



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

CRISTIANE DA SILVA SENA

**ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE ÁCIDO FÓLICO EM
FARINHA DE MILHO FORTIFICADA**

Londrina
2006

CRISTIANE DA SILVA SENA

**ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE ÁCIDO FÓLICO EM
FARINHA DE MILHO FORTIFICADA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena da Silva Miglioranza

Co-orientador: Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho (ITAL)

Londrina
2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Sena, Cristiane da Silva.

Estabilidade físico-química de ácido fólico em farinha de milho fortificada / Cristiane da Silva Sena. – Londrina : 2006. 104f.

Orientadora: Lúcia Helena da Silva Miglioranza.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

1. Ácido fólico. 2. Vitamina. 3. Estabilidade físico-química. 4. Estudo de estabilidade à longo prazo. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Farinha de milho. I. Miglioranza, Lúcia Helena da Silva. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 664.641.2

CRISTIANE DA SILVA SENA

**ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE ÁCIDO FÓLICO EM
FARINHA DE MILHO FORTIFICADA**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena da Silva Miglioranza.
Orientadora (UEL)

Dr^a. Edna Regina Netto de Oliveira (UEM)

Dr^a. Elza Y. Youssef Matulaitis (UNIFIL)

Londrina, 29 de Junho de 2006.

Dedicatória

*À Deus, por tudo o
que tem feito por mim;*

*À minha família,
sem a qual este trabalho não seria possível.*

Agradecimentos

À prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Miglioranza pela orientação, apoio, ajuda, amizade e por buscar sempre as melhores oportunidades de trabalho que tornaram esse projeto realidade.

Aos professores da pós-graduação em Ciência de Alimentos pela transmissão de conhecimentos que foram importantes para minha formação, e a sua secretária Sandra Rezende por todo auxílio prestado.

Ao CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante o período de mestrado.

Ao pesquisador Dr. Paulo Carvalho pela oportunidade de realização do projeto, assistência e auxílio na realização deste trabalho.

Ao ITAL, que através do doutor Paulo Carvalho possibilitou a realização da parceria que permitiu a execução deste trabalho.

À indústria Nutrimilho que, com seriedade e interesse, deu os primeiros passos que levaram a este projeto.

À pesquisadora Marta G. Silva pela atenção, amizade e assistência no laboratório, que foram tão importantes para a execução deste projeto.

À técnica Alessandra R. Veiga pela ajuda, ensino, amizade e paciência que contribuíram para a realização deste trabalho.

À equipe do laboratório de micronutrientes, técnicos e estagiários que direta ou indiretamente, contribuíram para que o estágio fosse um período de aprendizado profissional, pessoal e de grande amizade.

Aos amigos do mestrado que sempre proporcionaram ótimos momentos e que agora fazem parte de minha história.

Às amigas Mirian e Mery, que me transmitiram a importância de acreditar, persistir e lutar pelos projetos e objetivos em nossa vida.

À todas as amigas de Campinas pelo apoio e ajuda, as quais guardo no coração.

À todas as pessoas, que mesmo não citadas pelo nome, estiveram presentes neste período, fazendo com que fosse um tempo de crescimento e aprendizado tão importantes em minha vida.

**Pois o Senhor é quem dá a sabedoria,
da sua boca procedem
o conhecimento
e o discernimento.
Provérbios 2:6**

SENA, Cristiane da Silva. **Estabilidade físico-química de ácido fólico em farinha de milho fortificada**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

RESUMO

O ácido pteroilglutâmico, também chamado ácido fólico, é uma vitamina que faz parte do grupo das vitaminas do complexo B. Estudos demonstram que mulheres que tomam suplemento de ácido fólico no período periconcepcional e durante o primeiro trimestre, podem reduzir o risco de ter uma criança com defeito no tubo neural em cerca de até 75%. Em 2004, a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária tornou obrigatória a adição de ácido fólico e ferro em todas as farinhas de milho e de trigo produzidas no Brasil, com o propósito de fornecer uma ingestão adequada na dieta de mulheres em idade fértil. O objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade físico-química do ácido fólico em farinha de milho durante o período de estocagem. O estudo das amostras foi realizado durante 4 meses nas seguintes amostras: 1) farinha de milho enriquecida com ácido fólico e ferro reduzido, 2) farinha de milho enriquecida com ácido fólico e fumarato ferroso, 3) farinha de milho enriquecida com ácido fólico e sulfato ferroso e 4) farinha de milho enriquecida com ácido fólico. As amostras foram divididas em duas câmaras de estocagem com temperatura controlada, uma a 25°C e outra a 35°C. O ácido fólico foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, usando coluna de fase reversa C-18, tampão acetato (pH 2,8) e acetonitrila para fase móvel, com tempo de corrida de 26 minutos e fluxo de 0,8mL/minuto. Aplicando a análise de regressão linear, foi observado que durante o período de armazenamento, a concentração de ácido fólico não diminuiu de maneira significativa ($p < 0,05$), quando na presença de ferro ou quando usado isoladamente.

Palavras Chave: Ácido fólico. Vitamina M. Estabilidade físico-química. Estabilidade a longo prazo. Cromatografia líquida de alta eficiência. Farinha de milho.

SENA, Cristiane da Silva. **Physical and chemical stability of folic acid in fortified maize flour**. 2006. 104f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

ABSTRACT

The pteroylglutamic acid, also called folic acid or folate, is one water-soluble B vitamins. Studies have found that women who take folic acid supplements before conception and during the first trimester, may reduce their risk of having children with neural tube defects by 75%. In 2004, the ANVISA, the Brazilian Health Surveillance Agency obligated the addition of iron and folic acid in all maize and wheat flour produced in Brazil, aiming at an adequate nutrient supply in the diet of women in fertile age. The objective of this work was to study the folic acid physical and chemical stability in fortified maize flour during storage period. The following studied samples were taken during 4 months: 1) maize flour fortified with folic acid and reduced iron, 2) maize flour fortified with folic acid and ferrous fumarate, 3) maize flour fortified with folic acid and ferrous sulphate and 4) maize flour fortified with folic acid. The samples had been divided in 2 storage chambers with controlled temperature, at 25°C and at 35°C. The folic acid was analyzed by high performance liquid chromatographic, using a C-18 reversed phase column, acetate buffer (pH 2,8) and acetonitrile for the mobile phase, running 26 minutes at flow rate 0,8 mL/min. Applying the analysis of linear regression it was observed that during storage period time, the concentration of folic acid did not decrease in a significant ($p < 0,05$) way, even in the presence of all iron formulas.

Keywords: Folic acid. Vitamin M. Physical and chemical stability. Stability during storage period. High performance liquid chromatographic. Maize flour.

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1 – Estrutura química do ácido fólico (GOODMAN & GILMAN, 2003).....	25
Figura II.2 – Estados de oxidação do ácido fólico (DONNELLY, 2001).....	26
Figura II.3 – Estrutura e nomenclatura do ácido fólico e seus congêneres (GOODMAN & GILMAN, 2003).....	27
Figura II.4 – Inter-relações e funções metabólicas do ácido fólico e seus derivados (GOODMAN & GILMAN, 2003).....	32
Figura II.5 – Esquema do grão de milho	40
Figura II.6 – Esquema do processamento de milho a úmido	41
Figura II.7 – Esquema do processamento de milho a seco.....	42
Figura VI.1 – Gráfico da curva de calibração para ácido fólico (área versus concentração)	69
Figura VI.2 – Branco de reagentes	72
Figura VI.3 – Padrão de ácido fólico.....	73
Figura VI.4 – Farinha de milho	73
Figura VI.5 – Farinha de milho adicionada de ácido fólico	74
Figura VI.6 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, armazenada a 25°C.....	82
Figura VI.7 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, armazenada a 25°C.....	83
Figura VI.8 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, armazenada a 25°C.....	84
Figura VI.9 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, armazenada a 25°C.....	85
Figura VI.10 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, armazenada a 35°C	87

FiguraVI.11 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, armazenada a 35°C	88
FiguraVI.12 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, armazenada a 35°C.....	89
FiguraVI.13 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, armazenada a 35°C	90

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1	– DRI (Ingestão Alimentar de Referência) para indivíduos, segundo a Food and Nutrition Board e o Institute of Medicine, da Academia Nacional de Ciência dos EUA	30
Tabela II.2	– Informação nutricional de farinha de milho.....	39
Tabela II.3	– Características das fontes de ferro usadas para fortificação de alimentos	44
Tabela IV.1	– Composição base da mistura de nutrientes - ácido fólico e ferro	59
Tabela IV.2	– Composição da mistura 1 (ácido fólico e ferro reduzido)	60
Tabela IV.3	– Composição da mistura 2 (ácido fólico e fumarato ferroso)	60
Tabela IV.4	– Composição da mistura 3 (ácido fólico e sulfato ferroso).....	60
Tabela IV.5	– Composição da mistura 4 (ácido fólico)	61
Tabela VI.1	– Valores de concentração e área obtidos na curva de calibração	69
Tabela VI.2	– Valores obtidos para estabelecimento de exatidão	70
Tabela VI.3	– Valores obtidos para o cálculo de precisão	71
Tabela VI.4	– Valores de concentração, área e desvio padrão utilizados para o cálculo dos limites de detecção e quantificação.....	74
Tabela VI.5	– Concentração de ácido fólico em mistura de nutrientes.....	76
Tabela VI.6	– Concentração encontrada de ácido fólico em farinha de milho na análise do tempo 0 dias	77
Tabela VI.7	– Análise de variância para amostras estocadas a 25°C	79
Tabela VI.8	– Coeficiente de correlação encontrado para amostras estocadas a 25°C	80
Tabela VI.9	– Análise de regressão para amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico	81
Tabela VI.10	– Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, estocada a 25°C no período de 120 dias.....	81
Tabela VI.11	– Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, estocada a 25°C no período de 120 dias.....	82

Tabela VI.12 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, estocada a 25°C, no período de 120 dias.....	83
Tabela VI.13 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, estocada a 25°C no período de 120 dias.....	84
Tabela VI.14 – Análise de variância para amostras estocadas a 35°C	85
Tabela VI.15 – Coeficiente de correlação encontrado para amostras estocadas a 35°C	86
Tabela VI.16 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, estocada a 35°C, no período de 120 dias.....	87
Tabela VI.17 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, estocada a 35°C, no período de 120 dias.....	88
Tabela VI.18 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, estocada a 35°C, no período de 120 dias.....	89
Tabela VI.19 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, estocada a 35°C, no período de 120 dias.....	90

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	17
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1 IMPORTÂNCIA DA ALIMENTAÇÃO PARA NUTRIÇÃO HUMANA	19
1.1 IMPORTÂNCIA DAS VITAMINAS NA SAÚDE HUMANA	20
2 FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS	22
2.1 FORTIFICAÇÃO DE CEREAIS	23
3 ÁCIDO FÓLICO	25
3.1 ESTABILIDADE	28
3.2 FONTES DE DOSES RECOMENDADAS	29
3.3 METABOLISMO	30
3.4 FUNÇÕES	32
3.5 RELAÇÃO ENTRE O ÁCIDO FÓLICO E A VITAMINA ₁₂	34
3.6 DEFICIÊNCIA DE FOLATO	35
3.7 RECOMENDAÇÕES SOBRE O USO DE ÁCIDO FÓLICO	37
3.8 UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA	37
4 MILHO	39
4.1 IMPORTÂNCIA NA DIETA	39
4.2 PROCESSOS	40
4.2.1 Processo a úmido	40
4.2.2 Processo a seco	41

5 FORTIFICAÇÃO DE FARINHA DE MILHO	43
5.1 MISTURA DE NUTRIENTES	43
5.2 FONTES DE NUTRIENTES USADOS EM FORTIFICAÇÃO DE FARINHA DE MILHO	44
5.2.1 Ferro	44
5.2.2 Ácido fólico	45
5.3 PROCESSO DE FORTIFICAÇÃO	46
5.4 CONTROLE DE QUALIDADE	47
6 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO	48
6.1 MÉTODO MICROBIOLÓGICO	48
6.2 MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	49
6.2.1 Extração	50
6.2.2 Processo de limpeza	50
6.2.3 Fase móvel	51
6.2.4 Fase estacionária	51
6.2.5 Detecção	52
6.2.6 Identificação	52
6.2.7 Quantificação	52
7 VALIDAÇÃO	54
7.1 LINEARIDADE	54
7.2 EXATIDÃO	54
7.3 PRECISÃO	55
7.4 SELETIVIDADE	55
7.5 LIMITE DE DETECÇÃO	55
7.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	56
III OBJETIVOS	57
1 OBJETIVO GERAL	57
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
IV. MATERIAL E MÉTODOS	58
1 MATERIAL	58
1.1 AMOSTRA	58

1.1.1 Preparo da mistura de nutrientes	58
1.1.2 Preparo das amostras de farinha de milho fortificadas	61
2 MÉTODO	63
2.1 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA MISTURA DE NUTRIENTES	63
2.1.1 Preparo das amostras de mistura de nutrientes para análise cromatográfica..	63
2.2 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE MILHO.....	63
2.2.1 Preparo das amostras de farinha de milho para análise cromatográfica.....	63
2.3 MÉTODO APLICADO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO.....	64
2.3.1 Reagentes	64
2.3.2 Equipamento	64
2.3.3 Condições cromatográficas	65
2.3.4 Preparo do padrão	65
2.4 VALIDAÇÃO.....	66
V DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	68
VI RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
1 VALIDAÇÃO	69
1.1 LINEARIDADE	69
1.2 EXATIDÃO	70
1.3 PRECISÃO	71
1.4 SELETIVIDADE.....	72
1.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	74
2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ÁCIDO FÓLICO EM MISTURAS DE NUTRIENTES	76
3 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE MILHO	77
3.1 ANÁLISE TEMPO 0 DIAS.....	77
3.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS A 25°C.....	79
3.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS A 35°C	85

VII CONCLUSÕES.....	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES	93
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXO.....	102

I INTRODUÇÃO

A resolução nº 344 de 13 de dezembro de 2002 tornou obrigatória a fortificação de farinhas de milho e de trigo com ácido fólico e ferro, tendo como um dos objetivos combater defeitos na formação do tubo neural, que é um tipo de malformação congênita.

A prevenção de malformações congênitas, salvo algumas exceções, dificilmente pode ser feita. Isto se deve em grande parte à falta de compreensão sobre a causa definitiva que leva a estes efeitos. Contudo, esforços vêm sendo realizados para que as lacunas existentes a respeito de como ocorrem esses processos sejam compreendidas.

Seguindo este propósito, têm sido realizadas pesquisas que tem como ponto de partida a relação entre a alimentação materna e a prevenção da ocorrência de malformações congênitas. Pesquisas têm estudado o uso de folato periconcepcional para evitar a ocorrência, e recorrência, de defeitos no tubo neural (DTN).

São conhecidos como defeitos no tubo neural malformações congênitas resultantes de falhas no fechamento do tubo neural embrionário. Sérias conseqüências podem ocorrer devido a esse tipo de malformação como a anencefalia (que é a ausência de cérebro) e espinha bífida (protusão de tecido neural através da abertura em arcos vertebrais que não se fundiram) (PARFIT, 1999).

Estudos demonstraram que a suplementação com ácido fólico no período periconcepcional apresentou eficácia na prevenção da ocorrência de defeitos no tubo neural, e que também reduziu em até 75% o risco de recorrência de espinha bífida e anencefalia no caso de famílias que já tinham uma criança afetada por um destes defeitos (JORDE, 2004).

As fortes evidências da relação entre a ingestão de ácido fólico e a redução de DTN, levaram à recomendação de que mulheres em idade fértil devem ingerir 0,4mg/dia de ácido fólico (JORDE, 2004; AMAYA-FARFAN, DOMENE, PADOVANI, 2001; NEUHOUSER, BERESFORD, 2001). Recomendações como estas levaram à implantação de programas de fortificação de alimentos com ácido

fólico. Nos Estados Unidos, desde janeiro de 1998, o Food and Drug Administration determinou que farinhas e produtos à base de cereais deveriam ser fortificados com ácido fólico na quantidade de 140 μ g/100g de produto.

O Brasil também aderiu a esse procedimento com a publicação da resolução n° 344 que torna obrigatória a fortificação de farinha de milho e de trigo com ácido fólico e ferro. Estes produtos devem ser fortificados com 150 μ g de ácido fólico e 4,2mg de ferro para cada 100g de produto final. Este procedimento se tornou obrigatório desde junho de 2004 (BRASIL, 2002). Esta resolução também determina que as empresas fabricantes destes produtos devem garantir a estabilidade do ácido fólico nas farinhas durante o prazo de validade das mesmas (BRASIL, 2002). No entanto chega-se a um impasse, pois: 1) existem dados confirmados pela comunidade científica de que o ácido fólico tem ação preventiva na ocorrência e recorrência de DTN; 2) o enriquecimento é realizado em produtos alimentícios a fim de suprir a ingestão adequada de ácido fólico para mulheres em idade reprodutiva; 3) porém são necessárias informações que comprovem que esta vitamina não é degradada durante o período de armazenamento destes produtos.

Este estudo foi realizado tendo em vista a necessidade de dados sobre a estabilidade do ácido fólico adicionado em farinha de milho, considerando-se as condições em que o produto é armazenado.

Por obrigatoriedade da resolução n°344, as farinhas de milho e de trigo também devem ser fortificadas com ferro, e este mineral pode ser usado em diferentes formas químicas para realizar a fortificação (sulfato ferroso, fumarato ferroso e ferro reduzido). Considerando que o ferro pode atuar como catalisador de reações que levam à degradação de folatos (FENNEMA, 1996), neste estudo foram analisadas amostras de farinha de milho fortificadas com ácido fólico e ferro em três diferentes formas químicas: sulfato ferroso, fumarato ferroso e ferro reduzido, para verificar se o ácido fólico teria maior tendência à degradação quando combinado ao ferro em alguma apresentação específica, e verificar se alguma destas formas químicas do mineral teria influência na estabilidade da vitamina, sendo responsável por degradação significativa.

O objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade físico-química do ácido fólico em farinha de milho fortificada durante o período de armazenamento do produto.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 IMPORTÂNCIA DA ALIMENTAÇÃO PARA NUTRIÇÃO HUMANA

Para o ser humano, a alimentação é a fonte da qual ele obtém cerca de quarenta nutrientes necessários à sua saúde. No entanto, nem sempre a nutrição adequada é obtida por meio da alimentação, o que pode ser devido à escolha de uma alimentação inadequada ou porque o indivíduo não tem acesso aos alimentos necessários à sua boa nutrição.

Dentre as carências nutricionais causadas por uma alimentação inadequada, a carência de micronutrientes (vitaminas e minerais) é a mais comum e preocupante. Segundo relatório realizado pela UNICEF, cerca de um terço da população mundial é afetada pela carência de vitaminas e minerais (UNICEF, 2006). Isso leva a conseqüências como: defeitos congênitos, desenvolvimento intelectual prejudicado em crianças, comprometimento do sistema imune, diminuição da produtividade em adultos e prejuízos na capacidade física e mental em adultos.

Em relação aos minerais, a carência de ferro é a que apresenta maior prevalência, e entre as vitaminas merecem destaque os prejuízos causados pela deficiência de vitamina A e de ácido fólico.

Entre as medidas que podem ser adotadas para combater a deficiência de vitaminas e minerais estão (UNICEF, 2006):

- ◆ Educação: informar a população sobre os alimentos que são fontes naturais dos nutrientes necessários;
- ◆ Suplementação: que pode ser feita através de comprimidos, cápsulas e xaropes;
- ◆ Controle de doenças: manter o controle sobre doenças que podem prejudicar a absorção e manutenção de vitaminas e minerais no organismo;
- ◆ Fortificação alimentar: adicionar vitaminas e minerais em alimentos amplamente consumidos pela população (sal, açúcar, farinha, óleo de cozinha ou margarina).

1.1 IMPORTÂNCIA DAS VITAMINAS NA SAÚDE HUMANA

As vitaminas são consideradas substâncias que são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e que normalmente são obtidas pela ingestão de alimentos que as contêm, pois não são sintetizadas pelo organismo (BRASIL, 1998).

O termo vitaminas designa substâncias orgânicas com amplas variedades de estrutura e função. Elas podem ser divididas em dois grupos básicos: hidrossolúveis e lipossolúveis. Algumas vitaminas quando consumidas estão em uma forma não ativa e precisam, após serem ingeridas, passar por um processo de ativação *in vivo*, que lhes confere atividade biológica (SILVA, 1998).

No organismo as vitaminas lipossolúveis podem ser armazenadas em quantidades maciças e isso aumenta consideravelmente sua toxicidade, o que não acontece com vitaminas hidrossolúveis, pois só podem ser armazenadas em quantidades bem menores e limitadas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

A fim de orientar o consumo destas substâncias são estabelecidas quantidades de referência para o consumo diário, que tem como objetivo direcionar a sua ingestão de forma adequada. Estas quantidades estimadas servem para avaliar e planejar dietas para pessoas saudáveis e seguem as seguintes definições segundo a Food and Nutrition Board da US National Academy of Sciences (AMAYA-FARFAN, DOMENE, PADOVANI, 2001):

- ◆ RDA (Recommended Dietary Allowance, ou “Recomendações de Doses ou Cotas Alimentares”): nível de consumo alimentar de cada nutriente, suficiente para satisfazer os requerimentos de quase todo indivíduo saudável (entre 97 e 98%), compreendido em um determinado grupo, por gênero e estágio de vida (significa a recomendação mais apurada à qual se possa chegar).
- ◆ AI (Adequate Intake ou “Ingestão adequada”): valor de consumo recomendável, baseado em levantamentos, determinações ou aproximações de dados experimentais, ou estimativa de ingestão de nutrientes para grupo(s) de pessoas saudáveis, e que se considera adequado. É usado quando a RDA não pode ser determinada.

- ◆ UL (Tolerable Upper Intake Level ou “Limite de Ingestão Máxima Tolerável): o mais alto nível de ingestão de um nutriente que não causará efeitos adversos à saúde da maioria das pessoas. Acima do UL o risco de efeitos adversos aumenta sensivelmente.
- ◆ EAR (Estimated Average Requirement ou “Estimativa do Requerimento Médio”): valor (mediana) para garantir o requerimento de 50% dos indivíduos sadios compreendidos em um determinado estágio de vida.

Os indivíduos que têm ingestão inferior a RDA não terão necessariamente manifestações devido à deficiência a curto prazo, porém a longo prazo aumentam as possibilidades de desenvolvimento de doenças causadas por uma ingestão insuficiente, à medida que essa dose não seja suprida (GOODMAN & GILMAN, 2003).

A deficiência de vitamina pode ser causada por:

- Ingestão inadequada (devido a dietas excêntricas);
- Anorexia ou dietas para emagrecimento;
- Má absorção devido a patologias no trato gastrointestinal;
- Erros inatos do metabolismo;
- Aumento das necessidades teciduais, o que ocorre em mulheres gestantes e lactantes, em que a necessidade de ingestão de ácido fólico, por exemplo, chega a aumentar 50%;

Entre as estratégias que podem ser usadas para aumentar a ingestão de vitaminas, a fortificação de alimentos amplamente consumidos pela população tem se mostrado promissora, pois além de alcançar grande parte da população tem também a vantagem de não precisar modificar os hábitos alimentares (ZANCUL, 2004).

2 FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS

O conceito de fortificar alimentos com micronutrientes para combater a deficiência dos mesmos, foi desenvolvido no início do século XX.

No Brasil esse procedimento já vem sendo realizado há algumas décadas, como é o caso do sal enriquecido com iodo, que teve sucesso no combate ao bócio (MOINHOS VERA CRUZ, 2006).

Segundo a legislação brasileira é permitido o enriquecimento de alimentos com os seguintes tipos de nutrientes: minerais, vitaminas e aminoácidos. Cada grupo obedecendo a composição e requisitos mínimos para uso em fortificação.

As vitaminas e os minerais são os micronutrientes mais usados para o enriquecimento de alimentos (CARVALHO, 1994), e o nível em que podem ser adicionados tem como referência de valores as RDA.

Para que um alimento seja considerado rico em vitaminas ou minerais, ele deve fornecer 15% da RDA no caso de alimento líquido e 30% da RDA quando o alimento for sólido (BRASIL, 1998).

A biodisponibilidade dos nutrientes adicionados é um fator que também deve ser considerado para alimentos fortificados. Trata-se do aproveitamento do nutriente específico contido no alimento, tomando como referência o conteúdo total. No caso da adição de minerais, é importante ressaltar que os dados referentes à biodisponibilidade de um sal não podem ser extrapolados para outro. Como exemplo temos o caso do ferro, que quando usado na forma de sulfato ferroso tem um valor biológico muito superior ao do ferro reduzido (RUSIG, 1994). Além disso é necessário atentar para outros requisitos das fontes de minerais usados para fortificação como: pureza, reatividade específica, cor, custo, teor do mineral presente no composto, solubilidade em água ou em algum outro meio de interesse, sabor e odor. Essas características podem orientar a tecnologia de fortificação e ajudar a garantir um alimento com os níveis adequados do nutriente adicionado (CARVALHO, 1994; RUSIG, 1994).

O mesmo também pode ser estendido para a fortificação com vitaminas, que devem ter sua estabilidade garantida observando-se fatores como sensibilidade a fatores físicos (luz, temperatura, umidade), fatores químicos

(reatividade específica, pH, estado de oxidação), pureza e solubilidade (RUSIG, 1994).

Para facilitar o processo industrial de adição de micronutrientes em alimentos, eles são misturados a uma substância inerte. Esse veículo inerte também precisa atender a determinadas condições, como: não alterar as características organolépticas do produto final (cor, sabor ou aroma), ser quimicamente estável, não ser higroscópico, ser encontrado com facilidade no mercado e ser resistente a contaminação microbiana (CARVALHO, 1994).

Para que um determinado alimento seja escolhido para servir à fortificação, ele deve atender a algumas características:

- Ser consumido regularmente pela população (incluindo idosos e crianças);
- A quantidade consumida não deve variar muito no dia-a-dia, nem de pessoa para pessoa;
- O produto deve apresentar um processo de fabricação regular;
- O nutriente adicionado deve ser compatível com o alimento ao qual é adicionado, não alterando suas características físicas como sabor e aroma;
- O processamento e estocagem do alimento não deve induzir a perdas consideráveis do nutriente adicionado.

2.1 FORTIFICAÇÃO DE CEREAIS

Desde tempos antigos os cereais sempre tiveram importante participação na alimentação humana. Isto se deve a fatores como a facilidade de conservação (bastando para isso conservá-los da umidade), variedade e produtividade. Além de serem alimentos de fácil industrialização, o que faz com que sejam, em geral, alimentos de baixo custo (SALINAS, 2002). Razões como estas fazem com que os cereais sejam amplamente consumidos pela população e por isso facilmente tornam-se opção de escolha para serem usados em programas de fortificação.

A comprovação de que defeitos do tubo neural poderiam ser prevenidos pela suplementação da dieta materna com ácido fólico, levou à adoção de medidas que visam à diminuição deste defeito congênito por meio da fortificação de alimentos.

Desde 1998 foi adotada a fortificação de produtos a base de cereais nos EUA, no nível de 140 μ g de ácido fólico para cada 100g de produto (NEUHOUSER; BERESFORD, 2001).

No Brasil um procedimento semelhante também foi adotado a partir da resolução RDC n^o 344 de dezembro de 2002, que tornou obrigatória a fortificação de farinha de milho e de trigo com ácido fólico e ferro. A proposta inicial tratava do enriquecimento de farinha com ferro, com o objetivo de combater a anemia ferropriva que, segundo estimativa do Ministério da Saúde atinge cerca de 45% das crianças até cinco anos de idade (aproximadamente 10 milhões de indivíduos) (UNICEF, 2006; BRASIL 2002). Durante o desenvolvimento desta proposta a AACD (Associação de Assistência à Criança Defeituosa) enviou sugestão à ANVISA para também incluir na legislação a obrigatoriedade do enriquecimento da farinha com ácido fólico, devido a sua ação comprovada na diminuição da ocorrência de defeitos do tubo neural, que no Brasil afetam cerca de 3 em cada 1000 nascimentos (OTTO; OTTO; PESSOA 2004).

A fortificação de farinha de milho e trigo com ácido fólico tem o objetivo de alcançar o maior número possível de mulheres em idade fértil, e esta proposta é importante a partir do momento em que se sabe que muitas gestações não são planejadas, e que a formação do tubo neural no embrião ocorre cerca de 22-28 dias após a concepção, período em que grande parte das mulheres ainda não sabe que está grávida (JORDE, 2004). A fortificação estaria assim, fornecendo um aumento na ingestão de ácido fólico no período crítico para a formação do tubo neural.

3 ÁCIDO FÓLICO

O nome ácido fólico foi sugerido por Mitchell e colaboradores em 1941 (fólico = *folium*, do latim, que significa folha), após isolá-lo de vegetais folhosos (GOODMAN & GILMAN, 2003; RANG, DALE & RITTER, 1997).

Trata-se de uma vitamina hidrossolúvel e o termo designa a molécula formada por um anel de pteridina ligado ao ácido p-aminobenzóico, que está unido a um ou mais resíduos de ácido glutâmico, de acordo com a figura II.1.

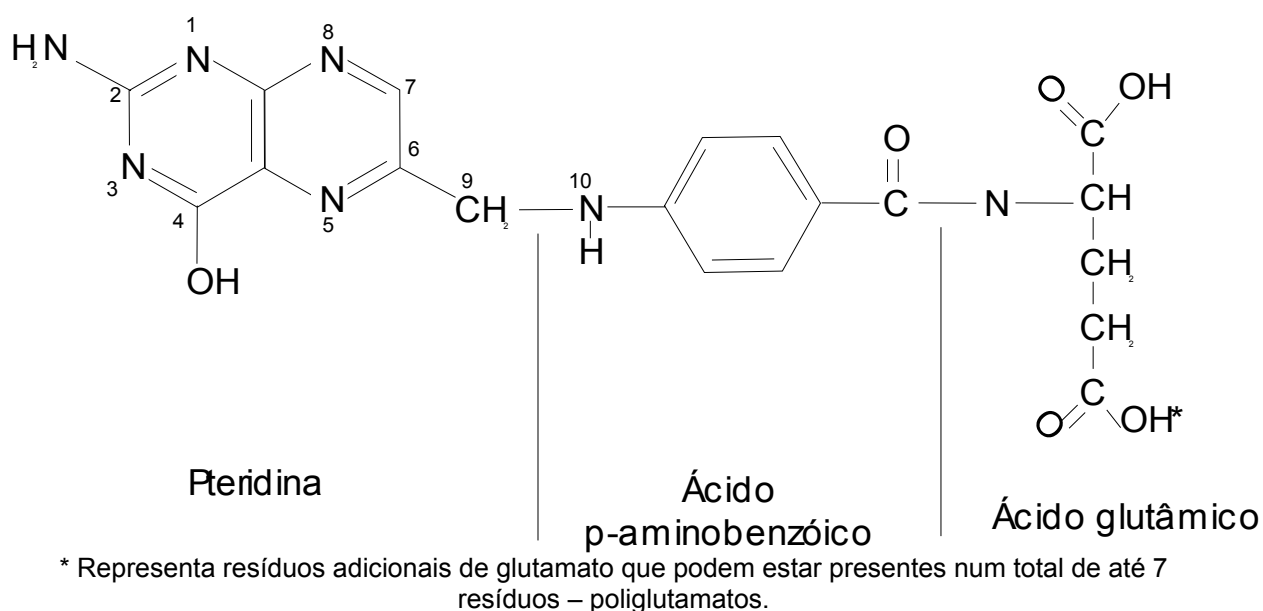


Figura II.1 – Estrutura química do ácido fólico (GOODMAN & GILMAN, 2003)

O ácido fólico, também conhecido por ácido pteroilglutâmico, é o composto padrão do grupo dos folatos e a forma usada nas preparações farmacêuticas. Porém não é a forma que ocorre nos alimentos, nestes a principal forma de folato são os poliglutamatos (GOODMAN & GILMAN, 2003; RANG, DALE, RITTER, 1997).

O ácido fólico apresenta-se como pó amarelo ou amarelo-alaranjado, inodoro, insípido e ligeiramente hidrossolúvel (KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1998).

O ácido pteroilglutâmico pode sofrer redução e apresentar três estados de oxidação diferentes no anel de pteridina, conforme demonstrado pela figura II.2.

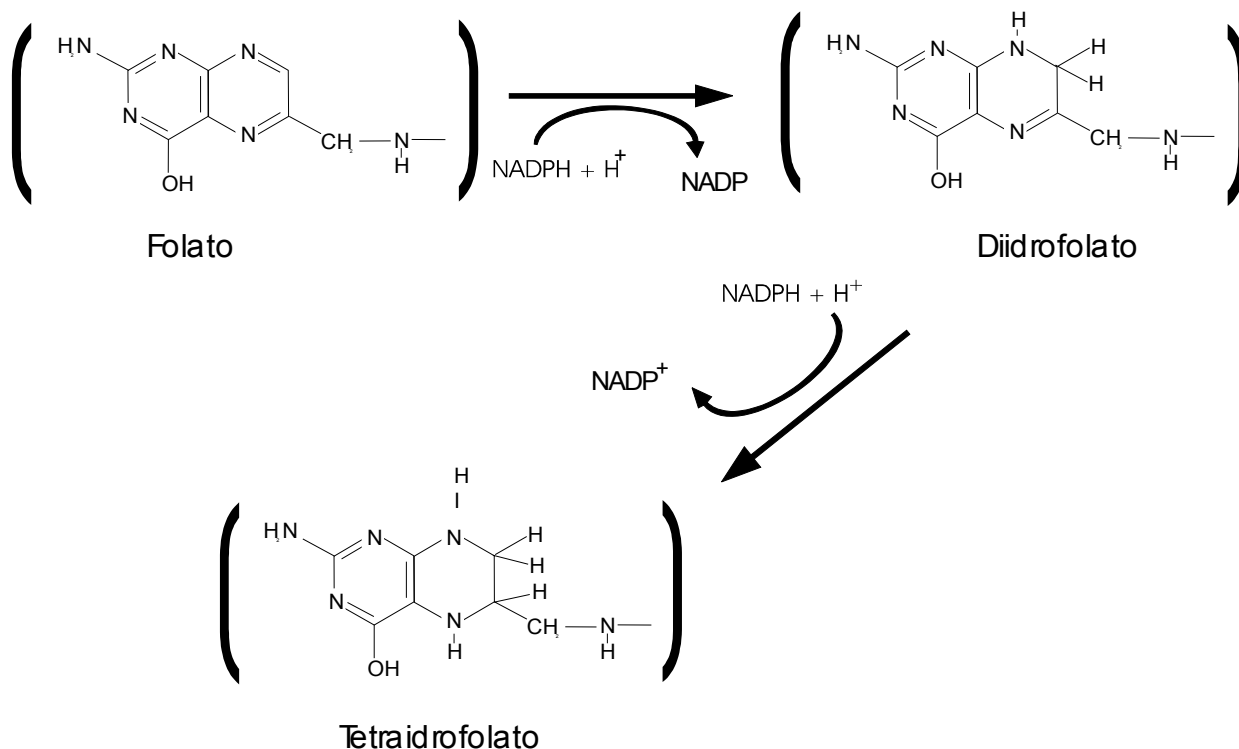


Figura II.2 – Estados de oxidação do ácido fólico (DONNELLY, 2001)

A partir do ácido fólico, considerado o composto padrão deste grupo, são formados o diidrofolato e o tetraidrofolato. Nesta última molécula são realizadas substituições que originam os outros congêneres que compõe o grupo dos folatos.

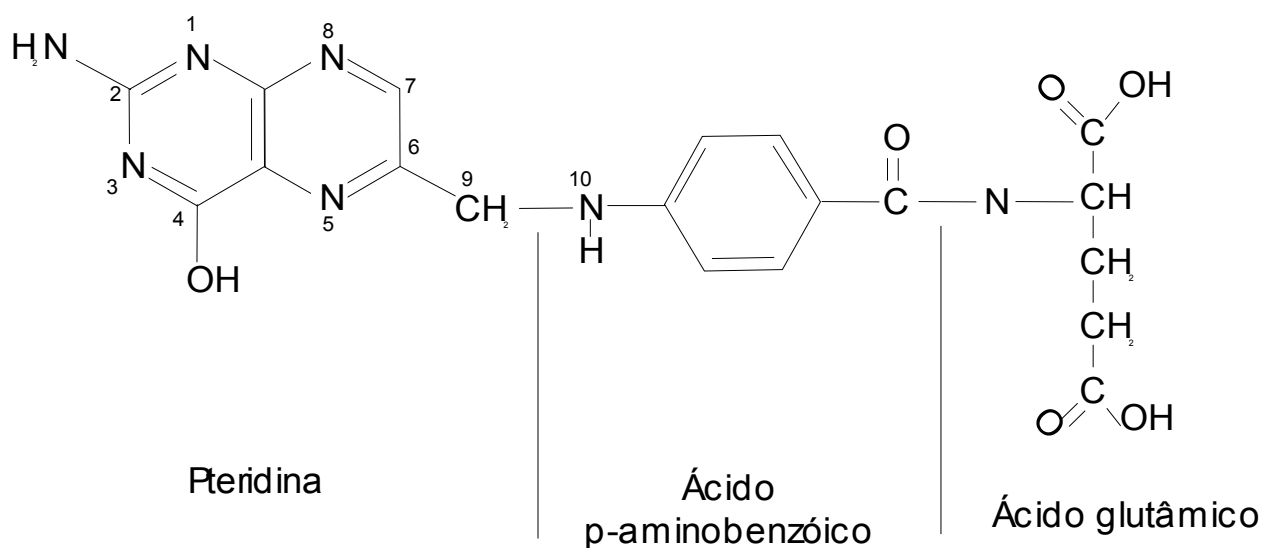


Figura II.3 – Estrutura e nomenclatura do ácido fólico e seus congêneres (GOODMAN & GILMAN, 2003)

Posição	Radical	Congêneres	Composto
N7, N8	H	H ₂ PteGlu	Diidrofolato
N5, N6, N7, N8	H	H ₄ PteGlu	Tetraidrofolato
N5	- CH ₃	CH ₃ H ₄ PteGlu	Metiltetraidrofolato
N5	- CHO	5-CHOH ₄ PteGlu	Ácido folínico
N10	- CHO	10-CHOH ₄ PteGlu	10-formiltetraidrofolato
N5-10	= CH -	5,10-CHH ₄ PteGlu	5-10-meteniltetraidrofolato
N5-10	- CH ₂	5,10-CH ₂ H ₄ PteGlu	5-10- metilenotetraidrofolato
N5	- CHNH	CHNHH ₄ PteGlu	Formiminotetraidrofolato
N10	- CH ₂ OH	CH ₂ OHH ₄ PteGlu	Hidroximetiltetraidrofolato

3.1 ESTABILIDADE

O ácido fólico é praticamente insolúvel em solventes como acetona, clorofórmio e éter. Dissolve-se rapidamente em soluções alcalinas de hidróxidos e carbonatos (PARFITT, 1999). As soluções aquosas de ácido são estáveis ao ar e podem ser esterilizadas por autoclavagem (KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1998).

O ácido fólico costuma ter boa retenção durante o processo de produção e estocagem de alimentos fortificados e mixes, ocorrendo pouca degradação desta vitamina quando estocada em baixa umidade (FENNEMA, 1996).

O principal fator de perda de folatos em alimentos é a forma de preparo, principalmente pela extração da vitamina quando os alimentos são preparados em meio aquoso (LIMA, 2001; FENNEMA, 1996).

Além da extração pelo meio aquoso, a forma de folato presente e a natureza química do alimento (presença de oxidantes, íons, catalisadores) influenciam no processo de perda de folatos, fazendo deste, um processo difícil de ser devidamente predito.

Ao se avaliar a estabilidade, são realizados estudos com condições controladas (pH, concentração de oxigênio, temperatura) que têm como objetivo comparar o comportamento dos folatos. No entanto, em meios complexos como é o caso dos alimentos, são poucas as informações.

A estabilidade dos folatos é regida pela natureza química do anel de pteridina, sem ser influenciada pela cadeia de poliglutamatos. Por isso o ácido fólico que representa a forma mais oxidada do anel de pteridina, é considerado o congênere mais estável, em contrapartida o tetraidrofolato, que é a forma mais reduzida do anel de pteridina, é considerado a forma mais instável do grupo dos folatos. Quando o tetraidrofolato é substituído na posição N5, ele apresenta estabilidade bem maior que as formas não substituídas, principalmente no que se refere à oxidação.

O ácido fólico é considerado a forma mais estável de folato, sendo resistente a oxidação, e em um estudo é sugerida atividade antioxidante para este composto (JOSHI, 2001).

A taxa de oxidação de folatos depende da concentração de oxigênio presente no meio, por isso em condições anaeróbias ou na presença de compostos

como o ácido ascórbico, íons ferro II, a estabilidade do ácido fólico é melhorada (LIMA, 2001; FENNEMA, 1996; LUCOCK 1995).

Embora a literatura cite a luz como um fator que pode causar a clivagem dos folatos, o mecanismo pelo qual esse processo ocorre não está esclarecido (PARFITT, 1999; SILVA, 1998; FENNEMA, 1996).

O ácido fólico não tem ponto de fusão estabelecido, mas as alterações na molécula são observadas em temperatura acima de 140-148°C, que culmina com a carbonização do composto à 250-262°C (VORA et al, 2002; BOBBIO, BOBBIO, 1992).

3.2 FONTES E DOSES RECOMENDADAS

Os folatos estão presentes em alimentos como: vegetais verdes frescos, feijões, trigo integral, fígado e levedura, onde são encontrados na forma de poliglutamatos (PRODUTOS ROCHE, 2006; GOODMAN & GILMAN, 2003; SILVA, 1998; RANG, DALE, RITTER, 1997).

A dieta americana fornece de 50 a 500µg por dia de folatos, enquanto a dieta da Europa Ocidental fornece cerca de 600µg por dia. Porém indivíduos que tenham elevado consumo de vegetais verdes frescos e carne podem ingerir até 2mg/dia (GOODMAN & GILMAN, 2003; RANG, DALE, RITTER, 1997).

A ingestão diária recomendada de folato para adultos é de 400µg, conforme demonstrado na tabela II.1. No caso de gravidez a ingestão deve ser maior devido ao aumento da demanda provocado pelo feto, e durante a lactação há aumento da demanda devido a perda diária de até 50µg/dia de folato no leite materno (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Tabela II.1 – DRI (Ingestão Alimentar de Referência) para indivíduos, segundo a Food and Nutrition Board e o Institute of Medicine, da Academia Nacional de Ciência dos EUA.

Estágio da vida	Cálcio (mg/d)	Fósforo (mg/d)	Magnésio (mg/d)	Vitamina D (µg/d) ^{a,b}	Fluoreto (mg/d)	Tiamina (mg/d)	Riboflavina (mg/d)	Niacina (mg/d) ^c	Vitamina B ₆ (mg/d)	Folato (µg/d) ^d	Vitamina B ₁₂ (µg/d)
Bebês											
0-6 m	210*	100*	30*	5*		0,2*	0,3*	2*	0,1*	65*	0,4*
7-12 m	270*	275*	75*	5*	0,01*	0,3*	0,4*	4*	0,3*	80*	0,5*
Crianças											
1-3 a	500*	460	80	5*	0,7*	0,5	0,5	6	0,5	150	0,9
4-8 a	800*	500	130	5*	1*	0,6	0,6	8	0,6	200	1,2
Homens											
9-13 a	1300*	1250	240	5*	2*	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8
14-18 a	1300*	1250	410	5*	3*	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4
19-30 a	1000*	700	400	5*	4*	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4
31-50 a	1000*	700	420	5*	4*	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4
51-70 a	1200*	700	420	10*	4*	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4^e
> 70 a	1200*	700	420	15*	4*	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4^e
Mulheres											
9-13 a	1300*	1250	240	5*	2*	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8
14-18 a	1300*	1250	360	5*	3*	1,0	1,0	14	1,2	400^b	2,4
19-30 a	1000*	700	310	5*	3*	1,1	1,1	14	1,3	400^b	2,4
31-50 a	1000*	700	320	5*	3*	1,1	1,1	14	1,3	400^b	2,4
51-70 a	1200*	700	320	10*	3*	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4^e
> 70 a	1200*	700	320	15*	3*	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4^e
Gestantes											
≤ 18 a	1300*	1250	400	5*	3*	1,4	1,4	18	1,9	600^f	2,6
19-30 a	1000*	700	350	5*	3*	1,4	1,4	18	1,9	600^f	2,6
31-50 a	1000*	700	360	5*	3*	1,4	1,4	18	1,9	600^f	2,6
Lactantes											
≤ 18 a	1300*	1250	360	5*	3*	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8
19-30 a	1000*	700	310	5*	3*	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8
31-50 a	1000*	700	320	5*	3*	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8

Fonte: AMAYA – FARFAN, DOMENE, PADOVANI, 2001.

Valores das RDAs aparecem em **negrito** e os de Ingestão Adequada (AIs) em fonte normal, seguidas de asterisco (*).

d: como equivalentes de folato alimentar (DFE). 1DFE = 1 µg de folato alimentar ou 0,6 µg de ácido fólico de alimento fortificado ou suplemento em cápsulas consumido com uma refeição, ou = 0,5 µg do suplemento consumido com o estômago vazio.

h: devido ao risco de defeitos no tubo neural por deficiência de folato, recomenda-se que toda mulher em condições de engravidar consuma 400 µg/d por alimentos fortificados ou suplementos, além do folato dietético.

i: supõe-se que a mulher continuará consumindo 400 µg/d de folato através de alimentos fortificados ou suplementos até a confirmação da gravidez e entrará em cuidados pré-natais posteriores ao período periconcepcional, sendo essa a época crítica para a formação do tubo neural no embrião.

3.3 METABOLISMO

Os seres humanos não são capazes de sintetizar folato, nem de estocar quantidades apreciáveis da vitamina, por isso precisam adquiri-la da dieta (DONNELLY, 2001). Quando há pouca ingestão de folatos pode surgir um estado de

deficiência dentro de uma a quatro semanas, dependendo dos hábitos alimentares e das reservas que o indivíduo tem (GOODMAN & GILMAN, 2003).

A absorção de folato ocorre na porção proximal do intestino delgado e ela pode ser afetada por fatores como distúrbios gastrointestinais ou medicamentos como sulfas, que inibem a absorção (DONNELLY, 2001; KOROLKOVAS, DE FRANÇA, 2001).

Os folatos encontrados nos alimentos apresentam-se, na grande maioria, na forma de poliglutamatos, que são convertidos em monoglutamatos antes da absorção (RANG, DALE, RITTER, 1997).

A biodisponibilidade de folatos na forma de poliglutamatos é de cerca de 70% em relação as formas monoglutâmicas, sendo que a desconjugação intestinal é a etapa limitante da biodisponibilidade de folatos. A biodisponibilidade de ácido fólico adicionado em alimento à base de cereais é de cerca de 30 a 60%. Fatores responsáveis pela biodisponibilidade incompleta são a matriz alimentícia, possível degradação das formas tetraidrofolato no meio gástrico e conversão enzimática incompleta da forma poliglutamato para monoglutamato (FENNEMA, 1996).

Depois de absorvido, o folato sofre redução por ação da enzima diidrofolato redutase intestinal, sendo convertido em metiltetraidrofolato; nesta forma ele é transportado pela circulação sanguínea, ligado a proteínas plasmáticas (RANG, DALE, RITTER, 1997). O fígado reduz e metila ativamente o ácido fólico (e diidrofolato ou tetraidrofolato) e a seguir transporta o metiltetraidrofolato até à bile para reabsorção pelo intestino e subsequente suprimento para os tecidos. Os alimentos e o ciclo enteroepático da vitamina mantêm um suprimento constante de metiltetraidrofolato (GOODMAN & GILMAN, 2003). O fígado é o principal local de armazenamento de folatos, onde são encontrados na forma de poliglutamatos (PARFITT, 1999). Os metabólitos dos folatos são eliminados pela urina e quando há excesso de folato no organismo, este é eliminado inalterado pela urina (GOODMAN & GILMAN, 2003).

3.4 FUNÇÕES

Cada um dos congêneres do ácido fólico desempenha um papel específico no metabolismo intracelular, os quais são resumidos na figura II.4.:

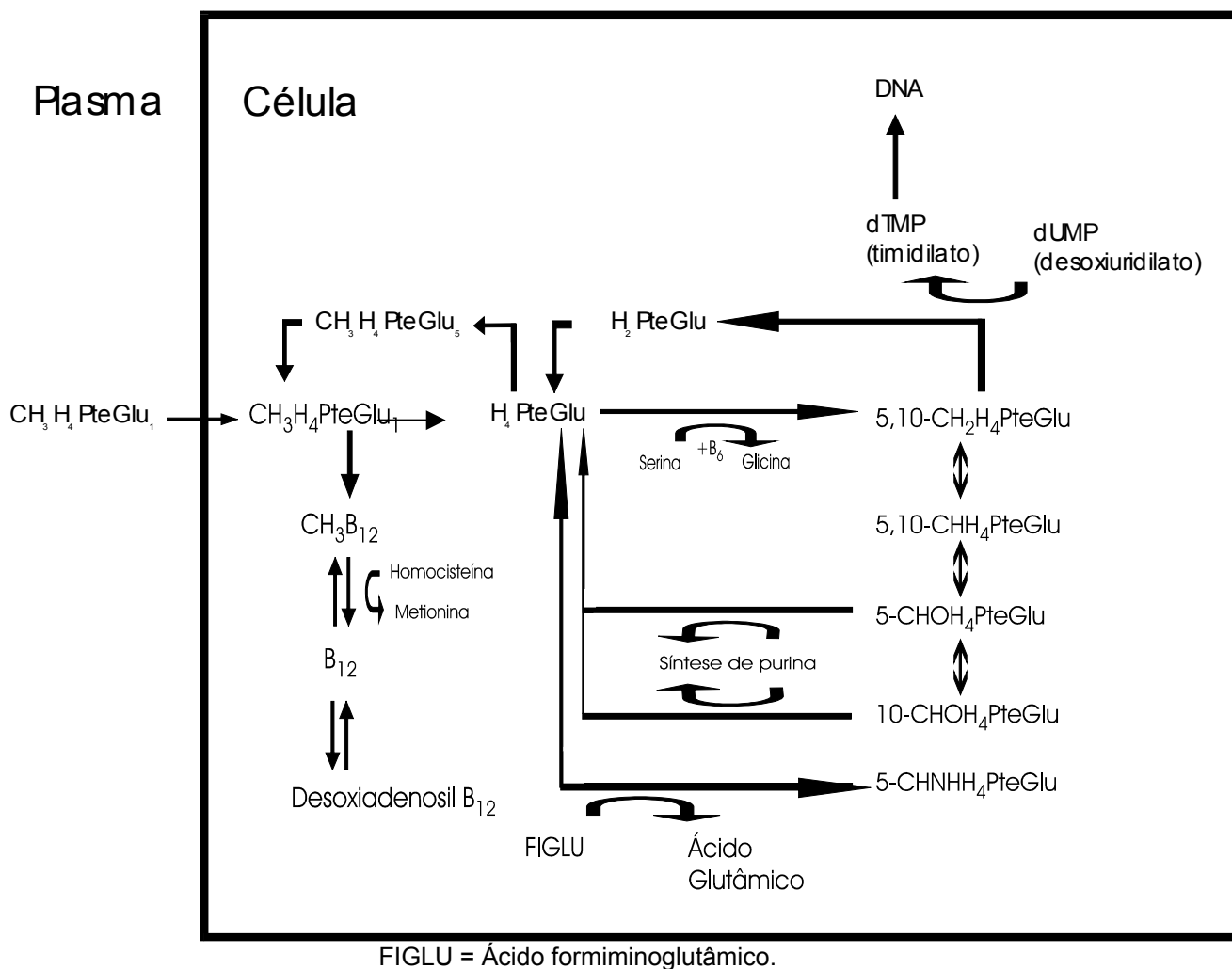
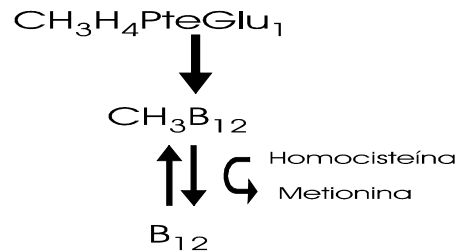


Figura II.4 – Inter- relações e funções metabólicas do ácido fólico e seus derivados (GOODMAN & GILMAN, 2003).

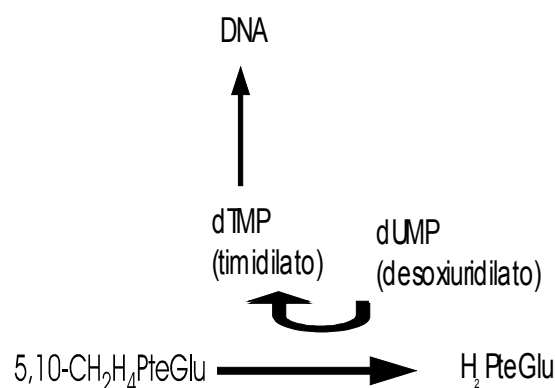
1. Conversão da homocisteína em metionina: essa reação requer metiltetraidrofolato como doador de um grupo metil e utiliza vitamina B₁₂ como cofator.



2. Conversão da serina em glicina: essa reação requer tetraidrofolato como acceptor de um grupo metileno da serina e utiliza o fosfato de piridoxal como cofator. Resulta na formação de 5,10-metilenotetraidrofolato, uma coenzima essencial para a síntese de timidilato.



3. Síntese de timidilato: o 5,10-metilenotetraidrofolato doa um grupo metileno e equivalentes redutores ao desoxiuridilato para a síntese de timidilato. Esta etapa limita a velocidade da síntese de DNA.



4. Metabolismo da histidina: o tetraidrofolato também atua como acceptor de um grupo formimino na conversão de um ácido formiminoglutâmico em ácido glutâmico.



5. Síntese de purinas: duas etapas na síntese de nucleotídios de purina exigem a participação de derivados do ácido fólico. O ribonucleotídio glicinamida é formilado pelo meteniltetraidrofolato; o ribonucleotídio 5-aminoimidazol-4-carboxamida é formilado pelo 10-formiltetraidrofolato. Através dessas reações, átomos de carbono são incorporados ao anel de purina em formação.

3.5 RELAÇÃO ENTRE ÁCIDO FÓLICO E VITAMINA B₁₂

O metiltetraidrofolato é o principal congênere de folato que é fornecido às células, e é essencial que o grupo metil, que a ele pertence, seja transferido para a cobalamina (vitamina B₁₂) para que se forme o tetraidrofolato, que é a forma ativa dos folatos e o substrato de várias etapas metabólicas intracelulares. O tetraidrofolato participa da conversão de serina em glicina com formação de 5,10-metilenotetraidrofolato, que participa da síntese de timidilato (GOODMAN & GILMAN, 2003; DONNELLY, 2001). Na síntese de timidilato o 5,10-metilenotetraidrofolato é convertido em diidrofolato, que é então reduzido a tetraidrofolato, completando um dos ciclos do metabolismo intracelular dos folatos. Este ciclo é essencial para a síntese de DNA.

Quando há deficiência de vitamina B₁₂ o metiltetraidrofolato não pode passar para a forma de tetraidrofolato devido à ausência de vitamina B₁₂ suficiente para captar o grupo metil. Desta forma as etapas seguintes no metabolismo do folato, que exigem tetraidrofolato, ficam prejudicadas.

Este processo é a base comum para o desenvolvimento de anemia megaloblástica quando há deficiência de vitamina B₁₂ ou ácido fólico (GOODMAN & GILMAN, 2003; RANG, DALE, RITTER, 1997). É importante determinar se uma anemia megaloblástica é resultado da deficiência de folato ou vitamina B₁₂, porque no caso de ser uma deficiência de vitamina B₁₂, e a anemia for tratada com ácido fólico, pode haver uma melhora no quadro hematológico, porém com agravamento de lesões neurológicas, que são típicas quando há deficiência de vitamina B₁₂ (GOODMAN & GILMAN, 2003; RANG, DALE, RITTER, 1997).

3.6 DEFICIÊNCIA DE FOLATO

A deficiência de folato pode ser causada por alguns fatores como:

- ◆ Ingestão insuficiente causada por alimentação inadequada (PARFITT, 1999; GOODMAN & GILMAN, 2003);
- ◆ Problemas na absorção, uma situação comum no caso de doenças do intestino delgado e que leva não somente à deficiência na absorção do folato alimentar, como também interfere na recirculação do folato pelo ciclo enteroepático (GOODMAN & GILMAN, 2003);
- ◆ Aumento no requerimento diário, como no caso de gravidez e lactação (PARFITT, 1999);
- ◆ Administração de antagonistas de folato ou outras drogas que interferem no metabolismo normal do folato – fármacos como o metotrexato e trimetoprima que atuam como antagonistas de folato inibindo a diidrofolato redutase, enzima que reduz o ácido fólico da dieta em tetraidrofolato e também reduz o diidrofolato para a forma tetraidrofolato (GOODMAN & GILMAN, 2003; PARFITT, 1999; RANG, DALE, RITTER, 1997).
- ◆ Anticonvulsivantes e anticoncepcionais orais podem interferir na absorção e armazenamento de folato nos tecidos. Sulfas, incluindo a sulfassalazina, inibem a absorção de ácido fólico (KOROLKOVAS, DE FRANÇA, 2001; FUCHS, WANNAMACHER, 1998).
- ◆ Aumento nas perdas de folato no organismo, é o caso de pessoas que fazem hemodiálise (PRODUTOS ROCHE, 2006; PARFITT, 1999).

Devido a sua participação na síntese de DNA, os efeitos da deficiência de folato são percebidos principalmente em tecidos onde há altas taxas de replicação celular, como as células do trato gastrointestinal e células do sistema hematopoiético (GOODMAN & GILMAN, 2003; PARFITT, 1999; RANG, DALE, RITTER, 1997).

A anemia megaloblástica, doença na qual a medula óssea produz glóbulos vermelhos gigantes e imaturos, pode surgir pela deficiência de folato dentro de 10 a 12 semanas. No entanto, ela não pode ser diferenciada da anemia causada pela deficiência de vitamina B₁₂, devido a via comum das duas vitaminas no metabolismo intracelular. Porém quando a anemia é causada pela deficiência de folato, não se encontra associação com anormalidades neurológicas (PRODUTOS ROCHE, 2006; GOODMAN & GILMAN, 2003).

A deficiência de folato pode resultar em níveis plasmáticos elevados de homocisteína, que é um fator de risco independente para doenças do coração. Isso se deve ao papel do folato na conversão de homocisteína em metionina, fato que tem sido alvo de maior atenção (GOODMAN & GILMAN, 2003; PARFITT, 1999).

A deficiência de folato também está envolvida na ocorrência de defeitos do tubo neural, que incluem a espinha bífida e a anencefalia (FINGLAS, 2005). A espinha bífida ocorre quando há um defeito no fechamento do tubo neural, este processo começa na extremidade cefálica e segue na direção caudal, completando-se no final do primeiro mês de gestação. Falhas que ocorrem no fechamento na região cefálica resultam em anencefalia, que é a ausência, parcial ou total, de cérebro. Nestes casos cerca de dois terços dos bebês são prematuros, e sobrevivem apenas alguns dias. Quando acontece uma falha no fechamento na região média ou na extremidade caudal há a ocorrência de espinha bífida, que é o defeito mais freqüente e consiste na projeção do tecido espinhal através da coluna vertebral (geralmente inclui meninges, coluna espinhal e raízes de nervos). Em pacientes com espinha bífida também são observados freqüentemente fraqueza muscular, paralisia nos membros inferiores e retardo mental (JORDE, 2004; BARBER et al, 1999; PARFIT, 1999).

Estudos revelam que mulheres que tiveram sua dieta suplementada com ácido fólico no período periconcepcional, demonstraram a diminuição em até 60% da ocorrência de defeitos do tubo neural (NEUHOUSER, BERESFORD, 2001; BARBER et al, 1999; PARFIT, 1999; WERLER, SHAPIRO, MITCHELL, 1993). Nos

casos de prevenção da recorrência, pode haver uma diminuição de até 70% destes defeitos (JORDE, 2004; CZEIZEL, DUDÁS, 1992).

3.7 RECOMENDAÇÕES SOBRE O USO DE ÁCIDO FÓLICO

O mecanismo pelo qual o ácido fólico exerce ação protetora contra defeitos no tubo neural ainda não está claro, mas estima-se que aproximadamente 50 a 70% dos defeitos no tubo neural possam ser evitados pela suplementação dietética com ácido fólico (JORDE, 2004; PARFITT, 1999). Diante destes resultados o Center for Disease Control publicou duas recomendações a respeito do uso de folato: 1) todas as mulheres que tiveram uma criança afetada por defeito no tubo neural devem ingerir 4mg/dia de ácido fólico, caso estejam planejando uma nova gravidez; 2) todas as mulheres em idade reprodutiva devem ingerir 0,4mg/dia de ácido fólico ao longo de sua vida reprodutiva (JORDE, 2004; MRC, 1991).

É importante lembrar que a suplementação pré-natal tradicional não tem efeito sobre a prevenção de DTN porque sua administração, geralmente, começa depois do período em que ocorre o fechamento do tubo neural. Por isso, o serviço de saúde pública dos EUA implantou o programa de fortificação de cereais com ácido fólico, com a intenção de aumentar a ingestão desta vitamina. No Brasil também foi realizado um programa semelhante, que estabeleceu a fortificação obrigatória de farinha de milho e de trigo com ácido fólico (150 μ g/100g) e ferro (4,2mg/100g). Esta resolução está em vigor desde junho de 2004 (BRASIL, 2002).

3.8 UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA

O ácido fólico encontra-se disponível em preparações para uso oral (comprimidos e gotas), sozinho ou em combinação com outras vitaminas (ácido ascórbico) ou minerais (ferro) (KOROLKOVAS, DE FRANÇA, 2001; PRODUTOS ROCHE, 2006).

O ácido fólico oral não demonstrou ser tóxico nem mesmo em altas doses como 15mg/dia. Porém quando administrado em altas doses no tratamento de anemia megaloblástica, pode ter o efeito de aparente melhora da doença mas encobrendo a deficiência de vitamina B₁₂. Por isso é importante que o indivíduo seja devidamente avaliado para se determinar a verdadeira causa da anemia.

O uso terapêutico do ácido fólico deve ser limitado à prevenção e tratamento de estados de deficiência da vitamina. Em situações em que há grande risco de deficiência, é recomendada a suplementação com 400 a 500µg/dia. Este é o caso de mulheres que planejam uma gravidez, ou já estão grávidas, ou em período de lactação. A suplementação também é indicada para indivíduos submetidos a nutrição parenteral, visto que as reservas desta vitamina no fígado são limitadas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Além do ácido fólico também é usado um derivado chamado ácido folínico (conhecido como leucovorina) que corresponde ao 5-formiltetraidrofolato. Ele é usado principalmente como antídoto para antagonistas do ácido fólico, como metotrexato (droga que bloqueia a conversão de ácido fólico em tetraidrofolato por meio da inibição da enzima diidrofolato redutase) (PRODUTOS ROCHE, 2006; PARFITT, 1999).

4 MILHO

4.1 IMPORTÂNCIA NA DIETA

O milho é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo, pois ele é fácil de ser plantado e colhido. Existem aproximadamente 150 espécies de milho com variação no formato dos grãos e na cor (ABIMILHO, 2004).

O milho possui aproximadamente 360Kcal em cada 100 gramas, sendo aproximadamente 70% de glicídios, 10% de proteínas e 4% de lipídios (ABIMILHO, 2004; SALINAS, 2002; POTTER, HOTCHKISS, 1999). A composição nutricional de farinha de milho é demonstrada na tabela II.2.

Tabela II.2 – Informação nutricional da farinha de milho

Informação nutricional		
	Quantidade por porção (50g)	%VD
Valor calórico	180Kcal	7%
Carboidratos	40g	11%
Proteínas	5g	10%
Gorduras totais	1g	1%
Gorduras saturadas	0,0g	0%
Colesterol	0,0g	0%
Fibra alimentar	0,0g	0%
Cálcio	10mg	1%
Sódio	15mg	1%

%VD = valores diários de referência com base em uma dieta de 2.500calorias.

Fonte: ABIMILHO, 2004

O grão de milho, quando cortado na vertical, revela seus componentes básicos, conforme ilustrado na figura II.5.

- **Endosperma** - corresponde à maior parte do grão de milho e é composto basicamente de amido (quase 61%), além de outros 7% de glúten que envolve os grânulos de amido e de pequena porcentagem de gordura e demais componentes.

- **Película** - é a parte que recobre o grão. Devidamente processada, ela é empregada como ingrediente em rações animais.
- **Gérmen** - é a parte vegetativa do grão e fonte de óleo do milho. O gérmen é um componente importante para alimentos e aplicações industriais (ABIMILHO, 2004).

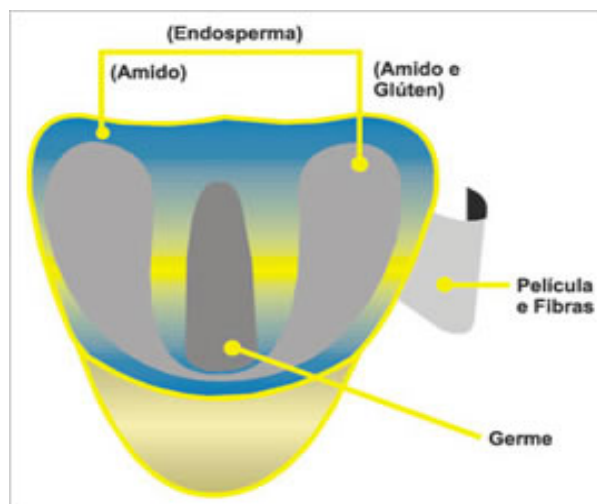


Figura II.5 – Esquema do grão de milho

4.2 PROCESSOS

A industrialização de milho é feita através de dois processos: a seco e a úmido (ABIMILHO, 2004; POTTER, HOTCHKISS, 1999).

4.2.1 Processo a úmido

No processo a úmido, como demonstra a figura II.6., os grãos de milho após serem limpos e secos, são macerados em grandes tanques com água quente que contém, geralmente, como conservantes ácidos fracos e dióxido de enxofre. Os grãos passam por um moinho triturador que os rompe formando uma massa pastosa que é bombeada para tanques de sedimentação cheios de água.

Nestes tanques o gérmen, de menor densidade, flutua e é separado. A partir dele é extraído o óleo. A massa restante contém o farelo e as frações de proteínas e amido do endosperma. Estes são centrifugados em alta velocidade para que ocorra a separação do amido, que é mais pesado, da fração protéica que é mais leve. A fração de amido é seca para se produzir o amido de milho, que é usado em alguns alimentos manufaturados ou é convertido em xarope de milho por ação de ácido ou enzimas.

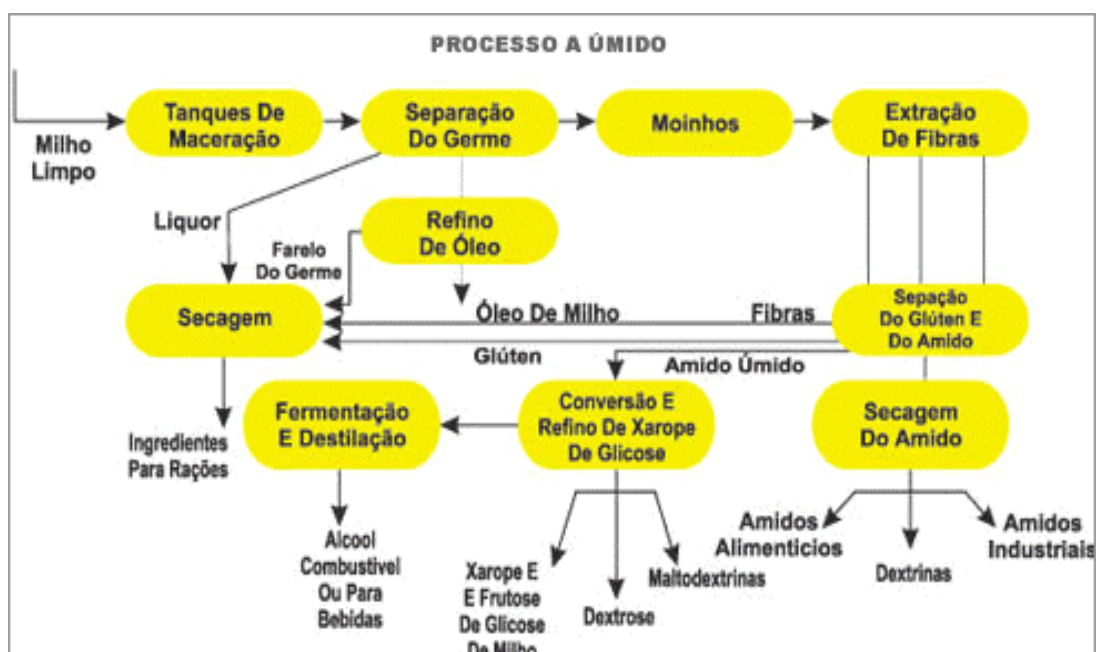


Figura II.6 – Esquema do processamento de milho a úmido.

4.2.2 Processo a seco

No processo a seco, conforme demonstra a figura II.7., os grãos de milho são primeiro armazenados em uma umidade de aproximadamente 21%. Depois passam por um par de rolos que separam o farelo, o gérmen e o endosperma. Estes são secos até uma umidade de aproximadamente 15% para facilitar a moagem seguinte e a passagem por peneiras. O farelo é eliminado por corrente de ar e o endosperma e o gérmen passam por um par de rolos, que esmagam o gérmen e trituram o endosperma que é mais quebradiço. O processo de

peneiramento separa o gérmen esmagado das partículas de endosperma que seguem para moagem.



Figura II.7 - Esquema do processamento de milho a seco.

O processo de moagem leva a uma redução gradual das partículas, que são trituradas em etapas sucessivas por meio de um sistema de cilindros. Cada etapa da trituração rende um produto composto por partículas grossas, medianas e finas. Essas partículas de diferentes tamanhos são selecionadas por peneiras, pois cada etapa de trituração é seguida por uma etapa de peneiramento. Assim, as partículas grossas de uma etapa anterior são separadas por peneiras e seguem para nova trituração. Esse processo leva a produtos com diferentes granulometrias como gritz (que é maior), semolina, fubá e creme de milho (com granulometrias menores) (NUTRIMILHO, 2006; SENAI, 2006; SALINAS, 2002).

5 FORTIFICAÇÃO DE FARINHA DE MILHO

O processo de adição de ácido fólico e ferro à farinha de milho deve ser feito com muito cuidado, pois consiste na adição de uma pequena quantidade de nutrientes em grandes quantidades de farinha.

5.1 MISTURA DE NUTRIENTES

A fortificação é realizada adicionando-se uma mistura de nutrientes na farinha. A mistura é constituída do nutriente desejado (neste caso, ácido fólico e ferro) e de um material inerte que é chamado de veículo (pode ser amido de milho ou de mandioca). Os nutrientes são adicionados a este veículo para que seu uso na fortificação seja facilitado (GERMANI, 2001; CARVALHO, 1994).

As empresas podem optar por adquirir uma mistura de nutrientes já pronta ou preparar a sua própria.

Para a elaboração desta mistura é preciso observar alguns fatores (GERMANI, 2001):

- ◆ a quantidade de nutrientes a ser adicionada deve ser ajustada de acordo com sua concentração na fonte. Exemplo:
O sulfato ferroso contém 32% de ferro em sua composição. Para obter 4,2mg deste mineral, a partir do sulfato ferroso, é preciso pesar 13,12mg do sal:
$$\begin{array}{r} 100\text{g} \text{ ----} 32\text{g} \\ x \text{ ----} 4,2\text{mg} \\ x = 13,12\text{mg} \end{array}$$
- ◆ agentes antiulectantes devem ser usados para evitar a formação de grumos que impedem o fluxo adequado da mistura no dosador. O fosfato tricálcico e o dióxido de sílica são exemplos de agentes antiulectantes usados.

- ◆ Devem ser usados veículos como o amido de milho ou mandioca, que são os mais indicados para esse tipo de preparação. O fubá não é indicado para ser usado no preparo da mistura por apresentar dificuldade de escoamento; isto interfere no fluxo do dosador e prejudica o processo de enriquecimento.

5.2 FONTES DE NUTRIENTES USADOS EM FORTIFICAÇÃO DE FARINHA DE MILHO

5.2.1 Ferro

As principais fontes de ferro usadas para enriquecimento de alimentos são: sulfato ferroso, fumarato ferroso, ferro elementar (ferro reduzido) (GERMANI, 2001; RUSIG, 1994).

Estas diferentes fontes de ferro apresentam características que influenciam no seu uso, as quais são resumidas na tabela II.3.

Tabela II.3 – Características das fontes de ferro usadas para fortificação de alimentos.

Fonte de ferro	Teor de ferro (%)	Biodisponibilidade relativa ao sulfato ferroso (100)	Custo do produto em relação ao teor de ferro (US\$/Kg Fe)	Cor	Gosto	Magnético
Sulfato ferroso (seco)	32	100	12,50	Bege	Ruim	Não
Fumarato de ferro	32	95	15,60	Vermelho escuro	Leve	Não
Ferro elementar (reduzido)	98	36	6,12	Preto	Não	Sim

Fonte: GERMANI, 2001; RUSIG, 1994.

Ao escolher a fonte de ferro é importante considerar alguns aspectos:

- ◆ Biodisponibilidade: é a proporção do ingrediente ingerido disponível para o processo metabólico, e varia para cada tipo de ferro. O sulfato e o fumarato ferroso têm uma boa biodisponibilidade, enquanto o ferro elementar tem biodisponibilidade mais baixa. Este fator também varia de pessoa para pessoa, pois o alimento, a maneira como é processado e também a dieta do indivíduo, afetam a absorção dos diferentes tipos de ferro.
- ◆ Estabilidade: o sulfato e o fumarato ferroso são considerados pró-oxidantes que podem acelerar o processo de rancificação de gorduras, e como o fubá possui pequenas quantidades de gordura, a adição destes sais pode diminuir a validade deste produto. O ferro elementar não apresenta este problema, sendo recomendado o seu uso para fortificação neste derivado de milho.
- ◆ Cor: o sulfato ferroso não provoca alteração na cor do fubá mas pode causar alterações na cor dos produtos que são elaborados com ele. O ferro elementar não provoca alterações de cor em fubá.
- ◆ Granulometria: as fontes de ferro devem ter um tamanho de partícula fina para não ocasionar nenhum problema na aparência do produto final. O sulfato ferroso na forma heptaidratado deve ser evitado pois seus cristais grandes prejudicam a homogeneização no fubá. O fumarato ferroso tem uma granulometria adequada, e para o ferro elementar é recomendável que tenha tamanho de 325 mesh (42 microns).
- ◆ Disponibilidade e custo: o ferro elementar é a fonte mais barata, seguida pelo sulfato ferroso.

5.2.2 Ácido fólico

O ácido fólico é o principal representante do grupo dos folatos e também é o composto escolhido para ser usado na fortificação, pois é considerado o

congênere mais estável em temperatura ambiente e elevada (LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004 (a); FENNEMA, 1996; BALL, 1994). Os derivados na forma de tetraidrofolato são extremamente susceptíveis à clivagem oxidativa, e íons como ferro III e cobre II catalisam a oxidação do tetraidrofolato (FENNEMA, 1996; BALL, 1994). A frágil estabilidade do tetraidrofolato frente a oxidação faz com que deixe de ser a melhor opção para uso em fortificação alimentar, apesar de ser a forma biologicamente ativa no organismo.

O ácido fólico fornecido por alimento fortificado é facilmente convertido em tetraidrofolato no organismo, assim, mesmo que o ácido fólico não seja a forma bioativa de folato, pode fornecer tetraidrofolato que é o congênere que participa de importantes reações intracelulares (GOODMAN & GILMAN, 2003; RANG, DALE, RITTER, 1997). Isto faz do ácido fólico o composto de escolha para uso na fortificação de alimentos, sendo aprovado pela legislação para este fim.

5.3 PROCESSO DE FORTIFICAÇÃO

A fortificação de farinha de milho pode ser feita por sistema contínuo, em que um equipamento denominado dosador ou alimentador é instalado na linha de produção. Neste equipamento é colocado a mistura que é despejada diretamente no fluxo da farinha, que é carregada por transporte mecânico. Esta segue para a etapa de embalagem do produto final. No processo de enriquecimento é importante cuidar da homogeneização, que é um ponto crítico neste processo, e ajustar a quantidade de mistura adicionada com o fluxo da farinha, para garantir os níveis adequados dos nutrientes no produto final. É comum executar a fortificação com uma sobredosagem para compensar perdas durante o processamento ou estocagem (CARVALHO, 1994).

A fortificação também pode ser feita por sistema não contínuo. Neste sistema é utilizado um misturador homogeneizador, onde a mistura de nutrientes e a farinha são colocadas nas devidas proporções e misturadas durante um tempo determinado (GERMANI, 2001).

5.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Para o controle de qualidade da fortificação recomenda-se a execução de análises dos nutrientes adicionados (GERMANI, 2001).

Para a determinação de ferro em farinha de milho recomenda-se o teste de mancha, no qual se faz uso de uma farinha padrão com diversos teores conhecidos de ferro que é comparada com a amostra a ser analisada. Este teste fornece uma análise semiquantitativa. Para análise quantitativa deve-se utilizar o método de espectrofotometria ou método de absorção atômica (GERMANI, 2001).

Embora a legislação obrigue a fortificação e exija qualidade neste processo, não chega a recomendar um método que possa ser usado para a análise de ácido fólico em farinha de milho. Neste caso pode-se recorrer a métodos oficiais como o descrito na AOAC método 992.05 (CUNNIFF, 1997) que trata da determinação de folatos.

6 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÁCIDO FÓLICO

6.1 MÉTODO MICROBIOLÓGICO

O primeiro método usado para a análise de ácido fólico foi um método microbiológico. Ele é considerado um método tradicional para esta análise e é usado ainda hoje. É recomendado pela AOAC como método para determinação de folatos. A técnica baseia-se no fato de que os folatos estimulam o desenvolvimento de bactérias dos gêneros *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium* e *Pediococcus cerevisiae* (LEENHEER, LAMBERT, NELIS, 1991). A principal vantagem é a sensibilidade de detecção. As diferenças no desenvolvimento do microrganismo são determinadas por medidas da turbidez. É preciso ter cuidado na execução da técnica pois ela pode sofrer a interferência de antibióticos ou substâncias que afetem o metabolismo dos folatos. Além disso o método tem como desvantagens o tempo requerido para a execução da análise e o fato de se tratar de um procedimento trabalhoso. Também deve ser considerado que os microrganismos não respondem da mesma maneira a todas as formas de folato, *Streptococcus faecium* e *Pediococcus cerevisiae* não são capazes de utilizar todas as formas de vitamina, mas o *Lactobacillus casei* é capaz de responder a todas as formas de folato (FENNEMA, 1996; LEENHEER, LAMBERT, NELIS, 1991). Porém estes microrganismos utilizam para seu metabolismo apenas as formas monoglutâmicas, ou seja, folatos com mais de um resíduo de ácido glutâmico não podem ser detectados, por isso é necessário que folatos poliglutamatos sejam convertidos em monoglutamatos antes de ser iniciada a análise (LEENHEER, LAMBERT, NELIS, 1991, LIM, 1986). Esta técnica permite a quantificação de folato total presente na amostra, mas não permite a diferenciação entre as diversas formas de folato; por isso é necessário o uso de outro método para a detecção individual de cada congêneres do grupo dos folatos.

6.2 MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Um método que tem se destacado na análise de vitaminas tem sido a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O estudo e desenvolvimento de técnicas de CLAE têm permitido a análise de ácido fólico e seus congêneres em alimentos. A CLAE permite a execução de uma análise mais rápida que a análise tradicional (microbiológica), e pode distinguir entre os diferentes folatos (CATHARINO, GODOY, LIMA, 2004; CATHARINO, GODOY, LIMA, 2002; FINGLAS, 1999; LIM, 1996; LUCOCK, 1995). Isto tem feito dela uma técnica promissora que tem despertado o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de métodos para a detecção de folatos.

Apesar das vantagens que tem sobre o método microbiológico para a determinação de folatos, a CLAE também apresenta desafios a serem superados. Estes desafios começam a partir da natureza da amostra que será analisada. Diversos alimentos, como derivados lácteos, carnes e cereais, têm sido analisados por meio da CLAE (CATHARINO, GODOY, LIMA, 2004; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004a; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004b; CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, GODOY, LIMA, 2002; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998), por isso existe uma grande variedade de métodos, pois cada pesquisador procura adequar a técnica à sua necessidade.

Na análise de folatos, é importante lembrar que, é preciso estabelecer qual a forma da vitamina que se deseja determinar (ácido fólico, diidrofolato, tetraidrofolato). Quando se trata da determinação de folatos naturalmente presentes em alimentos, a forma predominante é de folatos reduzidos (tetraidrofolatos), sendo que aproximadamente 80% destes, se apresentam como poliglutamatos (FINGLAS, 1999; FENNEMA, 1996). Nestes casos é comum o uso de enzimas que convertem os poliglutamatos em monoglutamatos, a fim de otimizar o processo de extração da vitamina (FINGLAS, 1999). No caso da análise de ácido fólico esta etapa não é necessária pois ele encontra-se na forma de monoglutamato, mas alguns autores recomendam o uso de α -amilase para hidrolisar o amido quando as amostras são cereais ou produtos derivados, pois o uso dessa enzima tem ajudado na extração do ácido fólico (FINGLAS, 1999; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998).

6.2.1 Extração

O processo de extração de ácido fólico geralmente é feito com soluções alcalinas (SILVA, 2005b; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004; CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003; CATHARINO, GODOY, 2001; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998), mas para folatos também pode ser feita a extração em meio ácido (FINGLAS, 1999).

É comum haver o uso de tampão e estes, podem ser tampão fosfato ou acetato (SILVA, 2005b; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004 (a) e (b); CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003; CATHARINO, GODOY, 2001; FINGLAS, 1999). Uma etapa que também pode ser incluída no processo de extração é o uso de banho de ultra-som que, segundo dados de Catharino, Visentainer e Godoy (2003), melhora o processo.

A solução de extração também pode ser adicionada de metanol ou acetonitrila, com o objetivo de otimizar esta etapa (SILVA, 2005b; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003).

6.2.2 Processo de limpeza

A limpeza do extrato tem como objetivo facilitar a identificação da substância de interesse e proporcionar uma maior vida útil para o equipamento, principalmente a coluna cromatográfica. O processo de limpeza pode ser feito por meio de extração em fase sólida, adição de ácido tricloroacético ou por filtração em membrana (CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003; FINGLAS, 1999; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998).

Na extração em fase sólida a amostra passa através de um cartucho que possui uma fase estacionária na qual a vitamina é adsorvida e outros componentes, que são interferentes, passam sem serem retidos. Esta é uma forma de separar a vitamina dos outros compostos da amostra e também promover sua concentração para análise. Após ser carregado com a amostra o cartucho passa por uma etapa de lavagem e por fim, por uma etapa de eluição que promove a remoção

e concentração do analito que está no adsorvente (CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, 2000; CIOLA, 1998; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998).

O processo de clarificação tem sido usado para limpeza do extrato, utilizando ácidos com o objetivo de precipitar outros componentes e deixando o composto de interesse no sobrenadante que é então filtrado (CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004).

6.2.3 Fase móvel

O sistema de eluição empregado para análise de ácido fólico pode ser isocrático (quando a composição da fase móvel se mantém durante toda a análise cromatográfica) ou por gradiente (quando a composição da fase móvel é alterada durante a análise) (CIOLA, 1998; LEENHEER, LAMBERT, NELIS, 1991; COLLINS, BRAGA, BONATO, 1990; GREGORY, DAY, RISTOW, 1982).

A fase móvel usada para análise de ácido fólico geralmente é composta por tampão acetato ou fosfato, acompanhado de acetonitrila ou metanol (SILVA, 2005b; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004a; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004b; CATHARINO, GODOY, 2003; LIMA, 2001; CATHARINO, 2000; FINGLAS, 1999; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998).

6.2.4 Fase estacionária

Parece haver uma concordância entre diversos autores a respeito da fase estacionária usada para análise de ácido fólico, sendo que a grande maioria dos trabalhos utiliza colunas de fase reversa C₁₈ – octadecilsilica, que corresponde à sílica ligada a grupos constituídos por cadeias de 18 átomos de carbono (LIMA, 2001; CATHARINO, GODOY, LIMA, 2004; FINGLAS, 1999; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998; AKHTAR, KHAN, AHMAD, 1997; VATHERISTO et al, 1996).

Poucos trabalhos fazem uso de uma fase móvel que não seja C₁₈, mas podem ser encontrados métodos que usam C₈ (LEENHEER, 1991).

6.2.5 Detecção

Para detecção de ácido fólico em CLAE, costuma-se usar o sistema de detecção por UV (ultravioleta), em que o comprimento de onda usado pode variar de 254nm a 290nm, sendo que a detecção a 280nm é a mais utilizada (SILVA, 2005b; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004a; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004b; CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998; AKHTAR, KHAN, AHMAD, 1997; LIM, 1986).

6.2.6 Identificação

A identificação da vitamina nas amostras analisadas tem sido realizada por meio de comparação dos tempos de retenção obtidos com o padrão e com a amostra, ambos analisados sob as mesmas condições (CATHARINO, GODOY, LIMA 2004; CATHARINO, GODOY, 2003). A técnica de adição de padrão na amostra para confirmação do pico correspondente à vitamina, e a análise dos espectros de absorção obtidos em detector de arranjo de diodos, também têm sido usadas para identificação do ácido fólico (CATHARINO, GODOY, LIMA, 2004; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004a; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004b; CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003; VIÑAS, 2003; FINGLAS, 1999; LUCOCK, 1995).

6.2.7 Quantificação

A quantificação é feita por padronização externa. Neste processo são injetadas diferentes concentrações do analito e a partir destes dados é

construído um gráfico que relaciona a área, ou altura do pico, com a concentração de vitamina injetada (CATHARINO, GODOY, LIMA, 2004; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004a; LIMA, CATHARINO, GODOY, 2004b; CATHARINO, GODOY, 2003; CATHARINO, VISENTAINER, GODOY, 2003; VIÑAS, 2003; OSSEYI, WEHLING, ALBRECHT, 1998; AKHTAR, KHAN, AHMAD, 1997).

7 VALIDAÇÃO

A validação é um processo que estabelece, por estudos de laboratório, as características do desempenho de um método analítico que se pretende utilizar (USP 29, 2006). As características típicas que devem ser consideradas para validação de um método são: linearidade, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

7.1 LINEARIDADE

A linearidade de um método analítico se refere à capacidade de relacionar diretamente, ou por método matemático bem definido, a proporção da concentração do analito em uma amostra com o sinal obtido. Inicialmente pode ser estabelecida por exame visual gráfico que relaciona o sinal do equipamento em função da concentração do composto e, se for observada relação linear, os resultados podem ser submetidos a tratamento estatístico apropriado (cálculo de regressão linear) (USP 29, 2006).

7.2 EXATIDÃO

Refere-se à proximidade que os resultados obtidos pelo método testado têm do valor real. Pode ser calculada pela porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de um analito adicionado à amostra, ou como a diferença entre a média e o valor verdadeiro, com intervalos de confiança (USP 29, 2006).

7.3 PRECISÃO

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre os resultados individuais quando o método é aplicado a uma amostra repetidamente. A precisão geralmente é expressa como desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas (USP 29, 2006).

7.4 SELETIVIDADE

Trata-se da capacidade de determinar, sem erros, a presença do analito entre os componentes que podem estar presentes, como impurezas ou componentes da matriz. No caso de método cromatográfico, a seletividade pode ser verificada pela realização de co-cromatografia (adição de padrão na amostra) e também pela pureza do pico (usando detector de arranjo de diodos ou espectrometria de massa) (USP 29, 2006).

7.5 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção se refere a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado sob as condições experimentais. O limite de detecção é expresso geralmente como concentração do analito na amostra, e pode ser determinado pela análise de uma amostra com valor conhecido de concentração do componente que se deseja determinar. Pode ser aceito como sendo 3 vezes a variação do ruído do equipamento. Para o cálculo do limite de detecção também pode ser feita uma aproximação utilizando a inclinação da curva de calibração e a resposta do desvio padrão (USP 29, 2006).

7.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação é o menor nível do componente que pode ser analisado na matriz da amostra. É definido como a menor quantidade de analito na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais. É expresso como concentração do analito na amostra. Geralmente é aceito como sendo 10 vezes o sinal de ruído do equipamento, ou pode ser feita uma aproximação que depende da determinação da inclinação da curva de calibração e da resposta do desvio padrão. Podem ser utilizadas amostras preparadas com concentração próxima ao limite de quantificação (USP 29, 2006).

III OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

1.1 Avaliar a estabilidade físico-química do ácido fólico em farinha de milho fortificada, por um período de 4 meses.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Validar método de cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar ácido fólico em farinha de milho.

2.2 Avaliar a estabilidade do ácido fólico por meio da quantificação realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.3 Avaliar a estabilidade do ácido fólico presente em amostras enriquecidas com ácido fólico e também enriquecidas com mistura de ácido fólico e ferro (componente obrigatório para enriquecimento de farinha de milho, segundo legislação) em temperatura de 25°C e 35°C.

IV MATERIAL E MÉTODOS

1 MATERIAL

1.1 AMOSTRA

1.1.1 Preparo da mistura de nutrientes

Foram preparadas 4 misturas de nutrientes no laboratório de análise de micronutrientes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), sendo que três continham ácido fólico, ferro e excipientes e uma continha ácido fólico e excipientes. Na primeira mistura a fonte de ferro foi o ferro reduzido, na segunda foi fumarato ferroso e na terceira foi o sulfato ferroso. Como excipientes foram usados o amido de milho e o fosfato tricálcico. Os componentes para preparação das misturas foram doados pela indústria M. Cassab.

Cada mistura de nutrientes foi preparada pesando-se os componentes em balança analítica, dentro de um mesmo recipiente. Após serem pesados foram homogeneizados manualmente com bastão de vidro por 20 minutos. Ao término da homogeneização cada mistura foi analisada para quantificação do teor de ácido fólico. Cada análise foi realizada em triplicata, com repetições absolutas.

Na tabela IV.1 é descrita a composição base da mistura de nutrientes.

Tabela IV.1 – Composição base da mistura de nutrientes - ácido fólico e ferro

Componente	Valor determinado pela legislação (mg/100g de farinha)	Sobredosagem	Valor adicionado (mg/100g de farinha)	Composição final esperada (g/100g)
Ácido fólico	0,15	35%	0,2	0,1
Ferro	4,2	10%	4,6	2,3

Proporção de uso da mistura de nutrientes: 2g/Kg de farinha.

Cálculo de adição da mistura de nutrientes em farinha:

- Para ácido fólico

100g mistura _____ 0,1g ácido fólico

2g mistura _____ 0,002g ou 2mg de ácido fólico

2mg de ácido fólico _____ 1000g farinha

0,2mg ou 200µg de ácido fólico _____ 100g de farinha

- Para ferro

100g mistura _____ 2,3g de ferro

2g mistura _____ 0,046g ou 46mg de ferro

46mg de ferro _____ 1000g de farinha

4,6 mg de ferro _____ 100g de farinha

Nas tabelas IV.2, IV.3, IV.4 e IV.5 são descritas, em detalhes, as composições de cada mistura de nutrientes:

Tabela IV.2 – Composição da mistura 1 (ácido fólico e ferro reduzido)

Componente	% Princípio ativo	Valor desejado (g/100g mistura)	Valor pesado (g)	Composição final (g/100g)
Ácido fólico	98,8	0,100	0,101	0,101
Ferro reduzido	96	2,3	2,39	2,39
Fosfato tricálcico	–	–	–	10
Amissol	–	–	–	87,51
Total	–	–	–	100,001

Tabela IV.3 – Composição da mistura 2 (ácido fólico e fumarato ferroso)

Componente	% Princípio ativo	Valor desejado (g/100g mistura)	Valor pesado (g)	Composição final (g/100g)
Ácido fólico	98,8	0,100	0,101	0,101
Fumarato ferroso	33	2,3	6,96	6,96
Fosfato tricálcico	–	–	–	10
Amissol	–	–	–	82,94
Total	–	–	–	100,001

Tabela IV.4 – Composição da mistura 3 (ácido fólico e sulfato ferroso)

Componente	% Princípio ativo	Valor desejado (g/100g mistura)	Valor pesado (g)	Composição final (g/100g)
Ácido fólico	98,8	0,100	0,101	0,101
Sulfato ferroso	32	2,3	7,18	7,18
Fosfato tricálcico	–	–	–	10
Amissol	–	–	–	82,72
Total	–	–	–	100,001

Tabela IV.5 – Composição da mistura 4 (ácido fólico)

Componente	% Princípio ativo	Valor desejado (g/100g mistura)	Valor pesado (g)	Composição final (g/100g)
Ácido fólico	98,8	0,100	0,101	0,101
Fosfato tricálcico	–	–	–	10
Amissol	–	–	–	89,9
Total	–	–	–	100,001

1.1.2 Preparo das amostras de farinha de milho fortificadas

A partir de uma farinha de milho não fortificada (que será chamada farinha de milho), foram preparadas as amostras de farinha fortificada. Cada amostra foi composta de 1 kg de farinha adicionada de um tipo de mistura de nutrientes, seguindo as especificações abaixo:

- Amostra 1: 1Kg de farinha de milho + 2g da mistura de ácido fólico e ferro reduzido;
- Amostra 2: 1Kg de farinha de milho + 2g da mistura de ácido fólico e fumarato ferroso;
- Amostra 3: 1Kg de farinha de milho + 2g da mistura de ácido fólico e sulfato ferroso;
- Amostra 4: 1Kg de farinha de milho + 2g da mistura de ácido fólico.

Cada amostra de farinha de milho foi homogeneizada em misturador mecânico (semelhante à batedeira, marca KitchenAid) durante 20 minutos. Terminada a homogeneização foi retirada uma porção da amostra para que fosse feita a análise do teor de ácido fólico presente. Esta análise foi considerada como tempo 0. Em seguida cada uma das quatro amostras foi subdividida em 8 parcelas que foram acondicionadas em embalagens plásticas, devidamente identificadas, com fecho para impedir a entrada de ar. Destas 8 parcelas, 4 foram armazenadas

em câmara a 25°C e 60% de umidade e as outras 4 a 35°C e 60% de umidade. Cada parcela correspondia aos tempos de 30, 60, 90 e 120 dias.

2 MÉTODO

2.1 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA MISTURA DE NUTRIENTES

2.1.1 Preparo das amostras de mistura de nutrientes para análise cromatográfica

Tomou-se 1g da respectiva mistura a ser analisada, que foi dissolvida em solução de bicarbonato de sódio 0,024mol/L em balão de 100ml. Esta solução foi colocada em banho de ultra-som por 10 minutos e depois filtrada em papel filtro, 1mL deste filtrado foi diluído em solução de bicarbonato de sódio 0,024mol/L em balão de 50mL. Esta solução foi filtrada em membrana 0,45 μ m e recolhida em tubo de ensaio. Logo em seguida a solução foi injetada em cromatógrafo e monitorada à 280nm. Cada análise foi realizada em triplicata, com repetições absolutas.

2.2 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA FARINHA DE MILHO

2.2.1 Preparo das amostras de farinha de milho para análise cromatográfica

Foram tomados 5g de amostra e colocados em erlenmeyer ao qual foram adicionados 20mL de solução de bicarbonato de sódio 0,024mol/L. A solução foi deixada em agitador magnético por 5 minutos, e foram adicionados 10mL da solução de bicarbonato de sódio 0,024mol/L. O recipiente com a amostra foi colocado em banho com ultra-som por 10 minutos a temperatura de 50°C (\pm 2°C). Em seguida foram adicionados 20mL de solução de água e acetonitrila (87:13, v/v). A amostra foi deixada sob refrigeração por 5 minutos a temperatura de 10°C (\pm 2°C), e em seguida foi filtrada em papel filtro. A solução resultante foi filtrada em

membrana 0,45 μ m e recolhida em tubo de ensaio, sendo então injetada em cromatógrafo. Cada análise foi realizada em triplicata, com repetições absolutas.

2.3 MÉTODO APLICADO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO

A determinação de ácido fólico, feita por cromatografia líquida de alta eficiência, foi realizada nas misturas de nutrientes e nas amostras de farinha de milho fortificadas de acordo com os parâmetros estabelecidos por SILVA (2005b).

2.3.1 Reagentes

A água utilizada para extração, preparo de fase móvel e padrão foi obtida por destilação, deionização e filtração à vácuo em membrana de 0,45 μ m (Millipore).

Solventes usados: ácido acético p.a. (SYNTH), acetonitrila HPLC (TEDIA), hidróxido de sódio p.a. (ISO FAR) e bicarbonato de sódio p.a. (ISO FAR). O padrão foi adquirido da MERCK (Alemanha), código 1.03984.0005.

As fases móveis utilizadas foram filtradas a vácuo em membrana de 0,45 μ m (Millipore) e desgaseificadas antes do uso.

2.3.2. Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo marca Shimadzu, modelo CLASS-LC10A com sistema de bombeamento binário modelo M10A, com sistema de injeção Rheodyne com alça de amostragem de 250 μ l, acoplado a um detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10A. A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa LiChrospher® RP-18, 250 x 4mm i.d., 5 μ m (Merck, Alemanha), acompanhada de

coluna guarda LiChrospher® 100 RP18, 4x4mm i.d., 5 μ m (Merck, Alemanha). O sistema foi conectado a um microcomputador para análise dos dados.

2.3.3 Condições cromatográficas

O ácido fólico foi eluído em sistema por gradiente iniciando com 99% de tampão acetato pH 2,8 e 1% de acetonitrila, chegando em 15 minutos a 76% de tampão acetato e 24% de acetonitrila, em 16 minutos foram retomadas as condições iniciais que permaneceram até 26 minutos quando terminou a corrida. O pump foi ajustado em 1% de acetonitrila e 99% de tampão acetato. A vazão foi de 0,8mL/min.

A identificação foi realizada por comparação entre o tempo de retenção obtido com o padrão analisado sob as mesmas condições que as amostras, pelos espectros de absorção obtidos com o detector de arranjo de diodos, e também por co-cromatografia.

A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa com injeção, de no mínimo três vezes durante o dia, do ponto central da curva de calibração. A linearidade do sistema foi avaliada pela construção de curva de calibração com seis pontos, considerando a origem, nas seguintes concentrações: 0,21; 0,32; 0,42; 0,53 e 0,74 μ g/mL.

2.3.4 Preparo do padrão

Foram dissolvidos cerca de 100mg de ácido fólico em solução de bicarbonato de sódio 0,024mol/L em balão de 100mL, obtendo-se uma solução de concentração 1mg/mL. Esta solução foi conservada sob refrigeração. A partir desta, foram realizadas diluições com água até ser obtida a concentração de 0,4 μ g/mL, que foi utilizada na realização das análises. As diluições, a partir da solução de estoque, foram preparadas diariamente.

2.4 VALIDAÇÃO

Para validação do método foram estudados os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação (USP 29).

- Seletividade: para estabelecer este parâmetro foi analisado um “branco” de reagentes (realização do método sem a adição de amostra), e uma amostra de farinha de milho sem ácido fólico.
- Linearidade: foi obtida por meio da construção de uma curva de calibração para ácido fólico com seis pontos, considerando a origem, nas seguintes concentrações: 0,21; 0,32; 0,42; 0,53 e 0,74µg/mL. A partir dos dados obtidos foi calculada a equação da reta e o coeficiente de determinação. As concentrações estudadas de ácido fólico foram obtidas a partir de uma solução padrão de ácido fólico de concentração 105,41mg/100mL, a partir da qual foram feitas as seguintes diluições: 1mL em 25mL de água, do qual foi retirado 1mL e diluído em 10mL, com água. Desta última diluição foram retiradas as seguintes alíquotas: 0,5; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,75mL que foram diluídas em 10mL de água cada uma.
- Exatidão (recuperação): para esta determinação foram realizadas 3 extrações para uma amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico em concentração conhecida.
- Precisão: para este cálculo foram feitas 5 repetições de injeção do ponto central da curva de calibração.
- Limites de detecção e quantificação: foram calculados por aproximação segundo as equações abaixo, utilizando 3 pontos com concentrações inferiores ao menor ponto da curva de calibração, injetados em triplicata.

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{B} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{B} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Onde:

Y_{bl} = estimativa da resposta do branco

S_{bl} = estimativa do desvio padrão do branco

B = inclinação da curva

N = número de medidas

V DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras foram armazenadas em duas câmaras com temperatura e umidade controladas, uma a 25^o C e a outra a 35^o C, ambas com umidade de 60%. Cada determinação da concentração de ácido fólico foi realizada em triplicata.

As análises foram realizadas ao longo de 4 meses com intervalos de 30 dias (tempo 0, 30, 60, 90 e 120 dias) até o término do experimento. Para análise estatística seguiu-se o delineamento inteiramente casualizado, tendo a temperatura como tratamento principal e os tempos de avaliação da concentração de ácido fólico como tratamento secundário. Os resultados foram submetidos a análise de variância para verificar se houve diferença entre as amostras. Foi realizada análise de regressão linear para verificar se existiu influência do tempo de estocagem sobre a concentração de vitamina. Os resultados foram analisados pelo programa STATISTICA for Windows versão 6.0.

VI RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 VALIDAÇÃO

1.1 LINEARIDADE

Na tabela VI.1 estão as concentrações de ácido fólico utilizadas para a construção da curva de calibração e as respectivas áreas correspondentes.

Tabela VI.1 - Valores de concentração e área obtidos na curva de calibração.

Alíquota	Concentração ($\mu\text{g}/10\text{mL}$)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área
0	0	0	0
0,50	2,1083	0,21083	165664
0,75	3,1625	0,31625	268835
1,00	4,2167	0,42167	357629
1,25	5,2708	0,52708	461795
1,75	7,3791	0,73791	634153

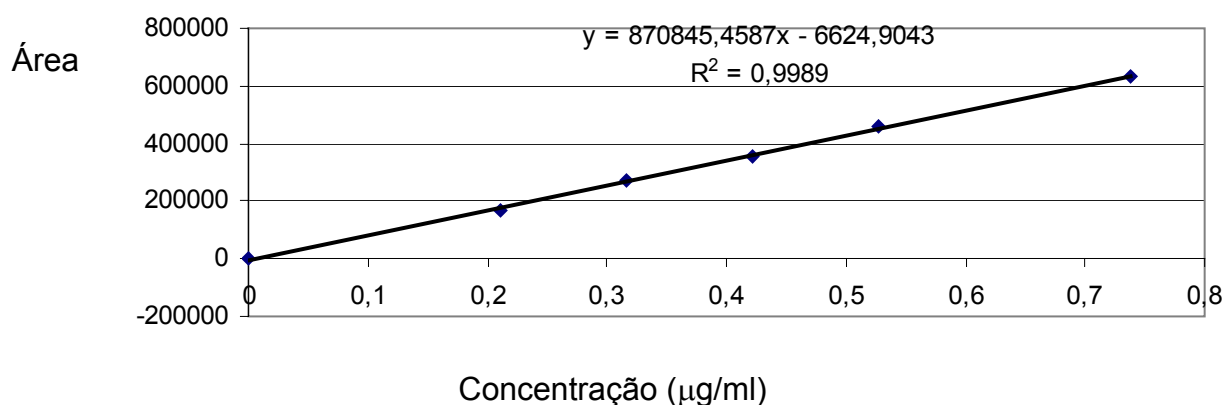


Figura VI.1 – Gráfico da curva de calibração para ácido fólico (área versus concentração)

A equação da reta obtida foi $y = -6624,90 + 870845,46x$, com $r^2 = 0,9989$, indicando alta correlação entre a concentração e a área respectiva.

1.2 EXATIDÃO

Para estudar este parâmetro foi analisada uma amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico na concentração de $236\mu\text{g}/100\text{g}$. A tabela VI.2 mostra os resultados da análise feita em triplicata.

Tabela VI.2 – Valores obtidos para estabelecimento de exatidão

Repetição	Resultado ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Média($\mu\text{g}/100\text{g}$)	DP	CVobtido (%)	CVmáx (%)
1	223,27				
2	267,55	236,47	27,02	11	14
3	218,59				

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

O coeficiente de variação máximo (CV máx) para repetições analíticas foi obtido segundo a fórmula estabelecida por Horwitz, (1982):

$$\text{CV máx (\%)} = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Onde C = concentração estudada expressa como potência de 10.

Exemplo:

$$236\mu\text{g}/100\text{g} = 0,000236\text{g}/100\text{g} = 2,36 \times 10^{-6}$$

$$\text{Logo: CV máx (\%)} = 2^{[1-0,5 \log (2,36 \times 10^{-6})]} = 14.$$

O CV obtido foi de 11, portanto $\text{CV}_{\text{obt}} < \text{CV}_{\text{máx}}$. Logo o CV obtido está dentro do limite aceitável para as repetições analíticas.

A recuperação de 100,2% indica boa exatidão para o método empregado.

Outros autores também conseguiram obter boa exatidão na validação de métodos cromatográficos para análise de ácido fólico em outras

matrizes alimentícias. Lima (2001) relatou recuperação de $95\% \pm 1$ em farinha de trigo enriquecida com ácido fólico na concentração de $1,7\mu\text{g/g}$ e recuperação de $97\% \pm$ para farinha de trigo enriquecida com ácido fólico na concentração de $2,5\mu\text{g/g}$. Osseyi, Wehling e Albrecht (1998) relataram recuperação de $93\% \pm 5,2$ para farinha de trigo adicionada de ácido fólico na concentração de $3,08\mu\text{g/g}$, e recuperação de $96\% \pm 3$ quando a farinha foi adicionada de $20\mu\text{g/g}$.

1.3 PRECISÃO

A precisão foi calculada com base nos valores de concentração obtidos das injeções do ponto central da curva de calibração. Foram feitas 5 injeções que forneceram os resultados que são expressos na tabela VI.3:

Tabela VI.3 – Valores obtidos para o cálculo de precisão

Repetição	Resultado ($\mu\text{g/mL}$)	Média($\mu\text{g/mL}$)	DP	CVobtido (%)	CVmáx(%)
1	0,42167				
2	0,39641				
3	0,41917	0,414886	0,01059	2,5	14
4	0,42144				
5	0,41574				

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CVmáx. = coeficiente de variação máximo

Como o $CV_{\text{obt}} < CV_{\text{máx}}$, isto indica boa precisão do método, estando dentro do valor aceitável. O CV de 2,5 está próximo ao valor obtido por Lima (2001), que relatou um CV de 1,0 para o método utilizado para avaliação de ácido fólico adicionado à farinha de trigo.

1.4 SELETIVIDADE

Para a análise da especificidade foram analisados um branco de reagentes (que consiste em realizar todo o método sem a adição de amostra) e uma farinha de milho não enriquecida. Ambas as análises foram realizadas sob as mesmas condições e não foi observada a existência de interferentes na detecção da vitamina, conforme demonstrado nas figuras VI.2., VI.3., VI.4., VI.5.

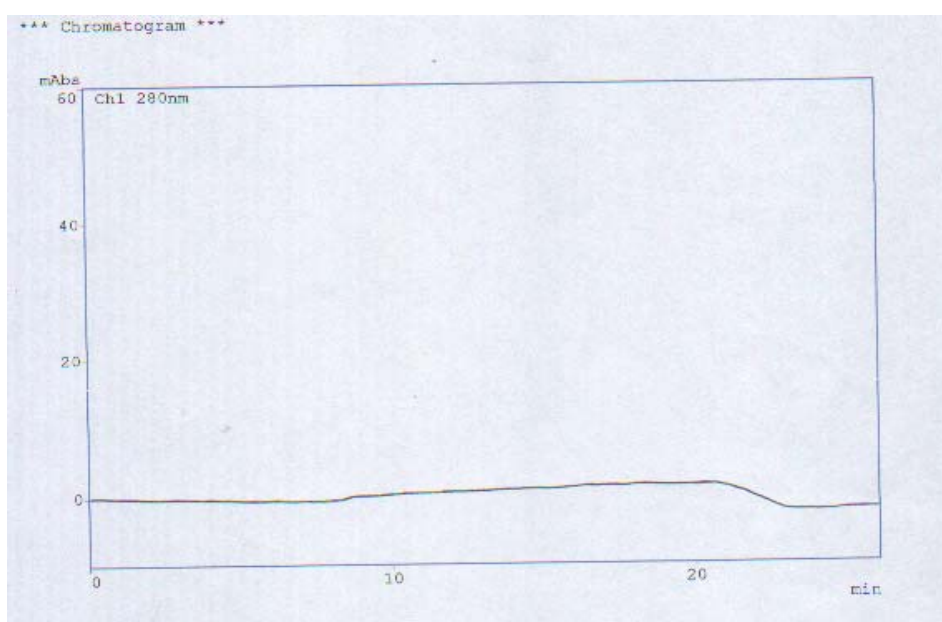


Figura VI.2 – Branco de reagentes

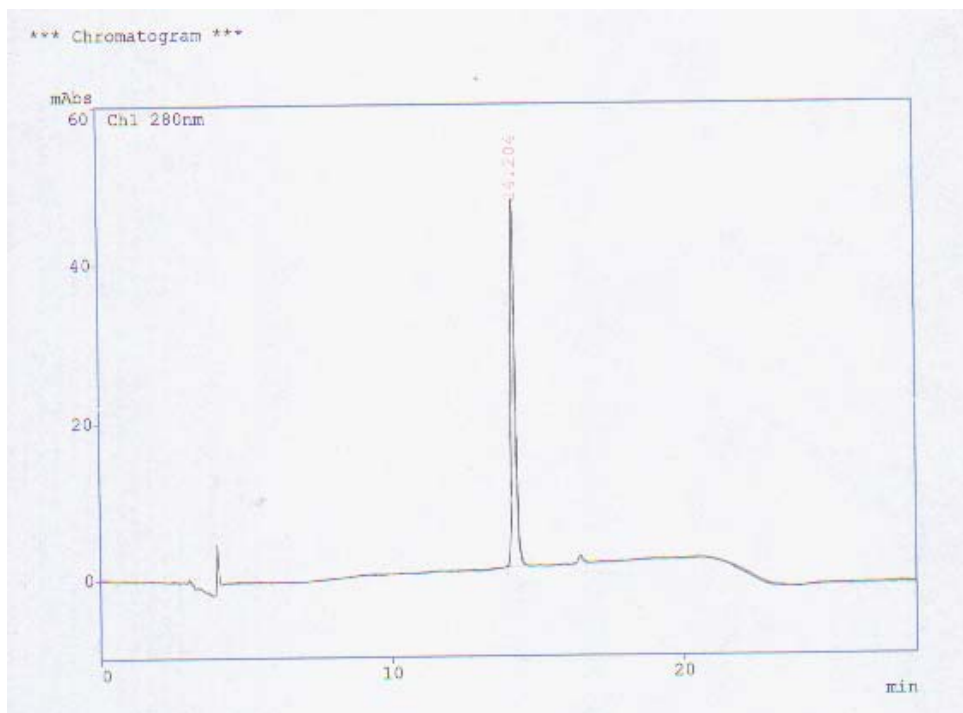


Figura VI.3 – Padrão de ácido fólico (tempo de retenção 14 min.)

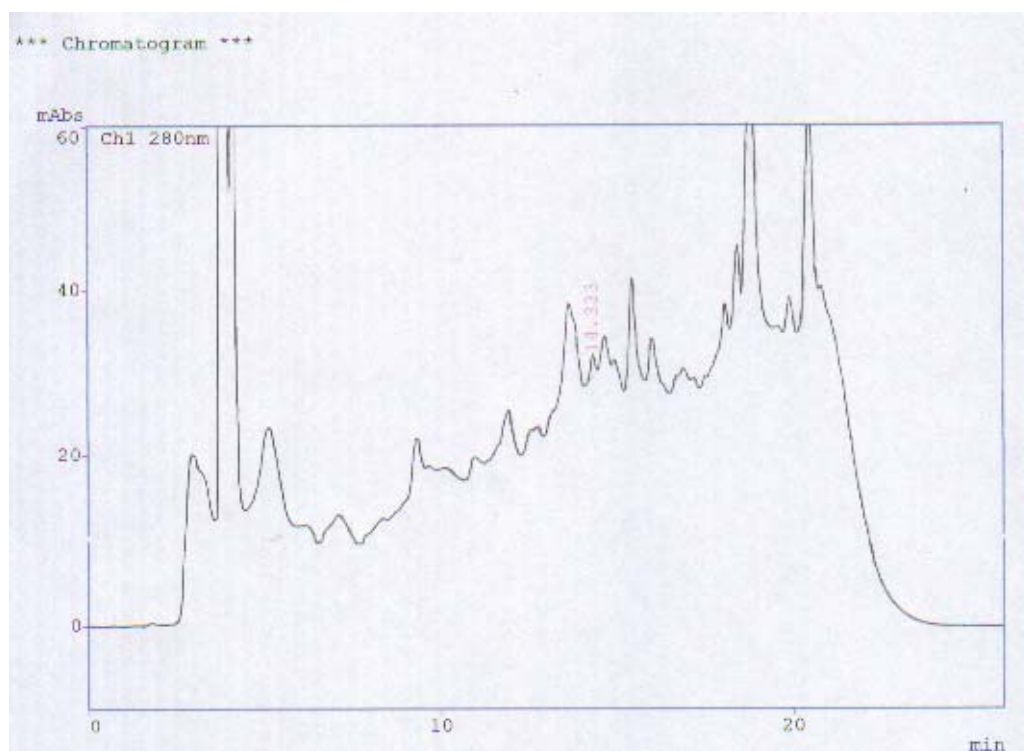


Figura VI.4 – Farinha de milho

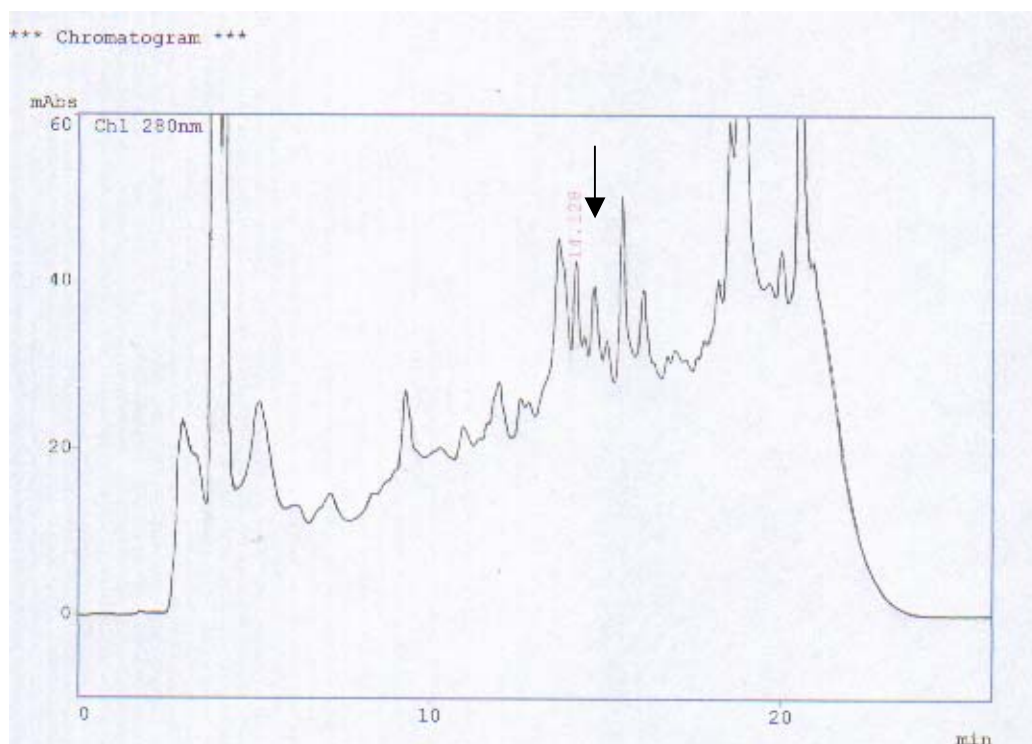


Figura VI.5 - Farinha de milho adicionada de ácido fólico

1.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para determinação dos limites de detecção e quantificação foram utilizados 3 pontos de concentração inferior ao menor ponto da curva de calibração. As concentrações foram obtidas a partir de uma solução padrão de concentração 105,41mg/100mL, a partir da qual foram feitas as seguintes diluições: 1mL em 25mL de água, do qual foi retirado 1mL e diluído em 10mL, com água. A seguir foram retiradas as seguintes alíquotas: 0,2; 0,3; 0,4mL, que foram diluídas em 10mL de água e injetadas em triplicata. Os resultados são demonstrados na tabela VI.4:

Tabela VI.4 – Valores de concentração, área e desvio padrão utilizados para o cálculo dos limites de detecção e quantificação.

Alíquota	Concentração ($\mu\text{g}/10\text{mL}$)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área			Média	s
0,20	0,843	0,0843	61876	61983	64063	62641	1233
0,30	1,265	0,1265	92728	97607	96956	95764	2649
0,40	1,687	0,1687	137544	128056	133308	132969	4753

s = estimativa de desvio padrão.

A partir destes resultados foram obtidas as seguintes curvas que definem a correlação entre os parâmetros:

Equação da curva (concentração/área): $y = - 8367,61 + 833930,17x$
($r = 0,9989$)

Equação da curva (concentração/s): $y = -2401,79 + 4170,22x$ ($r = 0,9989$)

$$Y_{bl} = 8367,61 \quad S_{bl} = 2401,79$$

Para uso nas equações, a inclinação considerada foi a da curva de calibração:

Equação da curva de calibração: $y = - 6624,90 + 870845,46x$ ($r = 0,9989$)

$$b = 870845,46$$

$$\text{Limite de detecção} = \frac{8367,61 + 3 \times 2401,79}{870845,46} \times \frac{1}{\sqrt{3}}$$

O resultado obtido para o limite de detecção foi de $0,0103\mu\text{g/mL}$.

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{8367,61 + 10 \times 2401,79}{870845,46} \times \frac{1}{\sqrt{3}}$$

O resultado obtido para o limite de quantificação foi de $0,0214\mu\text{g/mL}$.

2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ÁCIDO FÓLICO EM MISTURAS DE NUTRIENTES

Os resultados da análise de ácido fólico em cada mistura são demonstrados na tabela VI.5:

Tabela VI.5 – Concentração de ácido fólico em mistura de nutrientes

Mistura	mg /100g	DP(μ g)	CV(%)	CV máx. (%)
1	95	± 8	9	6
2	104	± 3	3	6
3	75	± 4	5	6
4	91	± 3	3	6

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

Mix 1 – Ácido fólico + ferro reduzido + excipientes

Mix 2 – Ácido fólico + fumarato ferroso + excipientes

Mix 3 – Ácido fólico + sulfato ferroso + excipientes

Mix 4 – Ácido fólico + excipientes

Cada mistura foi preparada de forma que sua concentração final fosse de aproximadamente 100mg de ácido fólico para cada 100g de mistura. Os valores encontrados estiveram próximos ao valor esperado, variando de 104 – 75 μ g/100g. Isso demonstra que o ácido fólico manteve concentração e distribuição adequada durante o preparo da mistura e também no produto final. Essas misturas foram usadas para o enriquecimento das amostras de farinha de milho.

3 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ÁCIDO FÓLICO EM FARINHA DE MILHO

3.1 ANÁLISE TEMPO 0 DIAS

Logo após serem preparadas, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do teor de ácido fólico presente. Essa primeira análise correspondeu ao tempo 0 dias. As amostras foram preparadas com uma sobredosagem de 35% do valor determinado por lei ($150\mu\text{g}/100\text{g}$), prevendo possíveis perdas de vitamina durante o preparo do produto. Os valores da concentração de ácido fólico encontrados após a primeira análise encontram-se na tabela VI.6:

Tabela VI.6 – Concentração encontrada de ácido fólico em farinha de milho na análise do tempo 0 dias

Amostra	Concentração encontrada ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Desvio Padrão (μg)
1	95	± 8
2	86	± 11
3	56	± 9
4	97	± 4

Após o processo de adição de mistura e homogeneização de cada amostra, a concentração média de vitamina encontrada variou entre $56\text{-}97\mu\text{g}/100\text{g}$, em média 41% do valor de $200\mu\text{g}/100\text{g}$, que era o valor que se esperava encontrar nas amostras.

A respeito do processo de homogeneização de ácido fólico em farinha, sabe-se que nas indústrias esta é uma etapa crítica e embora sejam poucos os trabalhos que tratam da homogeneização de ácido fólico em matriz alimentícia, podem ser encontradas evidências de que este processo ainda não está completamente otimizado.

Em um trabalho realizado por Lima (2001), foi feita a adição de ácido fólico em leite cru, e os resultados sobre a concentração de vitamina encontrada após a homogeneização, ficou em torno de 46% do valor esperado.

Embora as matrizes alimentícias sejam diferentes neste trabalho e no que foi realizado por Lima, farinha de milho e leite respectivamente, percebe-se que após a etapa de adição e homogeneização os valores de concentração de ácido fólico encontrados estiveram abaixo do esperado. Desta maneira, é possível verificar que a etapa de adição e homogeneização de ácido fólico em matriz alimentícia é uma etapa crítica, que pode levar a produtos com concentração de vitamina não adequada.

Ainda em outro trabalho realizado por Lima-Pallone e Godoy (2005) foi estudada a eficiência do processo de adição de ácido fólico em farinha de milho, em escala industrial. Verificou-se que o processo de enriquecimento, que tem como ponto crítico a homogeneização, não está sendo eficiente pois foram constatadas grandes variações na concentração da vitamina em diferentes porções de um mesmo lote, o que indica que o processo industrial de enriquecimento não está adequado. A constatação de dificuldades que ocorrem no processo de homogeneização também encontra respaldo em dados de um estudo retrospectivo realizado pelo laboratório de análise de vitaminas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas). Observando os resultados sobre a concentração de ácido fólico em farinha de milho, em amostras que foram encaminhadas para análise naquele laboratório no período de julho de 2004 a abril de 2005, pode-se verificar que existem grandes diferenças entre amostras provenientes de diferentes indústrias, e que algumas encontram-se com valores muito acima do esperado e outras com concentrações de ácido fólico abaixo de $30\mu\text{g}/100\text{g}$ (SILVA, 2005a). Isso reforça a hipótese de que as baixas concentrações de vitamina encontradas nas amostras são consequência de uma dificuldade em se conseguir uma boa distribuição de ácido fólico em farinha de milho.

3.2 Resultados das análises das amostras a 25°C

Nas amostras estocadas a 25°C não foi possível realizar a análise no tempo 60 dias devido a problemas no equipamento.

Tomando-se os valores das concentrações de ácido fólico desde o início até o tempo de 120 dias, foi realizada a análise de variância para verificar se houve diferença significativa na concentração de ácido fólico entre as 4 amostras, com nível de significância de 5%.

Tabela VI.7 –Análise de variância para amostras estocadas a 25°C

Efeito	SS	Degr	MS	F
Tempo	1010,25	3	336,75	0,9351
Amostra	904,25	3	301,42	0,8369
Erro	3241,25	9	360,14	

SS= soma dos quadrados; Degr= grau de liberdade; MS= quadrado médio

O valor de F para amostras foi de 0,8369, com um F tabelado de 3,86. Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, pode-se afirmar que não houve diferença significativa na concentração de ácido fólico entre as amostras, sob as condições estudadas.

Para verificar se com o avanço do tempo de estocagem a concentração de ácido fólico sofreria alguma alteração, foi realizada uma análise de regressão linear, para estabelecer a existência, ou ausência, de relação entre tempo de estocagem e concentração de ácido fólico. O coeficiente de correlação linear, que demonstra o grau de associação entre as duas variáveis, é indicado para cada amostra na tabela VI.8:

Tabela VI.8 – Coeficiente de correlação encontrado para amostras estocadas a 25°C

Amostra	R (coeficiente de correlação)
1	0,24
2	0,10
3	0,97
4	-0,92

Para as amostras 1 e 2 o coeficiente de correlação foi baixo, e por isso não é possível afirmar que houve relação entre o tempo de estocagem e a variação na concentração de vitamina.

Para a amostra 3 o coeficiente de correlação foi alto, porém positivo, o que seria equivalente a dizer que com o avanço do tempo de estocagem a vitamina tem um acréscimo na sua concentração. Como isso não é possível, considera-se que a concentração de vitamina permaneceu constante durante o período de estudo. Também pode ser considerado que este comportamento seja resultado da distribuição não uniforme da vitamina na amostra, devido a dificuldade de homogeneização neste tipo de amostra, como já foi constatado por Lima-Pallone e Godoy (2005).

Para a amostra 4 o coeficiente de correlação também foi alto, e neste caso negativo, indicando provável correlação entre o tempo de estocagem e a diminuição na concentração de vitamina. Para verificar se com o aumento do tempo de armazenamento houve diminuição significativa na concentração de ácido fólico, foi estudado o coeficiente angular da reta, que é o valor de B na equação $y=A+Bx$, e que neste caso tem o valor de $-0,1567$. Este coeficiente angular indica que com o aumento do tempo de estocagem a concentração de vitamina sofre um decréscimo.

Foi realizada análise de regressão para testar as hipóteses $H_0: B=0$ e $H_1: B \neq 0$, e o resultado de F é demonstrado na tabela VI.9:

Tabela VI.9 – Análise de regressão para amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico

Efeito	Sums of	df	Mean	F
Regress.	220,9000	1	220,9000	11,90836
Residual	37,1000	2	18,5500	
Total	258,0000			

Sums of = soma dos quadrados; df = grau de liberdade; mean = quadrado médio

O valor de F calculado foi de 11,9, e o F tabelado ($\alpha=5\%$) é igual a 18,51. Como F calculado < F tabelado, aceita-se H_0 , ou seja, o parâmetro B pode ser considerado nulo. Assim a reta que demonstra a concentração de ácido fólico pode ser considerada paralela ao eixo x, o que equivale a dizer que não há diminuição significativa na concentração de vitamina durante o período estudado.

Para as amostras 1,2 e 3 também foi feito o quadro de análise de regressão e em todos os casos o valor de B foi considerado igual a 0, e conseqüentemente a reta que demonstra a concentração de ácido fólico também foi considerada paralela ao eixo x.

Para as amostras estudadas a 25°C, apesar de serem observadas algumas tendências de diminuição na concentração de ácido fólico, estas não foram significativas quando submetidas a análise estatística e, portanto pode-se considerar que durante o período estudado, e sob as condições de estocagem estabelecidas, a concentração de ácido fólico permaneceu estável no produto.

Os gráficos e tabelas a seguir demonstram a concentração do ácido fólico durante o período de estudo, a 25°C:

Tabela VI.10 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, estocada a 25°C no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	DP (μg)	CV%	CVmáx%
0	95	± 8	9	16
30	44	± 5	12	18
90	89	± 16	18	16
120	88	± 14	16	16

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

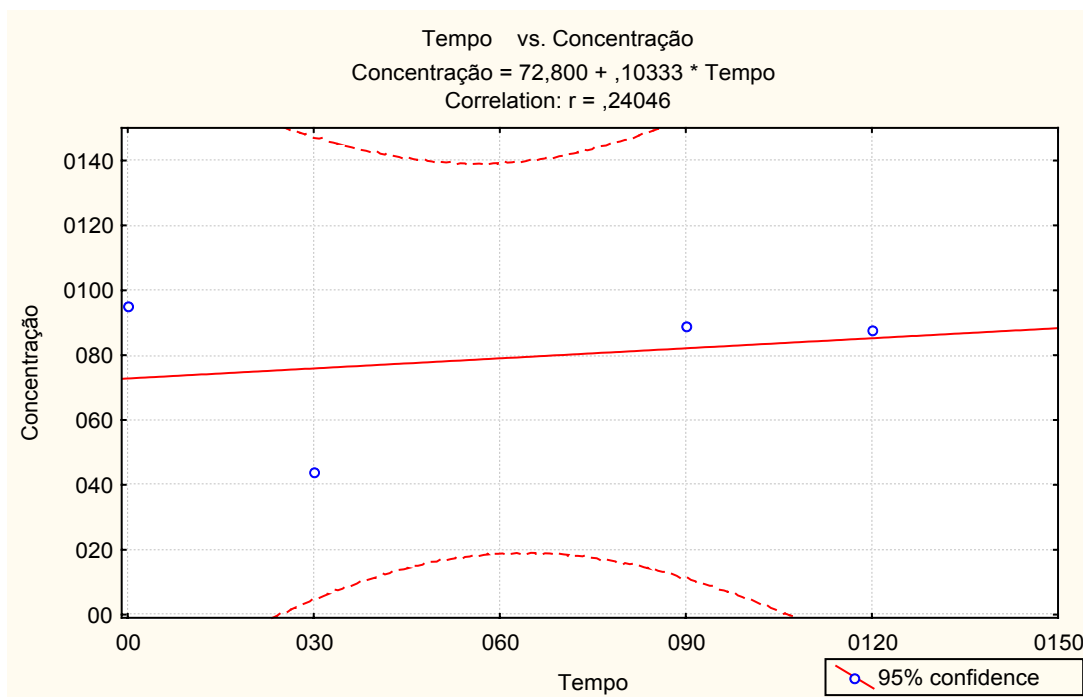


Figura VI.6 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, armazenada a 25°C.

Tabela VI.11 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, estocada a 25°C no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração (μg/100g)	DP (μg)	CV%	CVmáx%
0	86	±11	13	16
30	73	±3	4	17
90	46	±7	17	18
120	107	±10	9	16

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

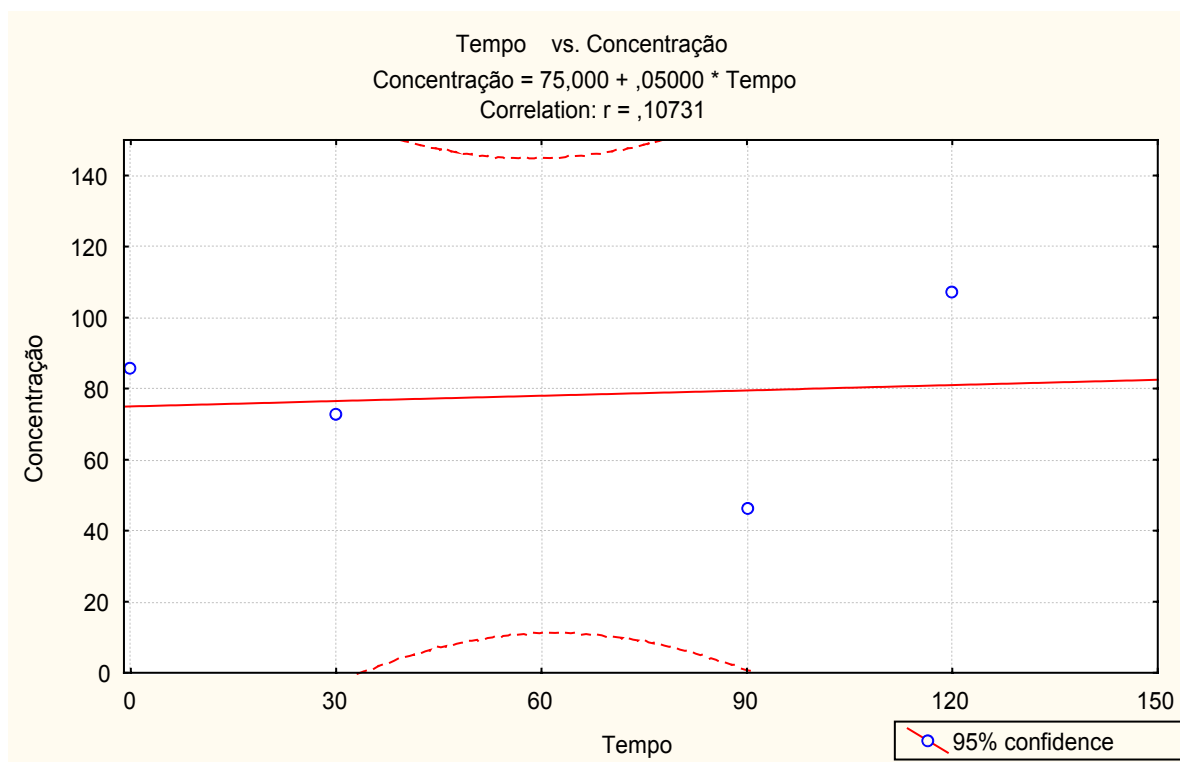


Figura VI.7 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, armazenada a 25°C.

Tabela VI.12 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, estocada a 25°C, no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração (µg/100g)	DP (µg)	CV%	CVmáx%
0	56	±9	17	17
30	62	±7	12	17
90	70	±14	14	17
120	83	±13	13	16

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

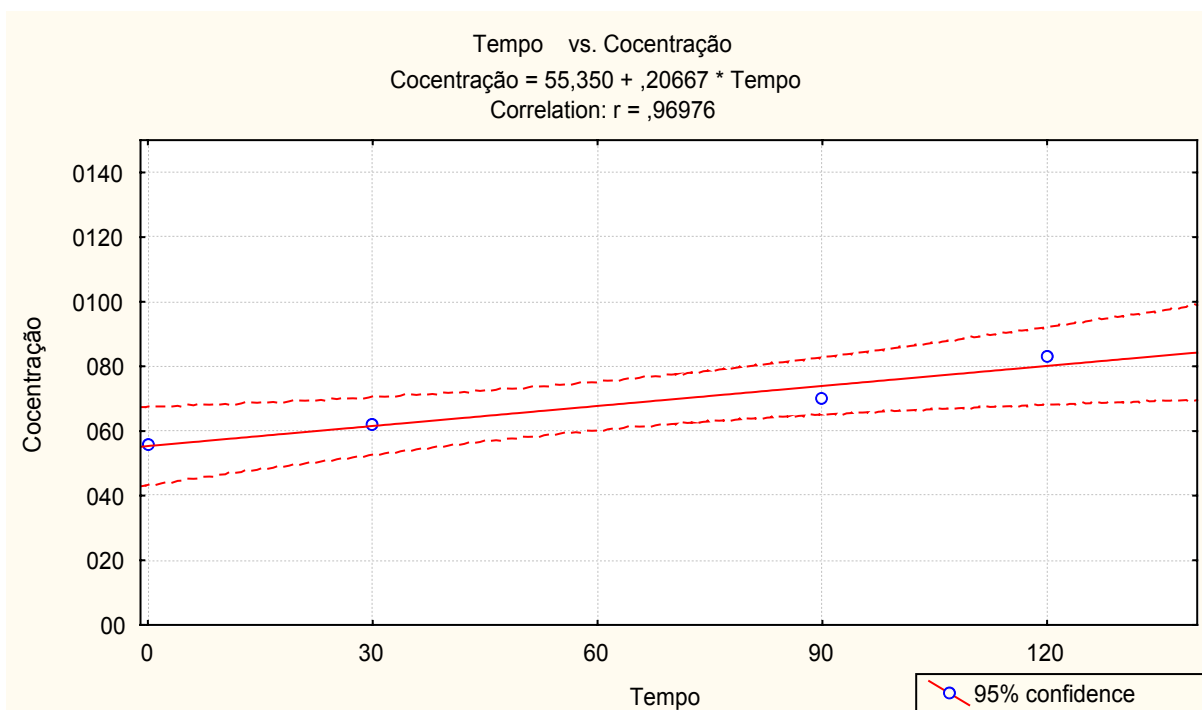


Figura VI.8 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, armazenada a 25°C.

Tabela VI.13 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, estocada a 25°C no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	DP (μg)	CV%	CVmáx%
0	97	± 4	4	16
30	94	± 4	5	16
90	89	± 0	0	16
120	76	± 14	18	17

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

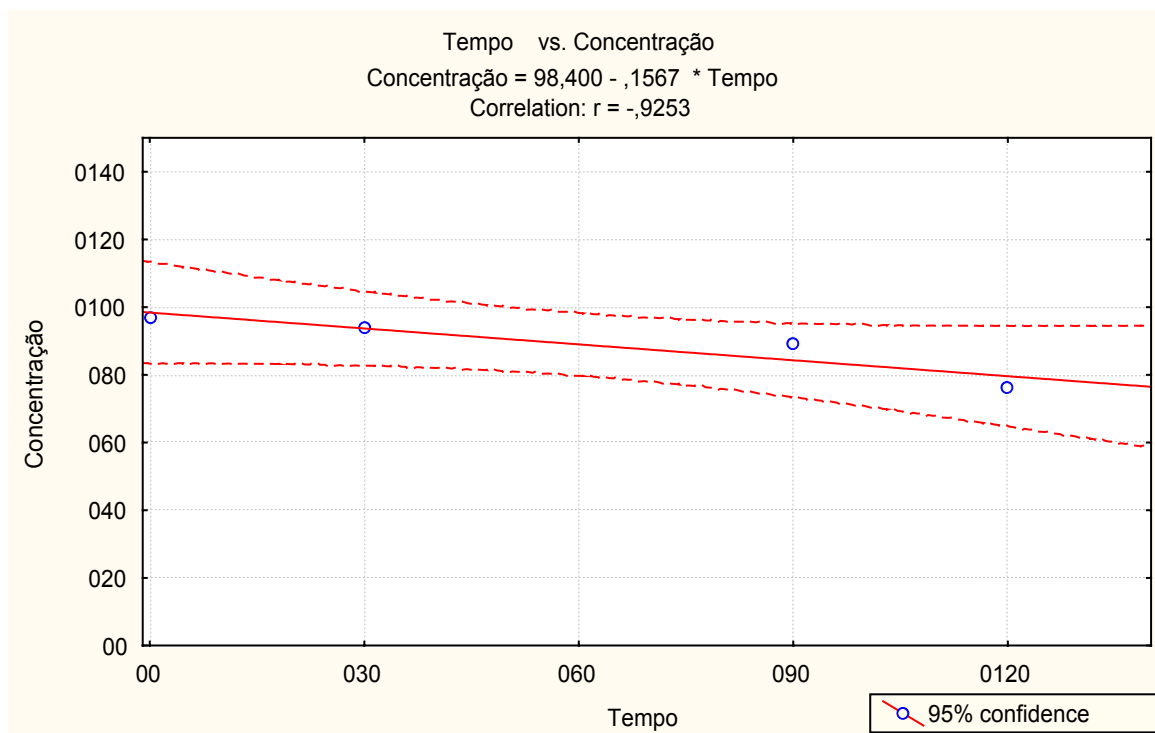


Figura VI.9 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, armazenada a 25°C.

3.3 Resultados das análises das amostras a 35°C

Para verificar se houve alguma diferença na concentração de ácido fólico entre as 4 amostras que ficaram estocadas a 35°C, foi realizada análise de variância (ao nível de 5% de significância).

Tabela VI.14 – Análise de variância para amostras estocadas a 35°C

Efeito	SS	Degr. of	MS	F
Amostra	1623,65	3	541,22	2,8795
Tempo	207,73	3	69,24	0,3684
Error	1315,69	7	187,96	

SS= soma dos quadrados; Degr= grau de liberdade; MS= quadrado médio

O F calculado para amostras foi de 2,8795 e o F tabelado para este caso foi de 4,5. Como o F calculado < F tabelado, pode-se afirmar que não houve diferença significativa na concentração de vitamina entre as amostras no período estudado.

Para averiguar a existência, ou ausência, de relação entre o tempo de estocagem e a concentração de ácido fólico, foi realizada análise de regressão para as amostras estocadas a 35°C. Os valores encontrados para os coeficientes de correlação são apresentados na tabela VI.5:

Tabela VI.15 – Coeficiente de correlação encontrado para amostras estocadas a 35°C

Amostra	R (coeficiente de correlação)
1	0,13
2	0,24
3	0,57
4	0,62

Os valores encontrados para os coeficientes de correlação foram baixos (no máximo 62% para a amostra 4), o que não é suficiente para dizer que o avanço do tempo de armazenamento causou alguma alteração na concentração de vitamina.

Quando foi realizada a análise de regressão linear, para verificar as hipóteses $H_0: B=0$ e $H_1: B \neq 0$, pôde ser verificado que para todas as amostras a hipótese H_0 foi aceita, indicando que o valor de B pode ser considerado nulo. Assim, a reta que estima o valor das concentrações de ácido fólico pode ser considerada paralela ao eixo x, e a concentração da vitamina pode ser considerada estável durante o período estudado.

Os gráficos e tabelas a seguir demonstram a concentração do ácido fólico durante o período de estudo, a 35°C:

Tabela VI.16 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, estocada a 35°C, no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração			
	($\mu\text{g}/100\text{g}$)	DP (μg)	CV%	CVmáx%
0	95	± 8	9	16
30	78	± 2	4	17
60	83	± 7	7	16
90	80	± 4	6	17
120	98	± 15	16	16

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

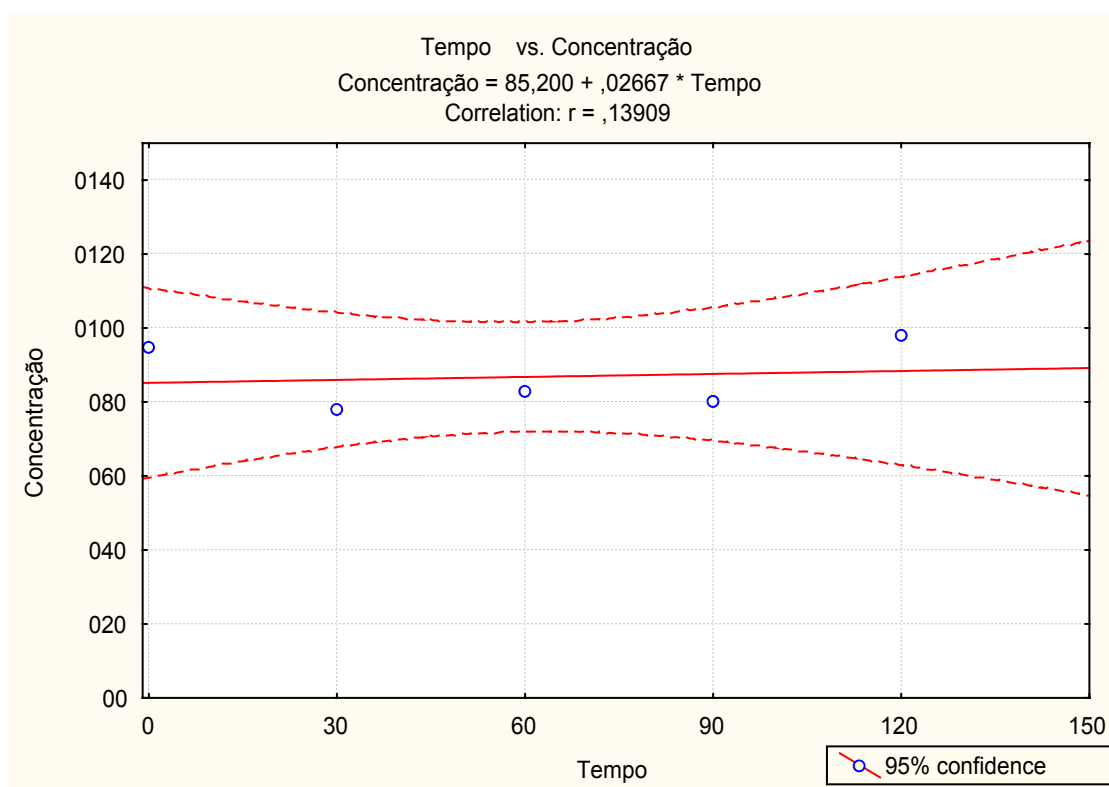


Figura VI.10 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e ferro reduzido, armazenada a 35°C.

Tabela VI.17 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, estocada a 35°C no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração (µg/100g)	DP (µg)	CV%	CVmáx%
0	86	±11	3	16
30	88	±11	14	16
60	82	±10	13	16
90	67	±3	5	17
120	108	±8	7	16

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

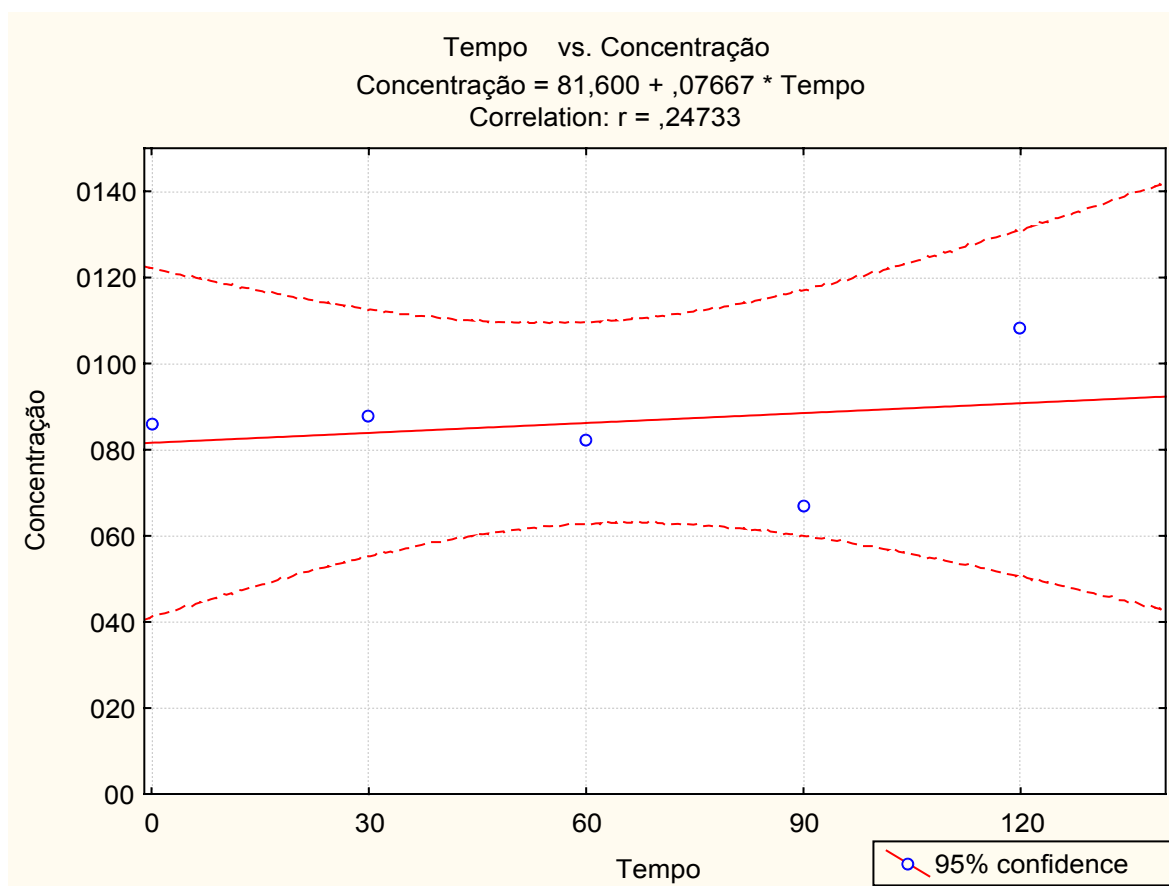


Figura VI.11 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e fumarato ferroso, armazenada a 35°C.

Tabela VI.18 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, estocada a 35°C, no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração (µg/100g)	DP (µg)	CV%	CVmáx%
0	56	±9	17	17
30	62	±10	17	17
60	107	±8	8	16
90	65	±3	6	17
120	96	±4	5	16

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

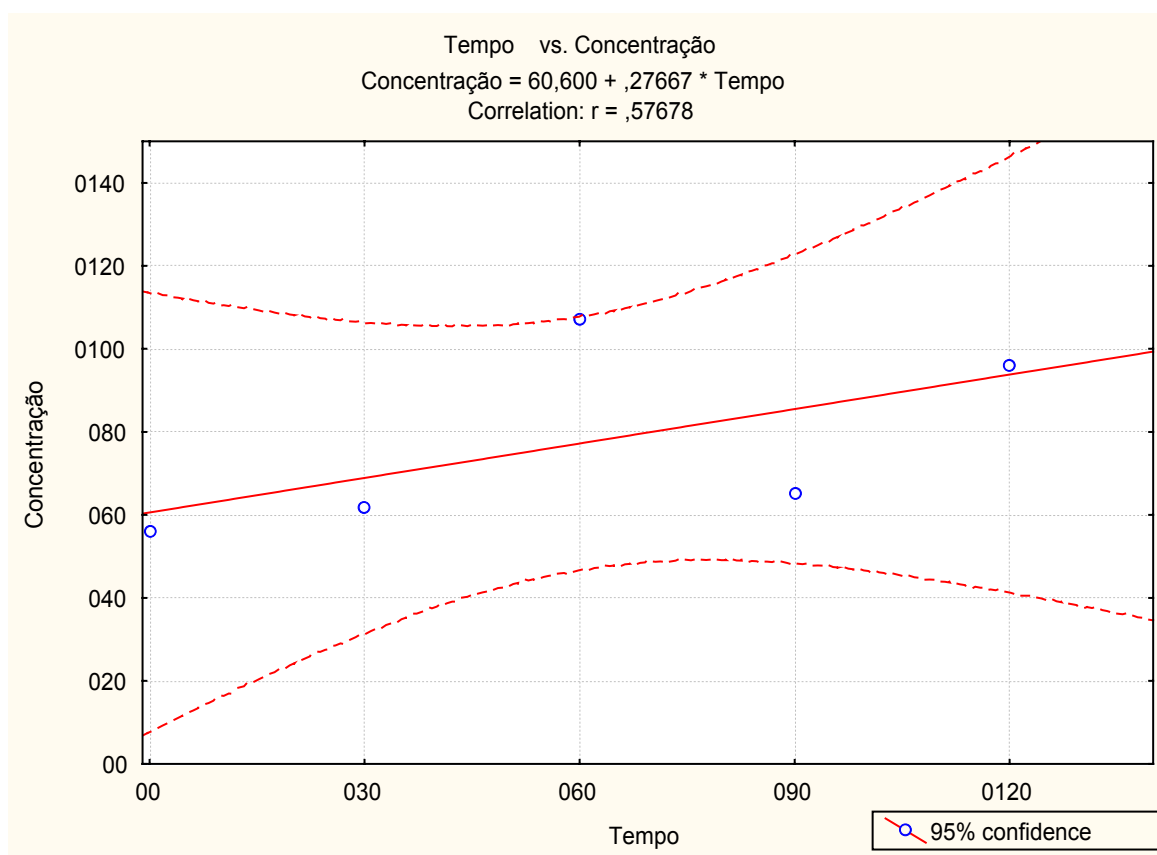


Figura VI.12 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico e sulfato ferroso, armazenada a 35°C.

Tabela VI.19 – Concentração de ácido fólico na amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, estocada a 35°C, no período de 120 dias.

Tempo (dias)	Concentração (µg/100g)	DP (µg)	CV%	CVmáx%
0	97	±4	4	16
30	104	±10	10	16
60	95	±31	33	16
90	103	±11	11	16
120	108	±13	13	16

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV máx.= coeficiente de variação máximo.

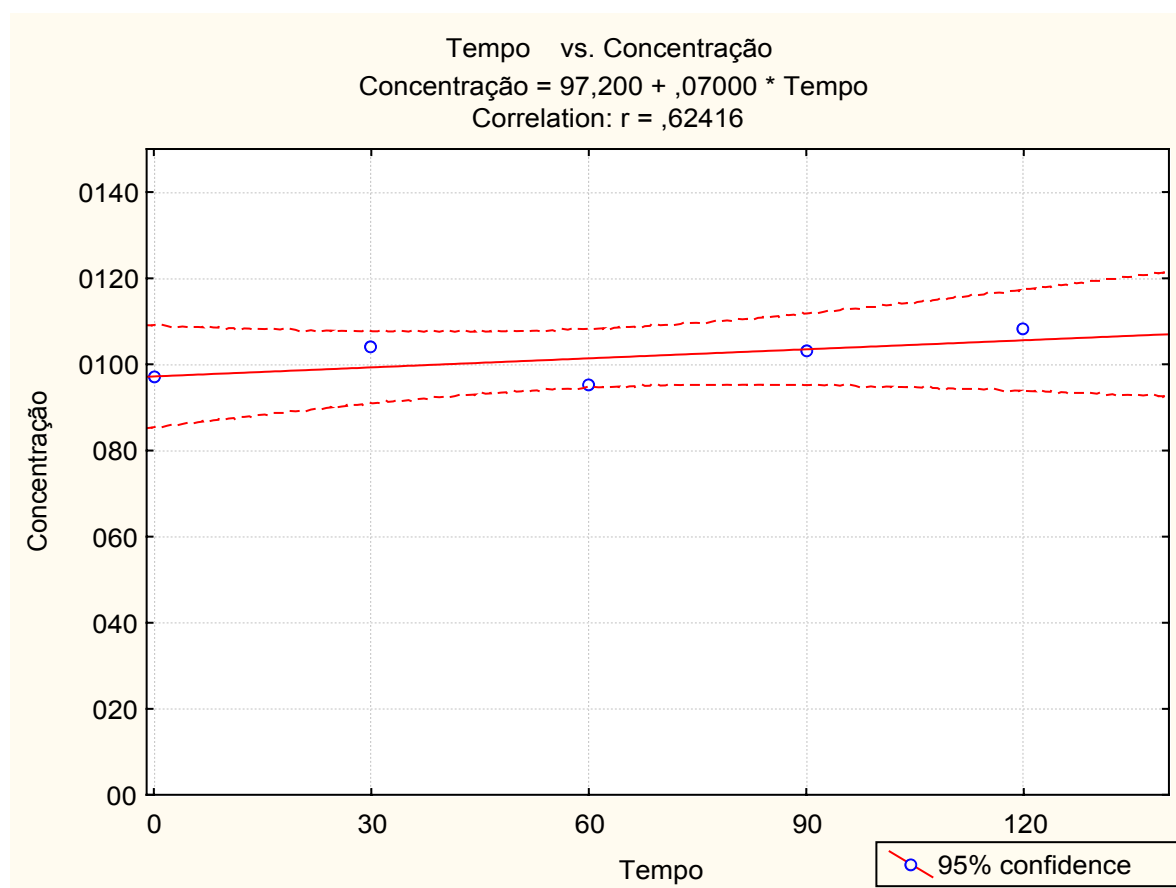


Figura VI.13 – Gráfico da concentração de vitamina em função do tempo de estocagem, da amostra de farinha de milho adicionada de ácido fólico, armazenada a 35°C.

Os resultados da concentração de ácido fólico obtidos nas amostras estocadas a 25 e 35°C, não demonstraram diminuição significativa com o aumento

do período de estocagem. Esse comportamento foi verificado na fortificação, tanto com a vitamina combinada com sais de ferro (ferro reduzido, sulfato e fumarato), quanto com a vitamina utilizada isoladamente (sem adição de ferro). Foi observado que o resultado de algumas amostras apresentaram valores de concentração de ácido fólico abaixo dos valores médios, e isso pode ser atribuído a dificuldades no processo de homogeneização e também a diferenças de granulometria entre a matriz alimentícia e a mistura de nutrientes usada para fortificação. A matriz (farinha de milho) apresenta uma irregularidade no tamanho de partículas que chegam até 590 micras, o que é comum ao produto, (CARAMURU ALIMENTOS, 2006); enquanto a mistura de nutrientes tem uma granulometria menor. O recomendável é que a matéria-prima usada para produção da mistura de nutrientes tenha granulometria de 45 micras, podendo chegar a 75 micras (GERMANI, 2001). Essas diferenças entre a matriz alimentícia e a mistura de nutrientes usada para fortificação, geram dificuldades na homogeneização.

Pode-se considerar que durante o período de armazenamento a vitamina manteve sua estabilidade e que os baixos valores encontrados sejam devidos a uma amostra não uniforme. Esta afirmação pode ser feita pois, segundo dados da literatura, o ácido fólico é o congênere mais estável do grupo dos folatos e os estudos realizados sobre a estabilidade de ácido fólico adicionado em produtos a base de cereais, constataram que essa vitamina manteve sua estabilidade no produto em que foi adicionada durante 6 meses, em temperatura de 23°C (FENNEMA, 1996).

Neste estudo foi observado que em relação à estabilidade do ácido fólico em farinha de milho fortificada, a variável que se refere à homogeneização se sobrepõe àquela que se refere ao tempo de estocagem e aos fatores que são comumente relacionados ao período de armazenamento, como temperatura e estabilidade a oxidação, que poderiam influenciar negativamente na estabilidade da vitamina. Neste caso o tempo de armazenamento é menos crítico para o produto do que as limitações no processo de distribuição da vitamina.

VII CONCLUSÕES

O método de análise cromatográfica foi validado através dos parâmetros de linearidade, exatidão, precisão, seletividade, limites de detecção e quantificação para amostras de farinha de milho fortificada com ácido fólico.

Quando o ácido fólico foi utilizado isoladamente e em combinação com sais de ferro (ferro reduzido, fumarato ferroso e sulfato ferroso) para o enriquecimento de farinha de milho, não foi verificada diferença significativa entre as amostras com relação à concentração de vitamina durante o armazenamento.

Não houve influência significativa sobre a estabilidade da vitamina, na estocagem sob as temperaturas de 25°C ou 35°C.

Considerando as concentrações observadas desde o tempo de 0 dias até o tempo de 120 dias, não foi constatada alteração significativa na concentração de ácido fólico sob as condições estudadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES

A fortificação de alimentos vem sendo utilizada como estratégia para combater a deficiência de vitaminas, porém para que o resultado esperado seja realmente alcançado é preciso garantir, ao menos, que o nutriente adicionado seja encontrado na concentração adequada proposta por lei.

Todo processo que inclui mudanças em procedimentos já estabelecidos precisa ser cuidadosamente realizado, e isto inclui a adição de ácido fólico no processo de produção de farinha de milho. Por força da lei, a adição desta vitamina em farinha de milho tornou-se obrigatória e as indústrias tiveram um prazo para adequar seu processo de produção. Porém este ainda não está totalmente otimizado, o que pode comprometer seriamente os objetivos da fortificação. Dentre os fatores que podem estar relacionados com este problema, a homogeneização tem uma grande influência.

A etapa de homogeneização tem se mostrado crítica no processo de adição de ácido fólico em farinha de milho e, como este produto alimentício já tem um processo de produção estabelecido, seria muito difícil alterá-lo na intenção de melhorar a distribuição da vitamina. Por este motivo uma alternativa seria uma modificação na mistura de nutrientes que é usada para realizar a fortificação. Uma sugestão, nesse sentido, pode ser a complexação da vitamina com algum componente que possa melhorar a sua distribuição, tornando suas partículas mais compatíveis com a farinha de milho.

Se a tecnologia de produção puder ser melhorada, é possível que o problema detectado a respeito da concentração da vitamina no produto seja solucionado, pois em relação a outros fatores o ácido fólico mostrou-se estável, seja em relação à temperatura ou à combinação com o mineral ferro.

As amostras 1 (farinha de milho fortificada com ácido fólico e ferro reduzido) e 2 (farinha de milho fortificada com ácido fólico e fumarato ferroso) estocadas a 25°C, e a amostra 3 (farinha de milho fortificada com ácido fólico e sulfato ferroso) estocada a 35°C, apresentaram dados com maior dispersão em relação a concentração da vitamina. Os valores que discordaram do conjunto de dados nas amostras são considerados consequência da dificuldade em se obter um produto final homogêneo.

Pode-se observar que embora fatores físicos e químicos não estejam afetando a estabilidade da vitamina de forma significativa, a tecnologia do processo de fortificação precisa ser otimizada. Desta forma será possível garantir um produto com distribuição homogênea do ácido fólico e que corresponda as exigência legais, atingindo os objetivos a que se propõe.

É importante considerar essas informações para que o programa de fortificação não seja utilizado apenas como uma forma de atrair o consumidor, mas como uma maneira de satisfazer as necessidades relacionadas à sua saúde.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, M.J.; KHAN, M.A.; AHMAD, I.. High performance liquid chromatographic determination of folic acid and its photodegradation products in the presence of riboflavin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 95-99, 1997.

AMAYA- FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M.. DRI: Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, 14 (1): p. 71-78, jan-abr, 2001.

ANTUNES, A. J.. Perdas de nutrientes no processamento de alimentos. **Primeiro Seminário Brasileiro de alimentos enriquecidos**. p 08-14. Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1994.

ARAÚJO, J. M.. **Química de alimentos**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 335p, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO (ABIMILHO). **Milho e suas riquezas. Processos industriais e aplicações**. Disponível em: <www.abimilho.com.br>. Acesso em agosto de 2004.

BALL, G.M.F.. **Water-soluble vitamin assays in Human Nutrition**. 1st edition, Chapman & Hall, 1994.

BARBER, R.C., et al. Minireview: The role of folato transport and Metabolism in neural tube defects risk. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 66, p. 1-9, 1999.

BIANCARELLI, A.. CNBB quer reverter decisão da justiça. **Folha de Londrina**, Londrina, 4 de jul. 2004. Paraná/Geral, p. 12.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2^a edição, São Paulo: Livraria Varela, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência de Saúde Assessoria de Imprensa da ANVISA. **Farinha terá ácido fólico para combater anencefalia em bebês**. Brasília, 28 de maio de 2002. Disponível em <www.anvisa.gov.br/divulga/alertas/2002/120602.htm>. Acesso em junho de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n ° 344, de 13 de dezembro de 2002.** Aprova o Regulamento Técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Brasília: D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder executivo, de 18 de dezembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RCD n ° 269, de 22 de setembro de 2005.** Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da saúde. SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria n ° 31, de 13 de janeiro de 1998.** Aprova Regulamento Técnico Referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder executivo, de 16 de janeiro de 1998.

CARAMURU ALIMENTOS. **Produtos.** Disponível em <www.caramuru.com/interna/produtos/flocomil>. Acesso: janeiro de 2006.

CARVALHO, P. R. N.. Enriquecimento de alimentos. **Primeiro Seminário Brasileiro de alimentos enriquecidos.** p01 -07. Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1994.

CATHARINO, R. R.. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos.** 2000. 126p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

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

CATHARINO, R. R. ; GODOY, H.T.. Extração em fase sólida para determinação de ácido fólico em leites enriquecidos e produtos lácteos. **Revista Analytica.** n ° 7, p. 43-47, out./nov. 2003.

CATHARINO, R. R. ; GODOY, H. T. ; LIMA, J. A. . HPLC determination of folic acid in breakfast cereals and cereal flakes. **Italian Food Beverage Technology – XXXV** , p 26-30, march – 2004.

CATHARINO, R. R. ; GODOY, H. T. ; LIMA, J. A.. Metodologia para determinação simultânea de folatos, B2 e B12 por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Analytica**, p 26-29, nov.2002, n ° 2.

CATHARINO, R.R.; VISENTAINER, J.V.; GODOY, H.T.. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23(3): 389-395, set-dez. 2003.

CECCHI, H. M.. **Fundamentos técnicos e práticos da análise de alimentos**. 2ª edição revista – Campinas, SP. Editora da UNICAMP, 2003.

CIOLA, R.. **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho**. Editora Edgard Blücher Ltda. 1998.

COLLINS, S. H. ; BRAGA, G. L. ; BONATO, P. S.. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ª edição. 279p. Campinas; Editora da UNICAMP, 1990.

CUNNIFF, P. (Ed). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17 ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland. 1997.

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

DONNELLY, J.G.. Folic acid. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 38(3), p.183-233, 2001.

FENNEMA, O. (ed). **Food Chemistry**. 3rd. Marcel Dekker. 1996.

FINGLAS, P. M.. Folates and health. In: **6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos – SLACA** – Ciência de alimentos: abrindo caminhos para o desenvolvimento científico, tecnológico e industrial. Resumo das palestras. p. 14-15. Campinas, 2005.

FINGLAS, P.M., et al. Standardization of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, v. 64, p. 245-255, 1999.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.. **Farmacologia Clínica – Fundamentos da terapêutica racional** 2ª edição. Guanabara Koogan. 1998.

GERMANI, R. et al. **Manual de fortificação de fubá e flocos de milho com ferro**. Rio de Janeiro: EMBRAPA: Agroindústria de alimentos, 56p. 2001.

GONÇALVES, C.F.F. **Estatística**. Editora UEL. Londrina, 2002.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a edição. Rio de Janeiro. McGraw-Hill, 2003.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9^a edição. McGraw-Hill Interamericana editores, 1996.

GREGORY, J. F.; DAY, B. P. F.; RISTOW, K. A. Comparison of high performance liquid chromatographic, radiometric and *Lactobacillus casei* methods for the determination of folacin in select foods. **Journal of Food Science**, V 47, p 1568-1571, 1982.

HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**. V.54,n.1, pg 67 A- 76.

JORDE, L. B., et al. **Genética Médica**. 3^a edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2004.

JOSHI, R. et. al. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence fo possible antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**. Vol.30, n° 12, p. 1390-1399, 2001.

KOROKOLVAS, A.; BURCKHALTER, J.H.. **Química farmacêutica**. Guanabara Koogan. 1998.

KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C.. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001.

LEENHEER, P. DE ; LAMBERT, W. E.; NELIS, H. J.. **Modern chromatographic analysis of vitamins**. 2nd edition. Chromatographic Science Series volume 60. Marcel Dekker, 1991.

LIM, C.K.. **HPLC of small molecules: a practical approach** (The practical approach series) IRL Press Limited, 1986.

LIMA, J. A.. **Contribuição ao estudo do ácido fólico em alimentos enriquecidos**. 2001. 93p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos – estudo de vida de prateleira. **Ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, 24 (1): p 082-087, jan-mar. 2004.

LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.. HPLC methodology for folic acid determination in enriched wheat flour and bread. **Tecnica Molitoria International**. P 151-158, march 2004.

LIMA, J. A. ; GODOY, H. T.. Ácido fólico e folatos: importância e estabilidade. **Boletim SBCTA**, 35 (1/2): 65-73, jan-dez 2001.

LIMA – PALLONE, J. A.; GODOY, H. T. Avaliação preliminar do processo de enriquecimento de farinhas de milho com ácido fólico. In: **6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos – SLACA** – Ciência de alimentos: abrindo caminhos para o desenvolvimento científico, tecnológico e industrial. Resumo. Campinas, 2005.

LUCOCK, M.D. et al. Optimisation of chromatographic condition for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. **Food Chemistry**, v. 53, p.329-338, 1995.

MOINHOS VERA CRUZ. **O enriquecimento de farinha de trigo e seus benefícios**. Disponível em: <www.moinhosveracruz.com.br>. Acesso: janeiro de 2006.

MRC Vitamin Study research Group. Prevention of neural tube defects: results of the MRC vitamin study. **Lancet**, 338:131-137, 1991.

NEUHouser, M. L. ; BERESFORD, S. A. A.. Folic acid: are current fortification levels adequate? **Nutrition**. 17:868-872, 2001.

NUTRIMILHO - INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE ALIMENTOS LTDA. **Produtos nutrimilho**. Disponível em: <www.nutrimilho.com.br>. Acesso: janeiro de 2006.

OSSEYI, E. S.; WEHLING, R. L.; ALBRECHT, J. A.. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography A**, 826 , p235-240, 1998.

OTTO, P. G. ; OTTO, P. A. ; PESSOA, O. F.. **Genética Humana e Clínica**. 2^a edição. São Paulo. Roca, 2004.

PARFITT, K. (Ed). **Martindale: The complete drug reference**. Thirty-second edition. Pharmaceutical Press, 1999.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H.. **Ciência de los alimentos**. Zaragoza (España). Editorial Acribia, S.A.. 1999.

PRODUTOS ROCHE QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS S/A. **Vitaminas**. Disponível em : <www.roche.pt/emagrecer/vitaminas/index.cmf>. Acesso: janeiro de 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.. **Farmacologia**. 3^a edição. Editora Guanabara Koogan S.A. 1997.

RUSIG, O.. Formas comerciais de vitaminas e minerais. **Primeiro Seminário Brasileiro de alimentos enriquecidos**. p 27-31. Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1994.

SADLER, T. W.. **Langman - Embriologia Médica**. 8^a edição. Editora Guanabara Koogan S.A. 2001.

SALINAS, R. D.. **Alimentos e nutrição: introdução à bromatologia**. 3^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2002.

SENAI. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **Resposta técnica, assunto: alimentos e bebidas. Identificação da demanda: agroindústria de farinha de milho e trigo**. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br>> Acesso: janeiro de 2006.

SILVA, M. G. Análise de ácido fólico e ferro em farinhas de trigo e de milho. In: **III Seminário Brasileiro de Alimentos Enriquecidos. e I Encontro de Analistas de Micronutrientes (Vitaminas e Minerais) em Alimentos**. Palestra apresentada em meio digital. Campinas, 10 de maio de 2005. Disponível em < www.ital.sp.gov.br>. Acesso em maio de 2005a.

SILVA, M. G. Determinação de ácido fólico em amostras de farinha de trigo, milho e mix. Revisão 3. **Método analítico M.A. – C.Q. 042**. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). 2005b.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5ª edição. Guanabara Koogan. 1998.

UNICEF and the Micronutrient Initiative. **Vitamin & Mineral deficiency – a global progress report**. Disponível em :
<www.weforum.org/pdf/Initiatives/GHI_2004_UNICEF_MI.pdf> Acesso: janeiro de 2006.

USP 23: **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**, inc. 1995.

USP 29: **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**, inc. 2006.

VATHERISTO, L. , et. al. Third EU MAT intercomparison study on food folate analysis using HPLC procedures. **Food Chemistry**, vol 57, n ° 1, pp 109-111. 1996.

VIÑAS, P., et al. Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. **Journal of Chromatography A**, 1007, p. 77-84, 2003.

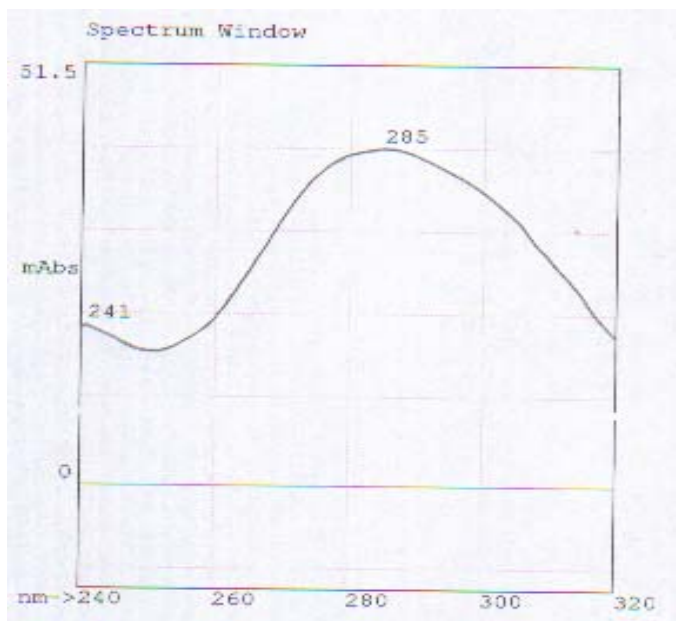
VORA, A.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. S.. Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, 392-393, p209-220, 2002.

WERLER, M. M.; SHAPIRO, S.; MITCHELL, A. A.. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. **Journal of the American Medical Association**. 269: 1257-1261, 1993.

ZANCUL, M. S.. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. **Revista do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Medicina**. Ribeirão Preto , 37: 45-50, jan-jun. 2004.

ANEXOS

Espectro de absorção do padrão de ácido fólico



Espectro de absorção de ácido fólico em farinha de milho

