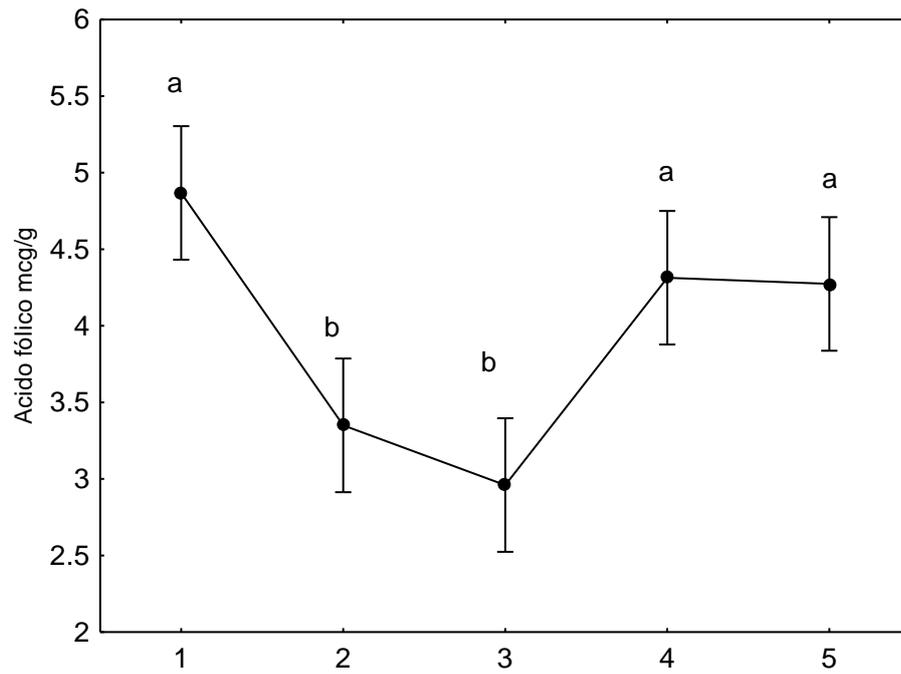
Na Figura 15 está representado o tratamento estatístico, Teste t (Kruskal-Wallis) para amostras independentes ( $t=6,42$ ; g.l.=33;  $p<0,00001$ ), aplicado para avaliação do conteúdo de ácido fólico entre as preparações levando-se em consideração o meio de cocção empregado; seco (1) e úmido (2). A comparação entre os dois meios permitiu observar que houve diferença estatística significativa no conteúdo de ácido fólico nas preparações em virtude do meio de cocção. As preparações cozidas em meio seco (1) apresentaram maior concentração de ácido

fólico enquanto a preparação (molho branco) coccionada em meio úmido (2) teve o menor conteúdo da vitamina.



**Figura 15:** Comparação entre as preparações coccionadas em meio seco e úmido  
1 - cocção por calor seco; 2 - cocção por calor úmido.

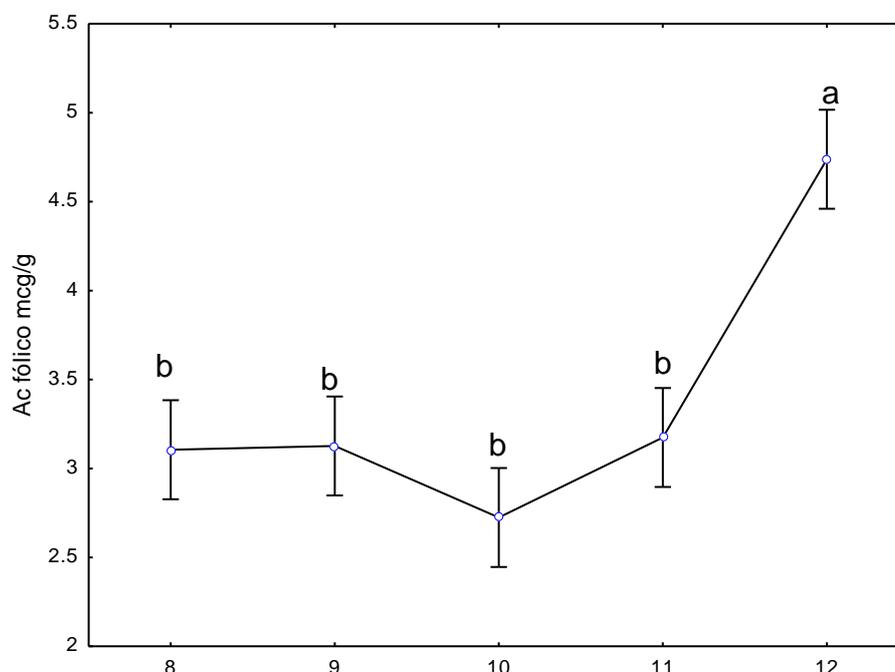
A Figura 16 diz respeito ao tratamento estatístico análise de variância (ANOVA), média (+- 95% do intervalo de confiança) teste a posteriori de Dunnet com valor  $p < 0.0001$ , aplicada à farinha de trigo fortificada e suas preparações. As amostras 4 e 5, pão de forma antes e após a cocção, respectivamente, não apresentaram diferenças significativas no conteúdo de ácido fólico quando comparadas a amostra crua e após o processo de cocção e quando comparadas ao controle (1 - farinha de trigo fortificada). As amostras 2 e 3, bolo de trigo antes e após a cocção, respectivamente, não apresentaram diferença no conteúdo de ácido fólico entre a mistura crua e após o processo de cozimento, contudo, em relação ao controle (1) e as amostras 4 e 5 o conteúdo da vitamina presente foi significativamente diferente.



**Figura 16:** Comparação entre os tratamentos de farinha de trigo fortificada com ácido fólico. Letras diferentes indicam diferenças entre as médias ( $p < 0.0001$ ). 1 - farinha de trigo fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ); 2 - bolo de trigo antes da cocção; 3 - bolo de trigo após a cocção; 4 - pão de forma antes da cocção; 5 - pão de forma após a cocção

Fonte: Autoria própria

A Figura 17 ilustra o resultado do tratamento estatístico análise de variância (ANOVA), média (+ 95% do intervalo de confiança) teste a posteriori de Dunnet com valor  $p < 0.000$ , aplicado para avaliação no teor de ácido fólico entre a farinha de milho fortificada e suas preparações.



**Figura 17:** Comparação entre os tratamentos de farinha de milho fortificada com ácido fólico. Letras diferentes indicam diferenças entre as médias ( $p < 0.0001$ ). 8 - cuscuz antes da cocção; 9 cuscuz após a cocção; 10 - bolo de milho antes da cocção; 11 - bolo de milho após a cocção; 12 - farinha de milho fortificada com ácido fólico ( $1.000\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )

Com relação ao controle, amostra 12, todas as outras amostras, 8, 9, 10 e 11, apresentaram diferença significativa no conteúdo de ácido fólico. As amostras 8 e 9, cuscuz antes e após a cocção, e 10 e 11, bolo de milho antes e após a cocção, não apresentaram diferença significativa entre o teor de ácido fólico: quando comparada a mistura crua e após a cocção com relação à mesma preparação nem quando comparadas as amostras entre si.

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstrando ausência do ácido fólico nas amostras de farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas, indicam a provável existência de problemas no processo de fortificação de tais matrizes alimentares. A presença de picos cromatográficos (Figuras 4, 5, 6 e 13) obtidos por CLAE-DAD em tempos de retenção inferiores aos observados para o padrão de ácido fólico provavelmente dizem respeito a isômeros de folatos provenientes da matriz avaliada uma vez que se trata de um produto de origem vegetal que contém variadas formas naturais do composto analisado. Além disso, a técnica cromatográfica empregada é capaz de identificar diferentes isômeros naturais do composto em estudo tendo em vista que tal metodologia analítica foi desenvolvida e utilizada em matrizes vegetais o que resultou na construção de banco de dados.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma técnica que combina o poder de separação da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) de materiais de grande peso molecular, com a capacidade da espectrometria de massas (EM) para detectar seletivamente e confirmar a identidade molecular (LANÇAS, 2009). No presente estudo, os resultados obtidos por UPLC-EM apresentaram semelhança aos obtidos pelo emprego da outra técnica cromatográfica ao demonstrar ausência do ácido fólico nas mesmas matrizes alimentares avaliadas, o que foi observado pela não detecção de sinal no tempo de retenção (4,2 min) reportado por esta técnica para o analito investigado nem a massa molecular referente ao composto.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica que se baseia em interações entre as moléculas ou átomos e a radiação eletromagnética, provocando vibrações de acordo com a amplitude das ligações covalentes existentes na molécula (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2013). No presente estudo esta foi a terceira técnica empregada para determinação do ácido fólico nas diferentes farinhas comerciais fortificadas. Contudo, os valores de absorção observados para as diferentes bandas não correspondiam a este composto. As bandas observadas a  $3285\text{ cm}^{-1}$  e  $1646\text{ cm}^{-1}$  para a farinha de trigo e  $3288\text{ cm}^{-1}$  e  $1643\text{ cm}^{-1}$  para as farinhas de milho são referentes a deformações moleculares existentes nas moléculas de amido, atribuídas ao estiramento e a deformação angular de ligações -OH. Próximo a  $2926$

$\text{cm}^{-1}$  foi observada a banda atribuída à deformação axial de ligações C-H. As bandas na região 1200 a  $1000 \text{ cm}^{-1}$  são consideradas bandas características do amido e são atribuídas a vibrações de deformação axial de C-O em álcoois e a vibrações de deformação axial do sistema O-C-O (LIMA et al., 2012).

De acordo com trabalho anteriormente publicado (VORA et al, 2004), o espectro do ácido fólico apresenta bandas de absorção nas regiões de  $3555 \text{ cm}^{-1}$  e de  $3416 \text{ cm}^{-1}$  provenientes das deformações axiais do grupo O-H do ácido glutâmico ligado ao grupo N-H do anel pterina. O pico de vibração intensa em  $1696 \text{ cm}^{-1}$  está relacionado com a vibração angular C=O da carbonila, enquanto a banda em  $1607 \text{ cm}^{-1}$  refere-se à vibração N-H. A banda em  $1485 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída a banda de absorção característica do anel fenil e a pterina. Os dois espectros (Figura 10) apresentaram comportamento espectral diferentes do supracitados, confirmando que o material avaliado, farinhas de trigo e milho comerciais, não foi detectado o ácido fólico.

Como já mencionado, os dados obtidos demonstrando ausência do ácido fólico nas matrizes farináceas comerciais avaliadas indicam possíveis falhas no processo de fortificação executado pelas indústrias. Neste ambiente, o ácido fólico é adicionado às farinhas em forma de mix de micronutrientes que é primeiramente misturado em uma batedeira com uma pequena quantidade de farinha (21,5 de mix para 500 g de farinha) sendo, em seguida, misturados na misturadeira por cerca de 2 horas. Esse procedimento, quando realizado em laboratório, funciona de maneira eficiente, contudo, industrialmente acaba não sendo efetivo, além de inviável especialmente quando se trata de 10,2 milhões de toneladas de farinha de trigo (CONAB, 2011) e 1,9 milhões de toneladas de milho (ABIMILHO, 2011; SUZART, 2016).

De acordo com Boen et al. (2008), existe uma elevada variação no conteúdo de ácido fólico nas farinhas de trigo e de milho comercial. Este comportamento pode ocorrer, provavelmente, devido a problemas durante a etapa de homogeneização, que pode estar relacionada com a tendência da vitamina de se aglomerar, dificultando sua dispersão (ANDERSON et al., 2010; BOEN et al., 2008). Outros motivos para a dificuldade de homogeneização poderiam estar relacionados à diferença de massa específica entre as farinhas de trigo e de milho e o ácido fólico e a baixa quantidade de adição da vitamina (NEVEZ, 2013).

No Brasil, o problema com a quantidade de ácido fólico em lotes analisados de farinhas de trigo, fubá e flocos de milho de várias indústrias tem sido relatado. Os

dados afirmam que alguns lotes apresentam uma quantidade acima da necessária ( $150 \mu\text{g}$  ácido fólico. $100\text{g}^{-1}$  de farinha) outros apenas com traços ou ausência desse micronutriente o que leva à conclusão que a homogeneização de micronutrientes adicionados às matrizes vem sendo ineficientes (BRASIL, 2011). Informações do Ministério da Saúde constataram ainda que o ácido fólico não está sendo efetivo para a população devido à falta de homogeneização no processo de mistura das farinhas e perdas por falta de estabilidade química (SUZART, 2016).

A variação significativa no teor de ácido fólico adicionado nas farinhas de trigo e de milho em ambiente laboratorial (Tabela 2) também pode estar relacionada ao processo de homogeneização executado em bancada o qual pode ter contribuído para degradação do ácido fólico. No presente estudo, o tempo (12 minutos) empregado para misturar a vitamina à farinha e o equipamento utilizado (*cutter*) para homogeneização podem ter contribuído para a baixa retenção na quantidade da vitamina adicionada uma vez que os teores encontrados após o processo de fortificação, quando comparados ao valor adicionado, foram muito inferiores para ambos tipos de farinhas. Além disso, durante o processo de homogeneização, quantidade razoável da farinha que estava sendo fortificada foi perdida através da sua saída por alguns espaços existentes entre a borda do equipamento e a sua tampa,

Os estudos avaliando o conteúdo de ácido fólico nas farinhas de trigo e de milho brasileiras demonstram que o teor da vitamina varia consideravelmente de uma região para outra. Soeiro et al. (2010), ao investigar a qualidade de farinhas enriquecidas comercializadas no estado de São Paulo, constatou que a concentração de ácido fólico nas farinhas de trigo se mostrou próxima ao valor determinado pela legislação Brasileira ( $150 \mu\text{g}.100\text{g}^{-1}$ ), contudo, as farinhas de milho apresentaram teor muito acima (superior ao dobro) do valor estabelecido. Em estudo desenvolvido por Alaburda et al. (2008) os resultados reportados para as 33 amostras de farinhas de trigo fortificadas analisadas demonstraram que 17 (51%) tinham concentração abaixo do nível estabelecido pela legislação brasileira ( $1,50 \mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ ). Resultados semelhantes foram reportados em estudo recente desenvolvido por Rathke, 2016 avaliando o conteúdo de ácido fólico em farinhas de trigo comerciais vendidas na região de São Leopoldo - Rio Grande do Sul. O conteúdo da vitamina presente variou de 81 a  $269 \mu\text{g}.100\text{g}^{-1}$  do produto entre as cinco diferentes marcas avaliadas. Destas, duas (40%) não estavam de acordo com a legislação brasileira. Para as farinhas de trigo e de

milho fortificadas e comercializadas na região Nordeste, como mostrado no presente estudo, o ácido fólico esteve ausente em todas as marcas avaliadas não sendo encontrado nem mesmo em quantidades traços.

A qualidade de farinhas fortificadas e comercializadas em outros países tem sido avaliada e, desta forma, alguns dados sobre o teor de ácido fólico têm sido publicados. Chandra-hioe, Bucknall, Arcot (2013) verificaram que os níveis de ácido fólico nas farinhas comercialmente fortificadas estavam abaixo das concentrações médias abaixo do mínimo ( $200\mu\text{g}\text{ ácido fólico}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de farinha) exigido pela legislação australiana. Para as farinhas comercializadas nos supermercados da Polônia o valor médio reportado para a concentração de ácido fólico foi de  $237\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (GUJSKA, MAJEWSKA, 2005). Rader, Weaver e Angyal (2000), ao analisarem farinhas comercializadas nos Estados Unidos, cuja regulamentação para enriquecimento estipula  $140\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , encontraram teores de ácido fólico variando de  $33\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a  $229\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Arcot, Shrestha e Gusanov (2002) relataram valores oscilando entre  $82\mu\text{g}/100\text{g}$  e  $95\mu\text{g}/100\text{g}$  na mesma matriz alimentar também comercializada nos Estados Unidos.

A fortificação de alimentos é uma ferramenta importante para que as populações atinjam seus requisitos alimentares (ALABURDA et al., 2008), contudo, o monitoramento dos níveis do micronutriente adicionado aos alimentos submetidos a esse processo tecnológico é fundamental para garantir a comercialização de produtos de qualidade e que de fato contenham a quantidade de micronutrientes exigida pela legislação e apresentada nos rótulos.

Vale ressaltar que as farinhas enriquecidas são utilizadas como ingredientes para o preparo de diversos alimentos e que, durante o preparo desses alimentos para o consumo, poderão ocorrer perdas da vitamina por degradação e lixiviação o que irá interferir de maneira direta no conteúdo consumido do nutriente adicionado (SOEIRO et al., 2010). Desta forma, o controle do micronutriente adicionado nos produtos alimentares finais é muito relevante tanto para garantir a qualidade dos alimentos como para fins regulatórios (ALABURDA et al., 2008).

A determinação do teor de ácido fólico em farinhas de trigo e de milho fortificadas, embora tenha um efeito significativo sobre a prática de fortificação realizada pelas indústrias, tem recebido pouca atenção no Brasil. Os resultados reportados no presente estudo fornecem importantes informações sobre a prática de

fortificação das farinhas de trigo e de milho brasileiras, especialmente as comercializadas no Nordeste do país, contribuindo para reforçar a necessidade de maior monitoramento regular dos níveis de fortificação das matrizes farináceas pelas autoridades brasileiras.

As diferenças na concentração de ácido fólico nas diferentes preparações cruas (Tabela 3) comparados à quantidade adicionada às matrizes farináceas utilizadas, sugerem que o próprio processo de preparação do alimento pode contribuir para perdas no conteúdo da vitamina. Tais observações foram fortalecidas quando o tratamento estatístico aplicado (Figuras 15 e 16) demonstrou haver diferenças significativas no teor de ácido fólico entre a farinha e suas preparações.

A maior retenção de ácido fólico nas preparações (Tabelas 3 e 4) submetidas ao método de cocção seco sugerem que tal técnica é a mais adequada quando se deseja reter de maneira mais efetiva o ácido fólico no alimento preparado. As amostras cozidas em meio seco (bolo de trigo, pão de forma, cuscuz e bolo de milho) estatisticamente apresentaram maior concentração no teor de ácido fólico comparadas à preparação cozida em meio úmido (molho branco) (Figura 14). As maiores perdas foram observadas para o molho branco (43%) o qual, mesmo antes do processamento térmico, apresentou a menor concentração de ácido fólico sugerindo que o contato direto do alimento com a água de cocção promove perdas consideráveis no teor desta vitamina que continuam durante o cozimento. A diminuição no teor de ácido fólico após a cocção por imersão em água pode ser explicada pela natureza hidrossolúvel da vitamina que contribui para que as perdas ocorram principalmente em virtude da lixiviação para a água de cocção em alimentos cozidos (LIMA, 2005). Contudo, é provável que a perda de ácido fólico no molho branco esteja mais relacionada à hidrólise da vitamina na matriz alimentar coccionada do que à lixiviação, tendo em vista que a perda da vitamina para a água de cocção é improvável já que a mesma se manteve incorporada à preparação durante e mesmo após o processo de cocção.

A variação na concentração de ácido fólico nas preparações elaboradas com farinha de trigo também teve relação com o método de cocção empregado, contudo, acredita-se que a etapa de preparo da mistura também influenciou para esta condição. A retenção observada para pão de forma (87%) foi maior comprada ao bolo de trigo (80%) e molho branco (57%). Contudo, quando comparadas às preparações de bolo

de trigo e pão de forma (Figura 15), preparações submetidas as mesmas condições de tratamento térmico (180°C/40 minutos), a retenção do ácido fólico observada para o pão foi maior que a retenção encontrada para o mesmo composto no bolo de trigo. Isto pode ter ocorrido devido o método de preparo empregado para a massa do pão que através da energia mecânica transmitida durante a mistura induz a quebra e formação de ligações covalentes e não covalentes, o que resulta na formação de uma rede de glúten (BELTON, 2012). Esta rede desempenha um papel importante na qualidade única do produto, afetando a capacidade de absorção de água (que neste caso é maior), coesão, viscosidade e elasticidade da massa (XUAN et al., 2017). Acredita-se que a formação da rede do glúten no pão de forma, que acontece também para o bolo de trigo, influencia a retenção do ácido fólico na matriz alimentar, contudo, no caso do pão, a retenção se apresenta maior em virtude do maior trabalho mecânico empregado durante o preparo da massa que, conseqüentemente, será capaz de absorver mais água e assim promover a maior ligação da vitamina com a água que fica retida na rede formada. O ácido fólico possui natureza hidrossolúvel e se durante o processo de cocção por imersão em água é perdido pela difusão na água de cocção no caso do pão e bolo de trigo pode ser retido pela água presente na rede de glúten.

Com relação às preparações tendo como ingrediente a farinha de milho fortificada com ácido fólico em laboratório, ambas preparações, bolo de milho e cuscuz apresentaram boa retenção no conteúdo do ácido fólico. A retenção do composto no bolo de milho se apresentou um pouco maior comparado com a retenção encontrada para o cuscuz. Contudo o teste estatístico (Figura 16) demonstrou que as diferenças entre as duas preparações não foram significativas demonstrando que não houveram perdas consideráveis de ácido fólico.

Alguns estudos relataram a estabilidade do ácido fólico em matrizes fortificadas submetidas a variadas técnicas de cocção. Em estudo conduzido por Neves (2013) a retenção de ácido fólico em pão francês após o assamento foi de aproximadamente 70%. Silveira (2012) estudou a estabilidade térmica do ácido fólico em arroz fortificado após diferentes técnicas de cocção. Os resultados demonstraram que a maior retenção no conteúdo de ácido fólico ocorreu para a preparação refogada em óleo e cozida em água (96,1%) não havendo perdas consideráveis quando utilizadas outras técnicas de cocção (micro-ondas e escala industrial). A estabilidade do ácido fólico também foi observada por Philips et al. (2017) em tortilhas produzidas com farinha de

milho fortificada. Seus resultados demonstraram uma perda de 13% para as tortilhas assadas em forno e nenhuma perda para aquelas submetidas à fritura.

Observa-se que os dados sobre a estabilidade do ácido fólico em alimentos fortificados e submetidos a diferentes técnicas de cocção são escassos sendo a maioria dos estudos voltados para a investigação da influência dos diferentes métodos de cocção sob o conteúdo de folatos em vegetais. Existe, portanto, a necessidade da realização de mais estudos que avaliem a estabilidade do ácido fólico em alimentos preparados a partir de matrizes fortificadas, especialmente as farinhas de trigo e de milho fortificadas que são utilizadas como ingredientes para o preparo de diversos alimentos costumeiramente consumidos pela população. Contudo, apesar da limitação observada na disponibilidade de dados, constata-se que os métodos que melhor preservam o teor de ácido fólico são os que empregam calor seco, uma vez que os métodos de cocção por calor úmido, mais precisamente os que submetem o alimento ao contato direto com a água de cocção através da imersão, contribuem para as maiores perdas em virtude, principalmente, da lixiviação do composto para a água de cocção.

Desta forma, a opção pela utilização de técnicas de cocção que melhor preservem o conteúdo de ácido fólico nos alimentos ou ainda a ingestão da água de cocção proveniente do cozimento de alimentos por imersão, contribui para sua maior preservação/retenção no alimento preparado e cozido e, conseqüentemente, para adequada ingestão da quantidade requerida da vitamina em questão o que garante o aporte necessário do nutriente, maior probabilidade de atendimento à ingestão dietética de referência (IDR) evitando, assim, a manifestação de patologias graves que incidem em virtude da sua carência ou baixa ingestão.

## 8 CONCLUSÕES

As farinhas de trigo e de milho comercialmente fortificadas podem apresentar baixa ou nenhuma quantidade de ácido fólico adicionado acredita-se que em virtude do processo de homogeneização executado no ambiente industrial. Os resultados aqui reportados apontam para a necessidade de monitoramento dos programas de fortificação de matrizes farináceas com ácido fólico especialmente por indicar a não detecção da vitamina em todos os produtos avaliados.

A cocção pode provocar perdas significativas de ácido fólico, porém estas perdas estão relacionadas à complexidade da matriz alimentar bem como o método de cocção empregado. Estudos adicionais que investiguem a estabilidade do ácido fólico em outras preparações comumente consumidas pela população e submetidas a variadas técnicas de cocção são necessários tanto para otimizar as técnicas a fim de aumentar a retenção do ácido fólico no alimento a ser consumido como para atualizar as tabelas de composição de alimentos e assim disponibilizar mais informações as quais são úteis para cálculos de ingestão dietética e adequação nutricional.

## REFERÊNCIAS

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias do Milho. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatistica>>. Acesso em 06/02/2018

AGUIAR, M. J. B. et al. Defeitos de fechamento do tubo neural e fatores associados em recém-nascidos vivos e natimortos. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 129-34, 2003.

ALVES, N. E. G. et al. Efeito dos diferentes métodos de cocção sobre os teores de nutrientes em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, p. 507-513, 2011.

ARCOT, J.; SHRESTHA, A. J.; GUSANOV, U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 245-252, 2002.

ANDERSON, J. L. et al. Effect of folic acid fortification of food on homocysteine-related mortality. **The American journal of medicine**, v. 116, n. 3, p. 158-164, 2004.

DE KONING, AB LAWRENCE et al. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. **Clinical biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 431-441, 2003.

BALL, G. F. M. **Vitamins in foods; analysis, bioavailability and stability**. 1<sup>a</sup> Edição. United States of America, USA, Taylor & Francis Group: CRC press, 2006, 814 p.

BALUZ, K.; CARMO, M. G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, p. 597-607, 2002.

BELTON, P. S. The molecular basis of dough rheology. In: **Breadmaking (Second Edition)**. 2012. p. 337-351.

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**, v. 19, n. 1, p. 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**, v. 41, n. 7, p. 1335-1343, 2008.

BONNER-SHERGILL, R. Micronutrients. **Paediatrics and Child Health**, v. 27, n. 8, p. 357-362, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 150, de 13 de abril de 2017. **Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico**, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Perguntas e respostas. Enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/2810640/Enriquecimento+de+Farinhas+de+Trigo+e+de+Milho/b58edc35-4cb3-4b6f-8701-11ec25d00f1f>>. Acesso: 02 de dezembro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 1.793 de 11 de agosto de 2009. **Instituição da Comissão Interinstitucional para Implementação, Acompanhamento e Monitoramento das Ações de Fortificação de Trigo, de Milho e de seus Subprodutos**. Diário Oficial da União. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 344, 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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC No. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**, Ed., 2001.

CABRERA, R. M. et al. Investigations into the etiology of neural tube defects. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, v. 72, 330-344, 2004.

CASTILLO-LANCELOTTI, C.; TUR, J. A.; UAUY, R.. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. **Public health nutrition**, v. 16, n. 5, p. 901-911, 2013.

CHANDRA-HIOE, M. V.; BUCKNALL, M. P.; ARCOT, J. Folic acid-fortified flour: Optimised and fast sample preparation coupled with a validated high-speed mass spectrometry analysis suitable for a fortification monitoring program. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1416-1423, 2013.

CHEUNG, R. H. F. et al. Investigation of folic acid stability in fortified instant Asian noodles by use of capillary electrophoresis. **Food chemistry**, v. 112, n. 2, p. 507-514, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, *General Principles for the Addition of Essential Nutrients to Foods* (CAC/GL 9-1987) Revisado 2015, 2015. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.org/input/download/%E2%80%A6CXG\\_0093\\_2015.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/%E2%80%A6CXG_0093_2015.pdf)>. Acesso 01/02/2018

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura Semanal. Trigo: período de 01 e 05/2010**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos>. Acesso em: 06/02/2018.

CZEIZEL, A. E.; DUDÁS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional vitamin supplementation. **New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 1832-1835, 1992.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4ª ed. Ed.: Artmed, 2010.

DELLA LUCIA, C. M. et al. Otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção com fluorescência. **Química Nova**, v. 34, p. 335-340, 2011.

FDA. Food standards: amendment of standards of identify for enriched grain products to require addition of folic acid. **Federal Register**, v. 6, p. 8781-8791, 1996.

FATHIMA, S. J.; NALLAMUTHU, I.; KHANUM, F. Vitamins and minerals fortification usind nanotechnology: bioavailability and recommended allowances. In: **Nutrient Delivery**. 2017. p. 457-496.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. São Paulo: Atheneu; 1992.

GAZZALI, A. M. et al. Stability of folic acid under several parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 419-430, 2016.

GONZÁLEZ, A. I.; CARBALLO, M.M.G. Ácido fólico y defectos del tubo neural en Atención Primaria. **Medicina Familiar y Comunitaria**, v. 13, p. 305-310, 2003.

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**, v. 60, n. 2, p. 37-42, 2005.

HASSAN, K. Association of low potassium diet and folic acid deficiency in patients with CKD. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 11, p. 821–827, 2015.

ICH. - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, p.11-12, 1994.

JUZENIENE, A. et al. The action spectrum for folic acid photodegradation in aqueous solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 126, p. 11–16, 2013.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? Disponível em: <<http://scientiachromatographica.com/files/v1n2/v1n2a4.pdf>>. Acesso em 05/02/2018.

LEŠKOVÁ, E. et al. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, p. 252–276, 2006.

LÍBERA, B, D. et al. Estratégias de combate às microdeficiências no grupo materno-infantil. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, p. 190-198, 2008.

LIMA, B. N. B et al. Estudo do amido de farinhas comerciais comestíveis. **Polímeros**, v. 22, n. 5, p. 486-490, 2012.

LIMA, D. M. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. NEPA-UNICAMP, 2006.

LIMA, J. A. Folatos em vegetais - Influência do tipo de cultivo e do processamento. 2005. 98f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

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**, v. 58, p. 81-86, 2008. (a)

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**, v. 9, p. 57-62, 2006.

LIU, S. et al. Effect of folic acid food fortification in Canada on congenital heart disease subtypes. **Circulation**, v. 134, n. 9, p. 647, 2016.

LYNOTT, M. **Report of the National Committee on folic acid food fortification**. Dublin: Food Safety Authority of Ireland, 2006. p. 120.

LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, p. 121-138, 2000.

MURPHY, E. W.; CRINER, P. E.; GRAY, B. C. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 1153-1157, 1975.

NEVES, D. A. **Bioacessibilidade *in vitro* do ácido fólico em pão francês e a avaliação de sua estabilidade térmica**. 2013. 88 F. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, São Paulo. 2013.

PAIVA, E. P. D. et al. Investigation of protocols to extraction and quantification of folates in vegetables matrices split into liquor and fiber fraction using factorial design. **Journal of Chromatography A**, v. 1260, n. 19, p. 33– 41, 2012.

PANE, D. Q. **Ácido fólico em achocolatados**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2007.

PENALVA, R. et al. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. **Food Hydrocolloids**, v.44, p. 399-406, 2015.

PHILIPS, R. et al. Folate Stability in Folic Acid Enriched Corn Masa Flour, Tortillas, and Tortilla Chips over the Excepted Shelf Life. **Cereal Chemistry**, v. 94, p. 917-921, 2017.

PHILIPS, K. M. et al. Stability os 5-methyltetrahydrofolate in frozen fresh fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 92, p. 587-595, 2005.

PRIETO, S. P. et al. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. **Food Control**, v. 17, p. 900-904, 2006.

QUIRÓS, A.R.B. et al. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1032, p. 135-139, 2005.

RADER, J. I.; WEAVER, C. M.; ANGYAL, G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. **Food Chemistry**, v. 70, p. 275-289, 2000.

RAMAEKERS, V. T.; BLAU, N. Cerebral folate deficiency. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 46, p. 843-851, 2004.

RATHKE, V. M. **Desenvolvimento e validação de um método por HPLC-DAD para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo**. 2016. 38 f. Monografia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Porto Alegre. 2016.

ROSELL, C. M. Fortification of Grain-Based Foods. In: **Encyclopedia of Food Grains** (Second Edition). 2016. p. 577-583.

ROURE, M. C. El déficit de ácido fólico. **Formación Médica Continuada em Atención Primaria**, v. 17, p. 94-100, 2010.

SANDLER, A.D. Children with spina bifida: key clinical issues. **Pediatric Clinics of North America**, v. 57, p. 879-892, 2010.

SAWAENGSRRI, H. et al. High folic acid intake reduces natural killer cell cytotoxicity in aged mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 30, p. 102-107, 2016.

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**, v. 80, p. 795-824, 2000.

SOEIRO, B. T. et al. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por Componentes Principais (PCA). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 618-624, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Organic Chemistry**. New York: Wiley, 2013.

SUZART, C. A. G. **Estudo de estabilidade de ácido fólico e ferro em fermentos biológicos e/ou químico e na panificação de pães e bolos**. 2016. 175 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, São Paulo. 2016.

SWIGLO, A. G. Folates as antioxidants. **Food Chemistry**, v.101, p. 1480-1483, 2007.

TORRES, D. P. M. Produção de refeições e alterações nutricionais nos alimentos. **Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, v. 15, p. 66-70, 2009.

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**, v. 23, p. 881-894, 2010.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. et al. Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 157-162, 1997.

VORA, A. et al. Thermal stability of folic acid in the solid-state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 75, p. 709–717, 2004.

XUAN, Y. F. al. Effect of hydroxypropylmethylcellulose on transition of water status and physicochemical properties of wheat gluten upon frozen storage. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 35-42, 2017.

**APÊNDICE A - Ficha técnica de preparação de bolo de trigo**

Nome da Preparação		Bolo de Trigo									
Tempo de Preparo		20 minutos			Tempo de Cocção		40 minutos				
Insumos							Valor Nutritivo				
Ingredientes	Unidade	Medida Caseira	Peso Bruto	Peso Líquido	Fator Correção	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	CH* (g)	PTN* (g)	LIP* (g)	Kcal total
Açúcar	Kg	1 xícara de chá	160g	160g	1	2,50	0,62	159,20	Tr	Tr	636,80
Farinha de Trigo	Kg	2 xícaras de chá	240g	240g	1	4,00	0,96	180,24	23,52	3,36	845,28
Margarina	Kg	2 colheres de sopa	40g	40g	1	2,50	0,40	Tr	Tr	26,96	242,64
Ovos	Und	2 ovos inteiros	98g	98g	1	0,60	1,20	1,56	12,74	8,72	135,68
Leite de vaca	Lt	1 xícara	240mL	240mL	1	4,00	0,96	94,08	60,96	64,56	1.201,2
Fermento químico em pó	Kg	1 colher de chá	5g	5g	1	3,00	0,10	2,20	0,025	0,001	9,0
Total dos Insumos							4,24	437,28	97,24	103,60	3070,5

### 1. Modo de preparo

- Bater as claras em neve e reservar.
- Misturar as gemas, a margarina e o açúcar até obter uma massa homogênea.
- Acrescentar o leite e a farinha de trigo aos poucos sem parar de bater.
- Adicionar as claras em neve, o fermento e misturar.
- Despejar a massa em uma forma pequena de furo central untada e enfarinhada.
- Assar em forno médio a uma temperatura de 180°C, preaquecido, por 40 minutos.

### 2. Utensílios e equipamentos necessários

Xícara de chá, colher de sopa, batedeira, forma para bolo

Peso total (kg): 0,516kg

Rendimento: 4 porções

Peso/porção (kg): 0,129kg

Custo/porção (R\$): 1,10

\*Valores oriundos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)

**APÊNDICE B - Ficha técnica de preparo de molho branco**

Nome da Preparação		Molho Branco									
Tempo de Preparo		10 minutos			Tempo de Cocção		10 minutos				
Insumos							Valor Nutritivo				
Ingredientes	Unidade	Medida Caseira	Peso Bruto	Peso Líquido	Fator Correção	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	CH* (g)	PTN* (g)	LIP* (g)	Kcal total
Leite de vaca	Lt	1 xícara	240mL	240mL	1	4,00	0,96	94,08	60,96	64,56	1.201,2
Margarina	Kg	½ colher de sopa	10g	10g	1	2,50	0,10	Tr	Tr	6,74	60,66
Alho	Kg	1 unidade médias picadas	5g	5g	1	15,00	0,10	1,20	0,35	0,01	6,29
Cebola	Kg	½ unidade pequena picada	25g	25g	1	3,00	0,10	2,22	0,42	0,025	10,78
Farinha de Trigo	Kg	2 colheres de sopa	20g	20g	1	4,00	0,10	15,02	1,96	0,28	70,44
Creme de Leite	Kg	2 colheres de sopa rasa	15g	15g	1	3,00	0,40	0,45**	0,33**	6**	57,12
Sal	Kg	½ colher de chá	2g	2g	1	1,00	0,10	-	-	-	-
Total dos Insumos							1,86	112,97	64,02	77,62	1.406,5

1. Modo de preparo

- Fritar o alho e a cebola na margarina à uma temperatura de 100°C.
- Adicionar o leite, a farinha de trigo e o sal.
- Mexer até espessar o molho.
- Diminuir a temperatura do fogo para 60°C e deixar cozinhar por 5 minutos.

2. Utensílios e equipamentos necessários

Xícara de chá, colher de chá, colher de sopa, caçarola média, espátula.

Peso total (kg): 0,117kg

Rendimento: 1 porção

Peso/porção (kg): 0,117kg

Custo/porção (R\$): 1,86

\*Valores oriundos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (LIMA, 2006)

\*\*Valores oriundos da Tabela de Composição Química dos Alimentos (FRANCO, 1992)

**APÊNDICE C** - Ficha técnica de preparo de pão de forma

Nome da Preparação		Pão de Forma									
Tempo de Preparo		1h 30 minutos			Tempo de Cocção			40 minutos			
Insumos								Valor Nutritivo			
Ingredientes	Unidade	Medida Caseira	Peso Bruto	Peso Líquido	Fator Correção	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	CH (g)	PTN (g)	LIP (g)	Kcal total
Farinha de trigo	Kg	2 xícaras de chá	240g	240g	1	4,00	0,96	180,24	23,52	3,36	845,28
Fermento biológico seco	Kg	2 colheres de chá	10g	10g	1	2,50	2,50	0,77	0,05	0,01	3,37
Leite de vaca	Lt	2 xícaras de chá	300mL	300mL	1	4,00	1,20	117,60	76,2	80,70	1.501,5
Manteiga	Kg	2 colheres de sopa	40g	40g	1	2,50	0,40	0,04	0,16	32,96	297,4
Sal	Kg	2 colheres de chá	8g	8g	1	1,00	-	-	-	-	-
Total dos Insumos							5,06	298,65	99,93	117,03	2.647,6
<p>1. Modo de preparo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Numa tigela grande, misturar o fermento e a farinha de trigo até total homogeneização.</li> <li>- Regar com o leite</li> </ul> <p>e, aos poucos, sem parar de misturar e amassar com a mão.</p>											

- Ao notar a absorção dos líquidos pela farinha, juntar a manteiga e amassar bem para incorporar.
- Apertar, amassar, esticar e amassar a massa até que a mesma adquira uma textura macia e úmida.
- Marcar dez minutos para este procedimento de homogeneização da massa.
- Modelar a massa no formato de uma bola, retornar para a tigela e cobrir cm papel filme.
- Deixar a massa descansar por 1 hora até dobrar de tamanho.
- Assim que crescer, transferir a massa para a bancada e dividi-la ao meio.
- Achatar delicadamente cada uma das metades até formar um retângulo.
- Para modelar os pães, dobrar a base do retângulo (lado maior da massa) até o centro e apertar delicadamente; cobrir com a base oposta a apertar bem para selar; dobrar cerca de 4 cm das laterais e apertar bem as emendas para selar.
- Transferir a massa, com a emenda voltada para baixo, para uma forma untada com manteiga.
- Cobrir com papel filme e deixar descansar por mais 40 minutos.
- Restando 20 minutos para o tempo do pão, pré-aquecer o forno a 180°C.
- Assar o pão em forno convencional por cerca de 40 minutos.

## 2. Utensílios e equipamentos necessários

Xícara de chá, colher de chá, colher de sopa, forma para pão.

Peso total (kg): 0,335 kg	Rendimento: 1 porção	Peso/porção (kg): 0,335 kg	Custo/porção (R\$): 5,06
---------------------------	----------------------	----------------------------	--------------------------

\*Valores oriundos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)

**APÊNDICE D - Ficha técnica de preparo de bolo de milho**

Nome da Preparação		Bolo de Milho									
Tempo de Preparo		30 minutos			Tempo de Cocção			40 minutos			
Insumos								Valor Nutritivo			
Ingredientes	Unidade	Medida Caseira	Peso Bruto	Peso Líquido	Fator Correção	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	CH (g)	PTN (g)	LIP (g)	Kcal total
Farinha de Milho (fubá)	Kg	2 xícaras de chá	240g	240g	1	2,00	0,96	189,36	17,28	4,56	867,6
Açúcar	Kg	½ xícara de chá	80g	80g	1	4,00	0,32	79,60	Tr	Tr	318,4
Ovos	Unidade	2 unidades inteiras	98g	98g	1	0,60	1,20	1,56	12,74	8,72	135,68
Óleo de Milho	Lt	½ xícara de chá	85mL	85mL	1	4,00	0,34	-	-	85	765
Leite de Vaca	Lt	½ xícara de chá	75mL	75mL	1	4,00	0,30	29,4	19,05	20,18	375,42
Fermento químico em pó	Kg	1 colher de chá	5g	5g	1	3,00	0,10	2,20	0,025	0,001	9,0
Sal	Kg	½ colher de chá	2g	2g	1	1,00	0,10	-	-	-	-
Total dos Insumos							3,32	302,12	49,10	118,46	2.471,10

### 1. Modo de preparo

- Colocar no liquidificador o leite, o óleo e os ovos e bater para misturar.
- Desligar o liquidificador, colocar o açúcar e bater mais um pouco.
- Desligar o liquidificador, acrescentar a farinha de milho e bater mais um pouco.
- Desligar o liquidificador, adicionar o fermento em pó e o sal e misturar.
- Despejar a massa em uma forma pequena de furo central untada e enfarinhada.
- Assar em forno médio a uma temperatura de 180°C, preaquecido, por 40 minutos.

### 2. Utensílios e equipamentos necessários

Xícara de chá, colher de chá, colher de sopa, liquidificador, forma para bolo.

Peso total (kg): 0,511kg	Rendimento: 4 porções	Peso/porção (kg): 0,128g	Custo/porção (R\$): 0,85
--------------------------	-----------------------	--------------------------	--------------------------

\*Valores oriundos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)

**APÊNDICE E - Ficha técnica de preparo de cuscuz**

Nome da Preparação		Cuscuz									
Tempo de Preparo		15 minutos				Tempo de Cocção		5 minutos			
Insumos								Valor Nutritivo			
Ingredientes	Unidade	Medida Caseira	Peso Bruto	Peso Líquido	Fator Correção	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)	CH (g)	PTN (g)	LIP (g)	Kcal total
Farinha de Milho (fubá)	Kg	1 xícara de chá	120g	120g	1	2,00	0,50	94,68	8,64	2,28	433,8
Água	Lt	1 copo americano	200mL	200mL	1	-	-	-	-	-	-
Sal	Kg	½ colher de chá	2g	2g	1	1,00	0,10	-	-	-	-
Total dos Insumos							0,60	94,68	8,64	2,28	433,8
<p>1. Modo de preparo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Colocar a farinha de milho e o sal num recipiente.</li> <li>- Acrescentar a água aos poucos e homogeneizar.</li> <li>- Após a mistura, colocar tudo numa cuscuzeira e levar ao fogo a 100°C.</li> <li>- Quando a água da cuscuzeira começar a ferver, diminuir a temperatura do fogo para 60°C e deixar no vapor por 5 minutos</li> </ul> <p>2. Utensílios e equipamentos necessários</p> <p>Xícara de chá, colher de chá, espátula, cuscuzeira.</p>											
Peso total (kg): 0,250kg			Rendimento: 1 porção			Peso/porção (kg): 0,250kg			Custo/porção (R\$): 0,60		

\*Valores oriundos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)

**APÊNDICE F - Dados para cálculo da retenção real (RR%) do ácido fólico nas diferentes preparações**

Preparação	Teor de ácido fólico na preparação cozida (mg/g)	Peso da Preparação cozida (g)	Teor de ácido fólico na preparação crua (mg/g)	Peso da preparação crua (g)	Constante	Retenção Real (RR%)
Bolo de Trigo	0,0032	516	0,0038	576	100	75,44
	0,002	516	0,0034	576	100	52,69
	0,0035	516	0,0034	576	100	92,22
	0,003	516	0,0033	576	100	81,44
	0,0031	516	0,0029	576	100	95,76
	0,0030 ± 0,001	516	0,0034 ± 0,0003	576	100	79,51 ± 17,06
Molho Branco	0,0024	117	0,0023	218	100	56,00
	0,0023	117	0,0023	218	100	53,67
	0,0022	117	0,002	218	100	59,04
	0,0022	117	0,0021	218	100	56,22
	0,0024	117	0,0021	218	100	61,34
	0,0023 ± 0,001	117	0,0022 ± 0,0001	218,42	100	57,25 ± 2,97
Pão de Forma	0,0046	335	0,0051	383	100	78,89
	0,0043	335	0,0042	383	100	89,55
	0,004	335	0,0042	383	100	83,30
	0,0048	335	0,0042	383	100	99,96
	0,0038	335	0,004	383	100	83,09
	0,0043 ± 0,0004	335	0,00434 ± 0,0004	383	100	86,96 ± 8,20
Bolo de Milho	0,0034	511	0,0029	546	100	109,73
	0,002	511	0,002	546	100	93,59
	0,0033	511	0,0029	546	100	106,50
	0,0029	511	0,0029	546	100	93,59
	0,0028	511	0,0029	546	100	90,36

	$0,00288 \pm 0,001$	511	$0,00272 \pm 0,0004$	546	100	$98,75 \pm 8,72$
Cuscuz	0,0034	250	0,0033	260	100	99,07
	0,0031	250	0,0027	260	100	110,40
	0,003	250	0,0036	260	100	80,13
	0,0031	250	0,003	260	100	99,36
	0,003	250	0,003	260	100	96,16
	$0,00312 \pm 0,0002$	250	$0,00312 \pm 0,0003$	260	100	$97,02 \pm 10,88$