

CARLOS MÁRIO MARTINS SILVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E NUTRICIONAL, ACEITAÇÃO
SENSORIAL E ESTABILIDADE DE ÁCIDO FÓLICO E TIAMINA EM ARROZ
FORTIFICADO (ULTRA RICE®) APÓS DIFERENTES TÉCNICAS DE
COCCÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

CARLOS MÁRIO MARTINS SILVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E NUTRICIONAL, ACEITAÇÃO
SENSORIAL E ESTABILIDADE DE ÁCIDO FÓLICO E TIAMINA EM ARROZ
FORTIFICADO (ULTRA RICE®) APÓS DIFERENTES TÉCNICAS DE
COCCÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada em: 01 de agosto de 2012

Prof.^a. Ana Vlândia Bandeira Moreira
(Coorientadora)

Prof.^a. Maria Sônia Lopes Duarte

Prof. José Benício Paes Chaves

Prof.^a. Mônica Ribeiro Pirozi

Prof.^a. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana
(Orientadora)

“O sol nasce, o sol se põe,
mostrando que o tempo é apenas
a mudança de nós mesmos,
da mesma forma os momentos
felizes e infelizes se sucedem,
mostrando que tudo passa
e tudo recomeça.

O que permanece é a esperança.”

(autor desconhecido)

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar

Confie em si mesmo

Quem acredita sempre alcança!”

(“Mais uma vez” - Renato Russo)

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

(Fernando Pessoa)

“Saber não é suficiente; devemos aplicar.
Vontade não é suficiente; devemos fazer”.
(Goethe)

Agradeço a Deus por me guiar neste longo caminho, cheio de obstáculos, chamado vida.

Dedico aos meus pais, Maria das Graças (em memória) e Carlos Mário, à minha irmã Débora e ao meu tio e padrinho Luiz.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de realização da graduação e do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof^a. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana, pela disponibilidade em me orientar, convivência, apoio e amizade ao longo do mestrado.

À Prof^a Sílvia Eloiza Priore e Sílvia do Carmo Castro Franceschini pela amizade, carinho e incentivo para ingressar no mestrado.

À Ceres Della Lúcia (Deusa do grão) por compartilhar seus conhecimentos, pela ajuda e amizade neste período.

Ao Sérgio Segall pela amizade e apoio que nos deu nesta pesquisa.

Às Prof^{as} Hércia Stampini Duarte Martino e Ana Vlória Bandeira Moreira pela ajuda e coorientação no desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a. Fátima Aparecida Ferreira de Castro, pela concessão do Laboratório de estudo Experimental dos Alimentos.

À Prof^a. Renata Aparecida Mendes pela ajuda e orientação na análise microbiológica.

À Maria Inês de Souza Dantas pela orientação na análise sensorial.

À Rita Stampini pela amizade e disponibilidade para nos atender na secretaria do PPGCN.

À Mimorina pelas conversas e eventuais ajudas no período do mestrado.

À Isabel pela amizade e excelente ajuda na análise sensorial.

Ao Ricardo pela ajuda nas análises de composição centesimal.

À Nininha pelo “bom dia sorridente” na correria do dia a dia.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Saúde e Nutrição pelos ensinamentos e colaborações.

Aos vitaminado(a)s Tibério, Galdino, Kellen, Vivian, Laura e Jéssica, pela oportunidade de convivência, ajuda e amadurecimento no Laboratório de Análise de Vitaminas (LAV).

Ao Leandro Cardoso (Léo) pela amizade e disponibilidade em ajudar.

À Taty (batatinha), Renata Gomide e Soraia Pinheiro pela amizade, conversas, brincadeiras e disponibilidade em ajudar nas atividades de pesquisa. Obrigado pela força que vocês me deram.

Às amigas Cristiana (Crissss), Daniela (Dani bananinha), Flavia Xavier , Luiza e Nathalia (Nat) pelos momentos de diversão e apoio quando mais precisei. Serei eternamente grato.

À Dorina pela ajuda na análise de fibras. Obrigado Dodô.

À Damiana (Dami) e Fabiana Rodrigues pela amizade e ajuda nos momentos necessários.

À Cleize, Cláudia, Reinaldo, Vitinho, Carla, Alfredo e Rosângela. Agradeço a Deus por ter colocado vocês em meu caminho. Obrigado pela amizade, torcida e nossos “raros e curtos” churrascos de final de semana.

À minha avó, tios e tias que sempre torceram pelo meu sucesso. Muito obrigado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigado.

BIOGRAFIA

Carlos Mário Martins Silveira nasceu em 20 de agosto de 1974, no município de Governador Valadares, Minas Gerais.

Em abril de 1998, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa (MG), concluindo-o em março de 2003. Foi bolsista de extensão pelo Programa de Atenção à Saúde do Adolescente (PROASA) de março a outubro de 2000. Trabalhou como nutricionista responsável pela produção de refeições na GR/SA no período de julho de 2003 a novembro de 2009.

Em agosto de 2010, ingressou no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa (MG), atuando na linha de pesquisa 'Dietética e Qualidade de Alimentos' e pleiteou o título de mestre em agosto de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. METODOLOGIA GERAL	4
3.1. Matéria-prima	4
3.2. Equipamentos	4
3.3. Reagentes e outros materiais.....	5
3.4. Caracterização microbiológica dos grãos crus de UR [®]	6
3.4.1. Preparação dos meios de cultura	6
3.4.1.1. Meio BDA (Agar Batata Dextrose)	6
3.4.1.2. Meio BP (Agar Baird-Parker)	6
3.4.1.3. Meio MYP (Agar manitol gema de ovo polimixina)	7
3.4.1.4. Meio LST (Lauril Sulfato Triptose)	7
3.4.1.5. Água peptonada.....	7
3.4.1.6. Caldo lactosado	7
3.4.1.7. Caldo Rappaport-Vassiliadis.....	7
3.4.1.8. Caldo Selenito-Cistina	8
3.5. Análises Microbiológicas	8
3.5.1. Coliformes a 45 °C	8
3.5.2. <i>Salmonella</i> spp.	8
3.5.3. Fungos e Leveduras	8
3.5.4. <i>Bacillus cereus</i>	9
3.6. Caracterização da composição nutricional dos grãos crus de UR [®]	9
3.6.1. Umidade	9
3.6.2. Proteína	9
3.6.3. Lipídios	9
3.6.4. Cinzas.....	10
3.6.5. Fibra alimentar	10
3.6.5.3. Fibra alimentar insolúvel.....	11
3.6.5.4. Fibra alimentar solúvel	11
3.6.5.5. Fibra alimentar total.....	12
3.6.6. Carboidratos	12
3.6.7. Valor calórico	12
3.6.8. Determinação de ferro e zinco	12
3.7. Determinação de tiamina e ácido fólico	12
3.7.1. Extração de tiamina.....	13
3.7.2. Extração de ácido fólico	13
3.7.3. Curvas analíticas de tiamina e ácido fólico	14
3.7.4. Análise de tiamina e ácido fólico por CLAE	15
3.7.5. Identificação e quantificação de tiamina e ácido fólico.....	16

3.8. Testes para validação dos métodos de análise de tiamina e ácido fólico	16
3.8.1. Recuperação e faixa de linearidade	16
3.8.2. Limites de detecção e quantificação	17
3.8.3. Repetibilidade.....	17
3.9. Análise da estabilidade de tiamina e ácido fólico nas preparações após cocção	17
3.9.1. Técnicas de cocção em escala laboratorial	18
3.9.1.1. Cocção em água	18
3.9.1.2. Refogamento em óleo seguido de cocção em água	19
3.9.1.3. Cocção em água no forno de micro-ondas.....	19
3.9.2. Técnica de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição	19
3.9.3. Avaliação da estabilidade de tiamina e ácido fólico após cocção	19
3.10. Aceitação sensorial das preparações após diferentes técnicas de cocção	20
3.10.1. Seleção dos Julgadores	20
3.10.2. Teste de aceitação sensorial das preparações	20
3.10.3. Aspectos Éticos.....	21
3.11. Análise da contribuição das preparações para o suprimento das recomendações diárias de tiamina e ácido fólico	21
4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados	22
5. REFERÊNCIAS	22
6. RESULTADOS.....	26
6.1. Artigo 1.....	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4. CONCLUSÃO	42
5. REFERÊNCIAS	42
6.2. Artigo 2.....	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAIS E MÉTODOS	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÃO	68
6. REFERÊNCIAS	68
6.3. Artigo 3.....	71
RESUMO	72
ABSTRACT.....	73
1. INTRODUÇÃO.....	74
2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4. CONCLUSÃO	91
5. REFERÊNCIAS	92
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	96
ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	98
ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS.....	99

RESUMO

SILVEIRA, Carlos Mário Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2012. **Caracterização microbiológica e nutricional, aceitação sensorial e estabilidade de ácido fólico e tiamina em arroz fortificado (Ultra Rice[®]) após diferentes técnicas de cocção.** Orientadora: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana. Coorientadoras: Hércia Stampini Duarte Martino e Ana Vlândia Bandeira Moreira.

O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização microbiológica e nutricional de grãos crus de UR[®] fortificados com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico e avaliar a aceitação sensorial, o conteúdo e a estabilidade de ácido fólico e tiamina em preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido após diferentes técnicas de cocção. Foram realizadas análises microbiológicas nos grãos de UR[®] crus para a enumeração de coliformes a 45°C, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, fungos e leveduras, segundo metodologia preconizada por DOWNES e ITO (2001). A análise da composição nutricional dos grãos de UR[®] crus foi realizada por meio das técnicas recomendadas pela AOAC (2002). Foram otimizados métodos para análise do conteúdo de ácido fólico e tiamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a detector de arranjos de diodos (CLAE-FR-DAD) nos grãos de UR[®] crus e no UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção. O conteúdo de ferro e zinco foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica. O conteúdo e estabilidade de tiamina e ácido fólico foram avaliados após cocção em escala laboratorial (refogado em óleo de soja e cozido em água, cozido em água, e cozido em água em forno de micro-ondas) e em Unidade de Alimentação e Nutrição-UAN (cozido em água), utilizando o UR[®] adicionado ao arroz polido numa proporção de 1:100, totalizando 4 tratamentos e 5 repetições para extração de tiamina e ácido fólico. A análise estatística dos dados foi realizada com os tratamentos dispostos no delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se a análise de variância seguida do teste de Duncan ($\alpha = 5\%$) para comparação entre as médias. Para análise da aceitabilidade sensorial das preparações foi utilizada a escala hedônica de nove pontos, sendo avaliados os atributos odor, sabor, textura e impressão global. Os dados da aceitação foram avaliados por meio da análise de variância, seguida pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$), para comparação entre as médias e da técnica de mapa de preferência

interno, baseado no modelo de análise de componentes principais. O UR[®] cru apresentou contagem de micro-organismos ausente ou inferior ao permitido pela legislação sanitária. Em relação à composição nutricional do UR[®] cru foram encontrados (em 100g) 0,12 g de lipídios; 7,26 g de proteínas; 0,96 g de fibra alimentar total; 79,75 g de carboidratos; 821,24 mg de ferro; 142,15 mg de zinco, 161,72 mg de tiamina e 20,95 mg de ácido fólico. Os métodos otimizados apresentaram boa resolução dos picos das vitaminas pesquisadas e excelente recuperação para tiamina e ácido fólico (82,6 a 104% e 87,5 a 96% respectivamente), repetibilidade com desvio padrão relativo das áreas dos picos e dos tempos de retenção menor que 10% e altos coeficientes de determinação (0,9998 para tiamina e 0,9997 para ácido fólico). Os limites de detecção e quantificação foram baixos (0,00193µg e 0,0193µg para tiamina e 0,000934µg e 0,00934µg para ácido fólico, respectivamente), demonstrando alta sensibilidade. A preparação cozida em forno de micro-ondas apresentou conteúdo de tiamina estatisticamente maior (0,3627 mg/100g) que as demais preparações, enquanto que, para ácido fólico, não houve diferença significativa entre as preparações (conteúdo médio de 0,0759 mg/100g). Após as diferentes técnicas de cocção, as preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido apresentaram retenção bem mais elevada do ácido fólico (entre 75,69 a 96,11%) quando comparada àquela obtida para tiamina (entre 49,66 a 65,41%). A retenção de tiamina foi maior quando se utilizou a cocção em forno de micro-ondas (65,4%), enquanto que para as demais técnicas de cocção a retenção foi estatisticamente igual (média de 52,1%). Para ácido fólico, a maior retenção foi obtida com a preparação refogada em óleo e cozida em água (96,1%), sendo que para as outras técnicas de cocção não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Considerando-se uma porção de arroz, a preparação cozida em forno de micro-ondas pode contribuir com 37,5 a 64,2% das recomendações diárias de tiamina e 31 a 50,5% de ácido fólico, enquanto que a preparação refogada em óleo e cozida em água pode contribuir com 26 a 34,7% das recomendações diárias de tiamina e 32,5 a 52,8% das recomendações de ácido fólico para diferentes grupos etários. A aceitação sensorial das preparações foi satisfatória, sendo que em média, 83,9% dos escores situaram-se entre 6 e 9 (gostei ligeiramente a gostei extremamente) para todos os atributos avaliados. Em conclusão, os grãos de UR[®]

apresentaram adequado padrão microbiológico e composição nutricional similares ao arroz polido em termos de proteínas, lipídios e carboidratos, além de elevado conteúdo de ferro, zinco, tiamina e ácido fólico. Os métodos otimizados demonstraram confiabilidade e sensibilidade na detecção e quantificação de tiamina e ácido fólico em grãos crus de UR[®] e na mistura destes grãos com arroz polido, antes e após diferentes técnicas de cocção. Houve aceitação sensorial satisfatória e alta estabilidade do ácido fólico nas preparações, sendo que a cocção em forno de micro-ondas e aquela com refogamento em óleo seguida de cocção em água se destacaram, permitindo maior estabilidade das vitaminas. As preparações contendo UR[®] e arroz polido apresentaram bom conteúdo de ácido fólico e tiamina, sendo que uma porção pode contribuir de forma importante para o atendimento das recomendações diárias das vitaminas.

ABSTRACT

SILVEIRA, Carlos Mário Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2012. **Microbiological and nutritional characterization, sensory acceptance and stability of folic acid and thiamin in fortified rice (Ultra Rice[®]) after different cooking techniques.** Advisor: Helena Maria Pinheiro Sant`Ana. Co-Advisors: Hércia Stampini Duarte Martino and Ana Vlândia Bandeira Moreira.

This study aimed to characterize microbiologically and nutritionally raw grains of Ultra Rice[®] (UR[®]) fortified with iron, zinc, thiamine and folic acid and evaluate the sensory acceptance, content and stability of acid folic and thiamine in preparations of UR[®] added to polished rice after different cooking techniques. Microbiological analysis were performed in raw grains of UR[®] for coliforms enumeration at 45°C, *Salmonella spp*, *Bacillus cereus*, fungi and yeasts. The nutritional composition analysis of raw grains of UR[®] was made by the recommended techniques of AOAC (2002). Methods for analysis of acid folic and thiamine content were optimized by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography coupled to a photodiode array detector (RP-HPLC-DAD) in raw grains of UR[®] and in UR[®] added to polished rice, before and after cooking. Iron and zinc contents were determined by atomic absorption spectrometry. The content and stability of thiamine and folic acid were evaluated after cooking at laboratory scale (stir-frying before boiling, boiling, and boiling in a microwave oven) and in food service (boiling), using UR[®] added to polished rice following the proportion of 1:100, totalizing 4 treatments, with 5 repetitions for extraction and analysis of thiamine and folic acid. The statistical analysis was performed with the treatments arranged in a completely randomized design, using the Duncan's test ($\alpha = 5\%$) for comparison among treatment means. To analyze the sensory acceptance of the preparations, the nine-point hedonic scale was used, with the following attributes: odor, flavor, texture and overall impression. Acceptance data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test ($\alpha = 5\%$), for comparison among means. Also, the technique of internal preference map, based on the model of analysis of main components, was used. Raw UR[®] showed micro-organisms count absent or lower than allowed by health legislation. Regarding the raw UR[®] nutritional composition, it was found (in 100 g) 0.12 g of lipids; 7.26 g of

proteins; 0.96 g of total dietary fiber; 79.75 g of carbohydrates; 821.24 mg of iron; 142.15 mg of zinc, 161.72 mg of thiamine and 20.95 mg of folic acid. The optimized methods showed good resolution of peaks of the searched vitamins and excellent recovery for folic acid and thiamine (82 to 104% for thiamine and 87 to 96% for folic acid), repeatability with relative standard deviation of peak areas and of retention times lower than 10% and high coefficients of determination (0.9998 for thiamine and 0.9997 for folic acid). The detection and quantification limits were low (0.00193 µg and 0.0193 µg for thiamine and 0.000934 µg and 0.00934 µg for folic acid, respectively), demonstrating high sensibility to the optimized methods. Preparation cooked in microwave oven showed significantly higher thiamine content (0.3627 mg/100g) than the other preparations, while for folic acid, there was no significant difference among cooking techniques (average content of 0.07592 mg/100g). After the different cooking techniques, preparations of UR[®] added to polished rice showed higher retention of folic acid (75.69 – 96.11%) compared to that obtained for thiamine (49.66 - 65.41%). Thiamine retention was higher when microwave oven cooking method was used (65.4%), while for the other cooking techniques, retention was statistically equal (average of 52.1%). For folic acid, the highest retention was obtained when the technique of stir-frying before boiling was used (96.1%), while the other cooking techniques did not show significant difference ($p > 0.05$). Considering one portion of rice, the microwave cooked preparation may contribute from 37.5 to 64.2% of thiamine dietary recommendations and 32.5 to 52.8% of the recommendations of folic acid for different age groups. Sensory acceptance of the preparations was satisfactory and, in average, 83.9% of the scores were located between 6 and 9 (liked slightly to liked extremely) for all evaluated attributes. In conclusion, UR[®] grains presented adequate microbiological standard and centesimal composition similar to polished rice for proteins, lipids and carbohydrates, besides high content of iron, zinc, thiamine and folic acid. The optimized methods demonstrated reliability and sensitivity in the detection and quantification of thiamine and folic acid in raw grains of UR[®] and in the mixture of UR[®] grains with polished rice before and after different cooking techniques. Sensory acceptance was satisfactory and high stability of folic acid in the preparations was found. Cooking in a microwave oven and stir-frying before boiling stood out, allowing higher vitamins stability. Preparations

containing UR[®] and polished rice showed good content of folic acid and thiamine, and a portion may contribute in an important way for the attendance of daily vitamins recommendations.

1. INTRODUÇÃO

O consumo inadequado de alimentos fonte de micronutrientes pode conduzir a estados de carência nutricional e, conseqüentemente, a diversas manifestações patológicas (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ *et al.*, 1997). Devido em grande parte, às deficiências de micronutrientes, a insegurança alimentar e nutricional afeta cerca de 815 milhões de famílias ao redor do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (UNDERWOOD, 2003).

Entre as deficiências de micronutrientes, destacam-se as de ferro, zinco, vitamina A, tiamina e ácido fólico, as quais mesmo que em nível subclínico, são reconhecidas como um importante problema de saúde pública emergente e de caráter global. Essas deficiências acometem diferentes grupos populacionais e agravam o quadro de morbi-mortalidade, especialmente nos grupos mais vulneráveis, como as crianças em idade pré-escolar, gestantes e idosos (LÍBERA *et al.*, 2008).

A fortificação de alimentos tem sido recomendada como um método eficaz de prevenção das deficiências de micronutrientes em populações que se encontram em situação de risco nutricional (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003; BATISTA FILHO, 2004). Esse procedimento consiste na adição, especialmente de vitaminas e minerais, a alimentos acessíveis à maior parte da população (ZANCUL, 2004; VELLOZO; FISBERG, 2010). Dentre estes alimentos destacam-se os cereais e suas respectivas farinhas (SALGUEIRO *et al.*, 2002; BROGNOLI *et al.*, 2008).

Os cereais, em especial o arroz, o trigo e o milho, constituem a base da alimentação humana, contribuindo com cerca da metade da ingestão energética e protéica dos indivíduos (YOUNG ;PELLETT, 1994). Em relação ao arroz, estima-se que ele contribua com aproximadamente 20% e 15% do consumo de energia e de proteína, respectivamente (KENNEDY; BURLINGAME, 2003). Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2012), o arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo, caracterizando-se como um alimento habitualmente consumido por grande parte da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Marchi *et al.* (2004) destacam que, por ser um alimento habitual na dieta brasileira, a

fortificação deste cereal constitui-se numa importante estratégia de prevenção das deficiências de micronutrientes no Brasil.

A fortificação do arroz pode se dar através da tecnologia Ultra Rice[®] (UR[®]) na qual grãos de arroz quebrados e trincados que não apresentam valor comercial (aproximadamente 20% a 30% da colheita) e que são desviados para fins de alimentação animal ou fabricação de cerveja, podem ser transformados em farinha de arroz e combinados com um aglutinante e outros nutrientes (vitamina A, niacina, tiamina e ácido fólico) e minerais (ferro e zinco) por um processo de extrusão, sendo remodelados em grãos de arroz com o mesmo tamanho, forma e textura do arroz convencional (PATH, 1999). Os níveis dos agentes de fortificação podem ser concentrados no grão fortificado, de forma a ser misturado com o arroz convencional na proporção de 1:50 a 1:200 (LEE; HAMER; EITENMILLER, 2000).

De acordo com o *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH, 1999), a tecnologia de fortificação UR[®] protege os micronutrientes inseridos no interior do grão produzido, reduzindo a degradação e consequente perda dos nutrientes no período de armazenamento e etapas de preparação do arroz (lavagem e cocção).

No entanto, as vitaminas constituem o grupo de nutrientes mais susceptíveis a perdas durante a preparação dos alimentos, especialmente durante a etapa de cocção (TORRES, 2009). O tratamento térmico é um importante fator de degradação das vitaminas, podendo seu efeito variar de acordo com o tipo de alimento, o método e o tempo de cocção empregados (LEŠKOVÁ *et al.*, 2006). Outros fatores como presença de oxigênio, luz, umidade e pH podem contribuir para essas perdas. Dessa forma é importante quantificar as perdas durante a preparação do arroz fortificado, considerando-se as técnicas de preparo utilizadas no Brasil e possibilitando a avaliação dos níveis que poderão ser realmente ingeridos por grupos vulneráveis, especialmente as crianças em instituições de ensino.

Somando-se às perdas nutricionais, modificações nas características sensoriais do arroz enriquecido com UR[®] podem ocorrer após a cocção. Neste sentido, a análise sensorial das preparações de arroz submetidas a diferentes técnicas de cocção constitui um importante instrumento para medir e interpretar as reações produzidas e a forma como são percebidas pelos órgãos dos

sentidos humanos. Entre os diferentes métodos utilizados para avaliar a aceitação sensorial de alimentos, destacam-se a escala hedônica de nove pontos, utilizada para estudos de aceitação com adultos (SAMPAIO; FERREIRA ;CANNIATTI-BRAZACA, 2009) e a escala hedônica facial, amplamente utilizada para estudos com crianças (CECANE, 2010)

Além das modificações do valor nutricional e das características sensoriais, as contaminações microbiológicas podem ocorrer em todas as etapas pelas quais passam os produtos alimentícios, desde a colheita até o processamento, embalagem, transporte, estocagem e por diversos meios, seja o solo, a água ou o ar, incluindo os diversos contatos físicos, mecânicos ou manuais (FERREIRA NETO *et al.*, 2004).

Sendo o UR[®] um alimento com excelente potencial para a prevenção de carências de micronutrientes em populações em situação de risco nutricional, e visando subsidiar a elaboração de políticas na área e reforçar sua implementação com segurança em programas de alimentação e nutrição, o presente trabalho objetivou realizar a caracterização microbiológica e nutricional de um arroz fortificado com vitaminas e minerais, bem como avaliar a aceitação sensorial e a estabilidade de ácido fólico e tiamina no UR[®] adicionado ao arroz polido após técnicas de cocção em escala laboratorial e em Unidade de Alimentação e Nutrição.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização microbiológica e nutricional de um arroz fortificado (UR[®]) com vitaminas e minerais e avaliar a aceitação sensorial e estabilidade de ácido fólico e tiamina após diferentes técnicas de cocção do UR[®] adicionado ao arroz polido.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as características microbiológicas dos grãos crus de UR[®];
- ✓ Realizar a caracterização de grãos crus de UR[®] fortificados com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico em relação ao seu conteúdo de água, carboidratos, proteínas, lipídios, cinzas e fibras totais;
- ✓ Determinar o conteúdo de ferro e zinco nos grãos de UR[®] crus;

- ✓ Otimizar métodos para análise de tiamina e ácido fólico nos grãos de UR[®] crus e no UR[®] adicionado ao arroz polido;
- ✓ Avaliar a aceitação sensorial do UR[®] adicionado ao arroz polido após técnicas de cocção em escala laboratorial (refogado em óleo de soja e cozido em água, cozido em água e cozido em água no forno de micro-ondas) e em Unidade de Alimentação e Nutrição (cozido em água);
- ✓ Determinar o conteúdo de ácido fólico e tiamina nos grãos de UR[®] crus e no UR[®] adicionado ao arroz polido após diferentes técnicas de cocção;
- ✓ Avaliar a estabilidade de ácido fólico e tiamina no UR[®] adicionado ao arroz polido após diferentes técnicas de cocção;
- ✓ Avaliar a contribuição do UR[®] adicionado ao arroz polido após diferentes técnicas de cocção para o suprimento das recomendações diárias de tiamina e ácido fólico, de acordo com as *Dietary reference intakes* (DRIs) para diferentes faixas etárias e sexo;

3. METODOLOGIA GERAL

O presente estudo foi desenvolvido nos laboratórios de Análise de Vitaminas, Análise de Alimentos, Higiene de Alimentos, Desenvolvimento de Novos Produtos e Análise Sensorial e Estudo Experimental dos Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde e no Laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1. Matéria-prima

Foram utilizados arroz fortificado (UR[®]) com ferro (sob a forma de pirofosfato férrico), zinco (sob a forma de óxido de zinco), tiamina (sob a forma de mononitrato de tiamina) e ácido fólico, produzido a partir de farinha de arroz, pela técnica de extrusão, por um fabricante de massas alimentícias (Adorella Alimentos Ltda), localizada em Indaiatuba, São Paulo, Brasil e cedidos gentilmente pelo *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH), e arroz polido tipo 1, classe longo fino, obtido em comércio local na cidade de Viçosa, Minas Gerais..

3.2. Equipamentos

Para as análises químicas foram utilizados: moinho analítico (Quimis, Q298A), balança semi-analítica (Gehaka, BG 2000), balança analítica digital

(Gehaka, AG 200), pHmetro (Hexis, UB10), dessecador, cadinhos de vidro (ASTM 40-60mesh), extrator Soxhlet (Eletrothermo, 500WX), mufla (Quimis[®], modelo 318), agitador de tubos (AP, 56), destilador de nitrogênio (Solab), bloco digestor (Gerhardt, Kjeldatherm), espectrofotômetro de emissão de plasma (Perkin Elmer-Optima 3300 DV, Norwalk, USA), bomba de vácuo (Tecnal, TE-058), banho metabólico (Marconi[®], modelo MA 093), autoclave vertical (Phoenix, AV 30), estufa de cultura (002 CB).

Para o preparo das amostras para análise de tiamina e ácido fólico foram utilizados: processador doméstico de alimentos (Faet Multipratic, MC5), Moinho analítico (Quimis, Q298A), microtritador (Marconi, MA 102), balança semi-analítica (Gehaka, BG 2000), balança analítica digital (Gehaka, AG 200), balança digital (Trentin, BT-001), pHmetro (Hexis, UB10), bomba de vácuo (Tecnal, TE-058), centrífuga (Excelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 mL, Fanem, 206-R), agitador magnético (Marconi, MAO 89), espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60S), sistema de filtração para fase móvel (All Glass), sistema de ultrapurificação de água (Millipore, Direct Q UV 3) e degaseificador ultrassônico (Odontobrás, T-14).

Para análise de tiamina e ácido fólico foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, SCL 10AT VP) composto de bomba de alta pressão (LC-10AT VP), injetor automático com alça de amostragem de 500 µL (SIL-10AF) e detector de arranjos de diodos (DAD) (SPD-M10A).

3.3. Reagentes e outros materiais

Para análise de tiamina e ácido fólico foram utilizados os seguintes reagentes grau HPLC: sal sódico do ácido hexano sulfônico (Sigma-Aldrich, Alemanha); sal sódico do ácido heptano sulfônico (Sigma-Aldrich, Alemanha); ácido acético glacial (Tedia, Brasil); água ultrapura produzida em sistema Milli-Q[®] (Millipore, EUA); metanol (Tedia, Brasil) e trietilamina (Tedia, Brasil). Também foi utilizado hidróxido de potássio (Vetec, Brasil) e fosfato de sódio monobásico anidro (Synth, Brasil) com grau de pureza para análise (p.a.).

Para a filtração das amostras foram utilizados papel de filtro n^o JP41 J. (Prolab, Brasil), seringas descartáveis esterilizadas de 3 mL (TKL, China),

unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 µm de porosidade (Millipore, Brasil).

O padrão de tiamina foi obtido da Sigma-Aldrich, Alemanha, e o de ácido fólico, da Isofar, Brasil.

3.4. Caracterização microbiológica dos grãos crus de UR®

A caracterização microbiológica do UR® cru foi realizada de acordo com o preconizado pela *American Public Health Association* (DOWNES ;ITO, 2001), sendo feitas análises para a enumeração de coliformes a 45 °C, *Salmonella* spp, *Bacillus cereus*, fungos e leveduras, segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001).

Para cada micro-organismo avaliado foram contadas as colônias típicas nos meios de cultura, conforme Downes e Ito (2001), e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), utilizando-se a seguinte fórmula para cálculo:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{m\u00e9dia do n\u00b0 col\u00f4nias t\u00edpicas} \times \text{FD}}{\text{Al\u00edquota (mL)}}$$

FD= fator de diluição, correspondente ao inverso da diluição utilizada.

3.4.1. Preparação dos meios de cultura

3.4.1.1. Meio BDA (Agar Batata Dextrose)

Foram pesados 15,6 g de BDA e dissolvidos em 400 mL de água destilada. A solução foi previamente autoclavada (121 °C por 15 minutos) e armazenada assepticamente. O BDA foi fundido em forno micro-ondas e deixado em repouso para resfriamento. Acrescentou-se 1 mL de ácido tartárico ao meio e mediu-se o PH com o auxílio de fita dosadora (pH ± 3,5). A solução foi distribuída assepticamente em 26 placas (aproximadamente 15 mL em cada placa) em capela de fluxo laminar.

3.4.1.2. Meio BP (Agar Baird-Parker)

Foram pesados 24,42 g de BP e dissolvidos em 400 mL de água destilada. A solução foi previamente autoclavada (121 °C por 15 minutos). Acrescentou-se assepticamente 10,63 mL de emulsão de gema de ovo e 2,12

mL de telurito de potássio. Esta mistura final foi distribuída assepticamente em 26 placas (aproximadamente 15 mL em cada placa).

3.4.1.3. Meio MYP (Agar manitol gema de ovo polimixina)

Foram pesados 20,44 g de MYP e dissolvidos em 400 mL de água destilada. A solução foi previamente autoclavada (121 °C por 15 minutos). Acrescentou-se assepticamente 22,22 mL de emulsão de gema de ovo e 0,44 mL de sulfato de polimixina B. Esta mistura final foi distribuída assepticamente em 26 placas (aproximadamente 15 mL em cada placa).

3.4.1.4. Meio LST (Lauril Sulfato Triptose)

Foram pesados 8,544 g de LST e dissolvidos em 240 mL de água destilada. Em seguida foram pipetados 9 ml desta solução inicial e adicionados a 27 tubos de ensaio. Os tubos de ensaio contendo as respectivas soluções foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

3.4.1.5. Água peptonada

Foram pesados 1,375 g de água peptonada e dissolvidos em 550 mL de água destilada. Desta solução inicial foram pipetados 9 mL de solução salina peptonada 0,1% e acrescentados a sete tubos de ensaio, e 225 mL foram acrescentados a dois erlenmeyers de 500 mL. Os tubos de ensaio e os erlenmeyers com as respectivas soluções foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

3.4.1.6. Caldo lactosado

Foram pesados 5,85 g de caldo lactosado e dissolvidos em 450 mL de água destilada. A solução inicial foi dividida em dois erlenmeyers sendo acrescentado em cada um 225 mL de caldo lactosado. Os dois erlenmeyers contendo as respectivas soluções foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

3.4.1.7. Caldo Rappaport-Vassiliadis

Foram pesados 1,33 g de caldo Rappaport e dissolvidos em 50 mL de água destilada. A solução foi dividida em cinco tubos, cada um contendo 10 mL de caldo. Os tubos contendo a solução foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

3.4.1.8. Caldo Selenito-Cistina

Foram pesados 4,6 g de caldo selenito-cistina e dissolvidos assepticamente em 200 mL de água deionizada previamente autoclavada (121 °C por 15 minutos). A solução de selenito-cistina foi distribuída assepticamente em 22 tubos contendo 9 mL desta solução em cada tubo.

3.5. Análises Microbiológicas

3.5.1. Coliformes a 45 °C

Uma amostra de 25 g de UR[®] cru foi triturada em 225 mL de água peptonada em liquidificador previamente autoclavado (diluição 10⁻¹). Foram feitas mais duas diluições sucessivas (10⁻² e 10⁻³). Alíquotas de 1 mL destas diluições foram acrescentadas a três tubos contendo 9 mL de caldo LST com tubos de Durhan para identificação da formação de gases. Os tubos foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas (DOWNES; ITO, 2001)..

3.5.2. *Salmonella* spp.

Uma amostra de 25 g de UR[®] cru foi triturada em 225 mL de caldo lactosado em liquidificador previamente autoclavado e incubada em estufa a 37°C por 24 horas. Logo em seguida, alíquotas de 1 mL foram retiradas e acrescentadas a tubos contendo 9 mL de caldo Rappaport, e 9 mL de caldo selenito-cistina. Os tubos foram incubados a 37 ± 2 °C por 24 horas. Alçadas dos dois meios foram retiradas e estriadas em placas contendo Agar BPLS (*Brillant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar*). As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 24 horas (DOWNES; ITO, 2001).

3.5.3. Fungos e Leveduras

Uma amostra de 25 g de UR[®] cru foi triturada em 225 mL de água peptonada em liquidificador previamente autoclavado. Foram feitas diluições a 10⁻¹ e 10⁻² a partir da solução inicial e retiradas duas alíquotas de 0,1 mL das duas diluições. As alíquotas foram plaqueadas pelo método de espalhamento em placas contendo meio BDA e incubadas a 25 ± 2 °C por 48 horas (DOWNES; ITO, 2001).

3.5.4. *Bacillus cereus*

Uma amostra de 25 g de UR[®] cru foi triturada em 225 mL de água peptonada em liquidificador previamente autoclavado. Foram feitas diluições a 10^{-1} e 10^{-2} a partir da solução inicial e retiradas três alíquotas de 0,3 mL e uma de 0,1 mL da diluição 10^{-1} , e duas alíquotas de 0,1 mL da diluição 10^{-2} . As alíquotas foram plaqueadas pelo método de espalhamento em placas contendo meio MYP e incubadas invertidas a 30 ± 2 °C por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias típicas foram confirmadas por meio dos seguintes testes bioquímicos: utilização anaeróbica da glicose, decomposição de tirosina, teste de Voges – Proskauer, redução do nitrato e teste de motilidade (DOWNES; ITO, 2001).

3.6. Caracterização da composição nutricional dos grãos crus de UR[®]

3.6.1. Umidade

O teor de água foi determinado nas amostras de UR[®] cru, as quais foram colocadas em placas de petri previamente taradas e submetidas a aquecimento em estufa a 105 °C até peso constante, conforme o procedimento descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* AOAC (2002). Após secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador com sílica e gel e pesadas em balança analítica digital com precisão de 0,0001 g. A umidade foi calculada pela diferença de massa entre a amostra úmida e seca.

3.6.2. Proteína

A determinação de proteínas foi realizada segundo o método micro Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total, descrito pela AOAC (2002), utilizando-se fator de conversão igual a 5,25.

3.6.3. Lipídios

A determinação do teor de lipídios foi realizada por extração em aparelho Soxhlet, utilizando éter etílico como extrator, por 8 horas, sob refluxo, de acordo com a AOAC (2002).

3.6.4. Cinzas

A determinação da concentração de cinzas foi realizada por calcinação em mufla e o resultado expresso pela diferença de massa antes e após a calcinação, segundo descrito pela AOAC (2002).

3.6.5. Fibra alimentar

A determinação dos teores de fibra alimentar total (FAT), fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI) do UR[®] foi realizada por meio do método enzimático gravimétrico AOAC (2002).

Para hidrólise enzimática foram utilizadas α -amilase termorresistente, protease e amiloglicosidase (Kit Total dietary fiber assay, Sigma[®] TDF 100 A). Para a filtração foram utilizados cadinhos de vidro com placa de vidro sintetizado com porosidade n^o2 (ASTM 40-60 mesh) e celite como auxiliar de filtração. O teor de fibra alimentar total foi obtido somando-se as frações solúvel e insolúvel.

3.6.5.1 Preparo de cadinhos

Os cadinhos foram deixados de molho em detergente neutro (Chemco[®]) a 20% por 24 horas. Posteriormente, foram enxaguados com água destilada, sob vácuo, em dois sentidos (normal e oposto), secos em estufa a 105 °C por 1 hora e incinerados em mufla a 525 °C por 5 horas. Os cadinhos foram lavados 5 vezes com 20 mL de HCl 0,5 N e enxaguados três vezes com 20 mL de água destilada no sentido oposto. Foram secos em estufa a 105 °C por 12 horas, resfriados em dessecador contendo sílica e pesados. Foi pesado 1 g de celite e adicionado aos cadinhos que foram secos novamente a 105 °C por 12 horas e, posteriormente, pesados.

3.6.5.2. Obtenção do hidrolisado

Um grama de UR[®] cru, previamente desengordurado (por soxhlet), foi pesado em béquer de 600 mL, em duplicata, em balança com precisão de 0,1 mg. Foram adicionados em cada béquer, 50 mL de tampão fosfato pH 6,0. O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,2$, adicionando-se, quando necessário, NaOH 0,275 N ou HCl 0,325 N. Foi adicionado 0,1 mL de α -amilase termorresistente à suspensão. O béquer foi tampado com folha de papel alumínio e aquecido em banho-maria a 97 °C durante 30 minutos com agitação (100 rpm) a cada 5 minutos, e logo em seguida, resfriadas em temperatura ambiente. O pH foi

ajustado para $7,5 \pm 0,1$ com adição de aproximadamente 10 mL de NaOH 0,275 N. Em seguida, foi acrescentado 0,1 mL de protease (5 mg/0,1 mL) à suspensão pré-digerida e o béquer foi novamente tampado com folha de alumínio e incubado a 60 °C por 30 minutos, com agitação horizontal contínua (100 rpm). O hidrolisado foi resfriado à temperatura ambiente, sendo o pH ajustado para $4,3 \pm 0,3$ por meio do acréscimo de cerca de 10 mL de HCl 0,325 N. Finalmente, foi adicionado 0,1 mL de amiloglicosidase à solução e o béquer foi novamente tampado com folha de alumínio e incubado a 60 °C por 30 minutos com agitação horizontal contínua (100 rpm), para obtenção do hidrolisado final. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção do branco.

3.6.5.3. Fibra alimentar insolúvel

Inicialmente, o hidrolisado foi filtrado em cadinho com auxílio da bomba de vácuo. Em seguida, o resíduo do cadinho foi lavado com 10 mL de água destilada, repetindo o procedimento três vezes, lavando primeiramente o béquer que continha a amostra. O volume filtrado no kitasato foi transferido para um béquer de 600 mL, utilizando-se 320 mL de etanol 98% aquecido a 60 °C para lavar o kitasato, sendo esse material reservado para análise de fibra solúvel. Os cadinhos foram em seguida, lavados duas vezes com 20 mL de etanol a 95% e duas vezes com 20 mL de acetona. Os cadinhos foram secos em estufa a 105 °C durante 12 horas. Posteriormente, realizou-se análise de proteína e cinzas nos resíduos do cadinho (AOAC, 2002).

3.6.5.4. Fibra alimentar solúvel

O volume reservado na etapa de filtração da fibra insolúvel foi deixado em repouso à temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) durante 1 hora para precipitação. Os cadinhos foram lavados com 20 mL de etanol a 78% utilizando-se bomba de vácuo. Em seguida, o conteúdo reservado foi filtrado no cadinho com auxílio de bomba de vácuo. Estes foram lavados consecutivamente três vezes com volume de 20 mL de etanol a 78%, duas vezes com 20 mL de etanol a 95% e duas vezes com 20 mL de acetona. Posteriormente, o resíduo dos cadinhos foi colocado para secar em estufa a 105 °C durante 12 horas, procedendo-se à análise de proteínas e cinzas dos resíduos conforme descrito anteriormente.

3.6.5.5. Fibra alimentar total

A determinação da fibra alimentar total foi realizada pela soma das frações solúvel e insolúvel.

3.6.6. Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteínas, lipídios, fibra alimentar solúvel e insolúvel, teor de água e cinzas (AOAC, 2002).

3.6.7. Valor calórico

O valor calórico foi determinado de acordo com a composição do alimento em termos de proteínas (PTN), carboidratos (CHO) e lipídios (LIP), sendo utilizados os fatores de conversão 4; 4 e 9 kcal/g de CHO, PTN e LIP, respectivamente (FRARY; JOHNSON, 2005).

3.6.8. Determinação de ferro e zinco

Para determinação do teor de ferro e zinco foi pesado 1 g de amostra em tubo de digestão e foram adicionados 10 mL de ácido nítrico concentrado. Posteriormente os tubos foram aquecidos em bloco digestor com exaustão com temperatura inicial de 80 °C e aumento progressivo até 160 °C, permanecendo nesta temperatura por um período de 16 horas até a formação de solução límpida. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) e o conteúdo transferido para balões volumétricos de 50 mL (análise de ferro) e 25 mL (análise de zinco). Os tubos foram lavados com água deionizada e agitados em *vórtex* para evitar perdas e seus respectivos conteúdos vertidos nos balões volumétricos, até que o volume fosse completado. Todas as vidrarias utilizadas foram previamente desmineralizadas em solução de ácido nítrico 10% durante 12 horas e secas em estufa de circulação de ar (GOMES, 1996). A solução obtida foi utilizada para leitura do conteúdo dos minerais por espectrofotometria de absorção atômica.

3.7. Determinação de tiamina e ácido fólico

Durante as análises químicas os extratos foram mantidos sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e

cortinas do tipo *blackout*, e sob proteção do oxigênio pela utilização de vidrarias com tampas.

Para análise de tiamina e ácido fólico no UR[®] e UR[®] adicionado ao arroz polido crus, as amostras foram trituradas em moinho analítico, e para análise dessas vitaminas no UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção, as amostras foram homogeneizadas em processador doméstico de alimentos.

3.7.1. Extração de tiamina

Para extração de tiamina foram pesados em balança analítica digital, aproximadamente 1 g de UR[®] cru e 2 g do UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção. Acrescentou-se 22 mL de solução extratora, com base em Anyacora *et al* (2008), composta por solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1%. O pH da solução foi ajustado para 3,5 com KOH 10 M. A amostra foi homogeneizada em microtritador por aproximadamente 3 minutos e, logo em seguida, centrifugada a 4.000 rpm (1789g) em centrífuga de tubos por 7 minutos (UR[®] cru), 12 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido cru) e 15 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção). O sobrenadante foi filtrado à vácuo em funil de büchner utilizando-se papel de filtro. O filtrado foi retomado em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução extratora. O extrato foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4 °C ± 1 °C) até o momento da análise.

3.7.2. Extração de ácido fólico

Para extração de ácido fólico foram pesados em balança analítica digital, aproximadamente 1 g de UR[®] cru e 3 g de UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção. Acrescentou-se 22 mL de solução extratora, conforme Della Lucia *et al* (2011), composta por tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 ajustado com KOH 10 M. A amostra foi homogeneizada em microtritador por aproximadamente 3 minutos e, logo em seguida, centrifugada a 4.000 rpm (1789g) em centrífuga de tubos por 7 minutos (UR[®] cru), 15 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido cru) e 18 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção). O sobrenadante foi filtrado à vácuo em funil de büchner utilizando-se papel de filtro. O filtrado foi retomado em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução extratora. O extrato foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4 °C ± 1 °C) até o momento da análise.

3.7.3. Curvas analíticas de tiamina e ácido fólico

As soluções estoque (100 µg/mL) dos padrões de tiamina e ácido fólico foram preparadas em HCl 0,1 N e NaOH 0,1 M, respectivamente. A partir destas foram feitas soluções com concentrações crescentes dos padrões nas respectivas soluções extratoras para cada vitamina (solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1%, pH 3,5 para tiamina e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, para ácido fólico).

A concentração real dos padrões de tiamina e ácido fólico foi verificada por espectrofotometria e corrigida, utilizando-se as seguintes equações:

Para tiamina: $C \text{ (}\mu\text{g.mL}^{-1}\text{)} = \text{ABS} \times 10^4 / E^{1\%}_{1\text{cm}}$, em que C = concentração; ABS = absorvância máxima (lida a 247 nm); $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ = coeficiente de absorvidade molar (410; em solução de HCl 0,1N) (SWAN-CHOO; E-SIONG, 1996).

Para ácido fólico: $A = E^{1\%}_{1\text{cm}} \times C \times L$, em que A = absorvância máxima (lida a 282 nm); $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ = coeficiente de absorvidade molar (23,8; em solução de NaOH 0,1M) (BALL, 2006); C = concentração molar; L = largura da cubeta (1 cm).

As curvas analíticas para tiamina e ácido fólico foram elaboradas levando-se em consideração a concentração esperada para estas vitaminas no UR[®] cru e no UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção. Utilizou-se injeção em duplicata de soluções padrão, sendo que para tiamina foram injetados três concentrações crescentes de um mesmo volume e três volumes crescentes para uma mesma concentração, nas seguintes faixas: 0,014; 0,14; 0,37; 3,73; 5,59 e 7,463 µg/mL, e para ácido fólico, cinco concentrações crescentes para um mesmo volume de injeção e dois volumes crescentes para uma mesma concentração, nas seguintes faixas: 0,00477; 0,0095; 0,0477; 0,0954; 0,3340 e 0,95 µg/mL.

As curvas analíticas e equações de regressão utilizadas para cálculo de tiamina e ácido fólico estão apresentadas na Figura 1.

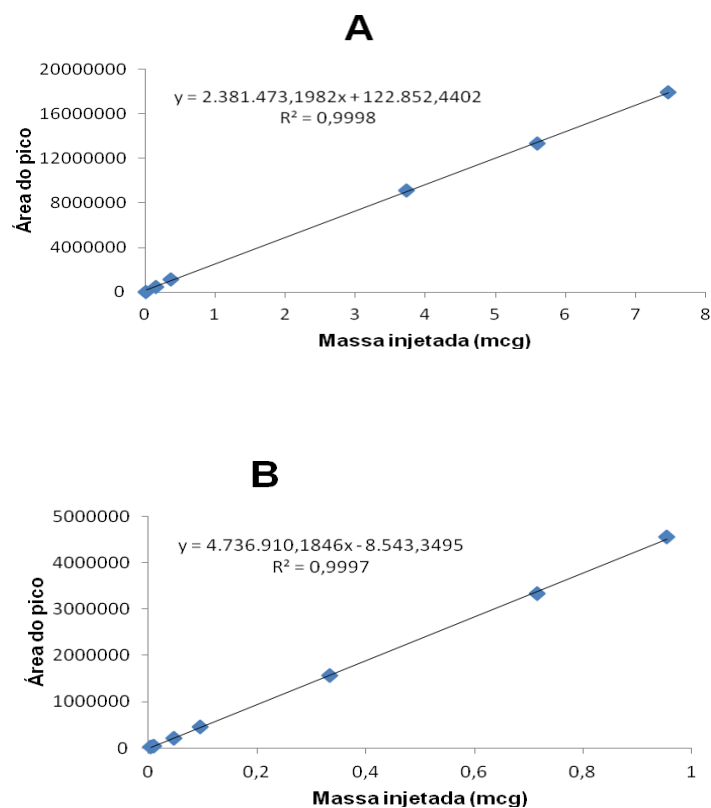


Figura 1. Curva analítica de tiamina (A) e ácido fólico (B).
 Eixo Y: Áreas médias dos picos obtidas pelas injeções em duplicata.

3.7.4. Análise de tiamina e ácido fólico por CLAE

O sistema de CLAE (Shimadzu, modelo SCL 10AT VP) empregado na análise de tiamina e ácido fólico foi composto de bomba de alta pressão, modelo LC-10 ATVP; injetor automático, com *loop* de 500 μ L (modelo SIL-10AF), e detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo 9SPD-M10 AVP). O sistema foi controlado pelo *Software Multi System* modelo *Class Vp* 6.12.

As condições cromatográficas utilizadas para análise de tiamina basearam-se em procedimento descrito por Anyakora et al (2008) e Dong et al (1988), com adaptações: fase móvel composta por solução de sal sódico de ácido hexano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (75:25), adicionada de trietilamina (0,1%), pH ajustado para 3,5 com KOH (10 M); coluna Phenomenex Gemini RP18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, equipada com coluna guarda Phenomenex ODS (RP18), 4 mm x 3 mm. A análise foi realizada em modo isocrático com fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 10 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 247 nm.

As condições cromatográficas utilizadas para análise de ácido fólico basearam-se em procedimento descrito por Anyakora et al (2008) e Dong et al (1988) com adaptações: fase móvel composta por solução de sal sódico de ácido heptano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (80:20), adicionada de trietilamina (0,1%), pH ajustado para 5,0 com KOH (10 M); coluna Phenomenex Gemini RP18, 250 x 4,6mm, 5 µm, equipada com coluna guarda Phenomenex ODS (RP18), 4 mm x 3 mm. A análise foi realizada em modo isocrático com fluxo de 0,7 mL/min e tempo de corrida de 12 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 282 nm.

A análise de tiamina e ácido fólico em cada amostra foi realizada em duplicata.

3.7.5. Identificação e quantificação de tiamina e ácido fólico

A identificação da tiamina e do ácido fólico nos extratos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos extratos com os obtidos para os padrões analisados sob as mesmas condições e por co-cromatografia. Para tiamina também foi utilizada a comparação dos espectros de absorção do padrão e das amostras, por meio do detector de arranjos de diodos (DAD).

A concentração de tiamina e ácido fólico no UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção foi calculada a partir das curvas analíticas e equações de regressão obtidas. A concentração real foi obtida por cálculos a partir das diluições realizadas.

3.8. Testes para validação dos métodos de análise de tiamina e ácido fólico

3.8.1. Recuperação e faixa de linearidade

Foram realizados testes de recuperação de tiamina e ácido fólico pela adição de soluções padrão aos extratos de UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção, na proporção de 20 a 100% da concentração média destas vitaminas no arroz fortificado e no UR[®] adicionado ao arroz polido submetido às diferentes técnicas de cocção. O percentual de recuperação foi calculado por meio da fórmula: % de recuperação = (concentração final da vitamina) - (concentração adicionada da vitamina) / (concentração inicial da vitamina) x 100. As análises foram realizadas em triplicata.

A determinação da faixa de linearidade das vitaminas foi realizada pela análise, em duplicata, de seis concentrações crescentes das soluções padrão de cada vitamina, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas empregadas para análise dos extratos. Os dados obtidos para as áreas dos picos foram usados para análise de regressão linear. O coeficiente de determinação (R^2) obtido em cada caso foi utilizado para avaliação da linearidade (LANÇAS, 2004).

3.8.2. Limites de detecção e quantificação

A avaliação do limite de detecção (LD) foi realizada por diluições sucessivas dos padrões de tiamina e ácido fólico, seguida da determinação da menor quantidade detectável, como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído da linha de base ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo 10 vezes o LD (CATHARINO; GODOY; LIMA-PALLONE, 2006).

3.8.3. Repetibilidade

O teste de repetibilidade foi realizado pela extração e análise da tiamina e ácido fólico, em quintuplicata, do UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção. A avaliação da repetibilidade foi realizada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das áreas dos picos e dos tempos de retenção dos componentes analisados (LANÇAS, 2004).

3.9. Análise da estabilidade de tiamina e ácido fólico nas preparações após cocção

A estabilidade de tiamina e ácido fólico foi avaliada nas preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido após três diferentes técnicas de cocção em escala laboratorial e um tipo de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição realizada no Restaurante Universitário da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

A quantidade de ingredientes *per capita* utilizada em cada técnica laboratorial e em Unidade de Alimentação e Nutrição para preparação do arroz encontra-se na Tabela 1. Em escala laboratorial, a preparação foi feita visando atender a uma família de quatro pessoas. Em Unidade de Alimentação e Nutrição, considerou-se a quantidade cozida em panelão americano de 300 litros, a qual pode servir aproximadamente 666 clientes, de um total de 4000 refeições servidas no almoço diariamente.

Nas técnicas de cocção em nível laboratorial, a mistura do UR[®] ao arroz polido, na proporção de 1:100, foi realizada pesando-se em balança analítica digital 2 g de UR[®] e em balança semi analítica digital 198 g de arroz polido (não lavado em água corrente). Posteriormente, a mistura foi realizada manualmente em recipiente de vidro. Para a técnica de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição foram pesados em balança semi-analítica digital 0,6 kg de UR[®] e 59,4 kg de arroz polido (previamente lavado em água corrente). A mistura dos grãos foi realizada após adição no panelão americano.

Tabela 1. Ficha técnica de preparo do UR[®] adicionado ao arroz polido na proporção de 1:100 em escala laboratorial (EL) e Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN).

Ingredientes	Peso Líquido (g ou mL) (EL)	Peso Líquido (kg ou L) (UAN)	Peso Bruto (g ou mL) (EL)	Peso Bruto (kg ou L) (UAN)
Arroz Polido	198	59,4	198	59,4
Ultra Rice	2	0,6	2	0,6
Água	600 ^a 400 ^b	60	600 ^a 400 ^b	60
Óleo de soja	20	5	20	5
Sal	5	2	5	2

Fonte: (ARAUJO ;MEDEIROS) FC: Fator de Correção

a – Cocção com e sem refogamento em óleo de soja

b – Cocção em micro-ondas

3.9.1. Técnicas de cocção em escala laboratorial

3.9.1.1. Cocção em água

Adicionou-se água (600 mL) em panela de alumínio fundido, com capacidade de 1 L, juntamente com óleo (20 mL) e sal (5 g). A água foi aquecida até ebulição, e logo em seguida, o UR[®] adicionado ao arroz polido (200 g) foi acrescentado. O cozimento foi feito em fogo baixo, com a panela semi-tampada por aproximadamente 12 minutos. Após secar a água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz foi homogeneizado e pesado.

3.9.1.2. Refogamento em óleo seguido de cocção em água

Adicionou-se óleo de soja (20 mL) em panela de alumínio fundido, com capacidade de 1 L, e levou-se ao fogo. O UR[®] adicionado ao arroz polido (200g) foi acrescentado juntamente com o sal (5 g) e refogado (aproximadamente 3 minutos). A água (600 mL) previamente aquecida até ebulição foi acrescentada. O cozimento foi feito em fogo baixo, com a panela semi-tampada, por aproximadamente 15 minutos. Após secar a água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz foi homogeneizado e pesado.

3.9.1.3. Cocção em água no forno de micro-ondas

Em recipiente de vidro apropriado foi acrescentado o UR[®] adicionado ao arroz polido (200g), sal (5 g), óleo (20 mL) e água (400 mL), que foi levado ao micro-ondas com o recipiente semi-tampado em potência alta (100%) por 8 minutos. Após este período, o recipiente permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos e, logo em seguida, o arroz foi homogeneizado e pesado.

3.9.2. Técnica de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição

Utilizou-se a cocção em água com preparação em panelão americano (capacidade de 300 L). Adicionou-se água (60 L) ao panelão juntamente com o óleo (5 L) e o sal (2 kg). Após aquecimento e ebulição da água, o UR[®] adicionado ao arroz polido foi adicionado. O cozimento foi feito com o panelão tampado por aproximadamente 40 minutos sob pressão média de vapor (800 a 1000 Kg/cm²). Após este período, o vapor foi desligado e o panelão permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos. Logo em seguida, o arroz foi homogeneizado e pesado.

3.9.3. Avaliação da estabilidade de tiamina e ácido fólico após cocção

A estabilidade das vitaminas foi calculada pela porcentagem de retenção de tiamina e ácido fólico nas preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido após as diferentes técnicas de cocção, sendo essa obtida considerando-se as alterações de peso sofridas pela mistura crua após a cocção. Para tanto,

utilizou-se a fórmula da retenção verdadeira ou real (% RR) (MURPHY; CRINER; GRAY, 1975), como descrito a seguir:

$$\% \text{ RR} = \frac{\text{Tcoz ou AFcoz (mg/g)} \times \text{Mcoz (g)}}{\text{Tc ou AFc (mg/g)} \times \text{Mc (g)}} \times 100$$

Em que:

Tcoz ou AFcoz = Conteúdo de tiamina ou ácido fólico em mg por grama da preparação cozida

Mcoz = Peso da preparação cozida

Tc ou AFc = Conteúdo de tiamina ou ácido fólico em mg por grama da mistura crua (UR[®] e arroz polido)

Mc = Peso da mistura crua (UR[®] e arroz polido)

3.10. Aceitação sensorial das preparações após diferentes técnicas de cocção

3.10.1. Seleção dos Julgadores

Foram selecionados 92 julgadores, sendo 19 homens e 73 mulheres, na faixa etária de 17 a 58 anos, não treinados, consumidores habituais de arroz, no Campus da UFV, com base no interesse e disponibilidade para participar do teste sensorial. Os julgadores selecionados foram abordados sobre a participação voluntária por meio de um termo de consentimento, que continha dados sobre a pesquisa.

3.10.2. Teste de aceitação sensorial das preparações

A aceitação sensorial das preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido foi avaliada no Laboratório de Análise Sensorial e Desenvolvimento de Novos Produtos do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, em cabines individuais, utilizando luz branca. Foram avaliadas preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido submetidas a quatro técnicas de cocção, sendo três em escala laboratorial (a) refogado em óleo e cozido em água, b) cozido em água e c) cozido em água no forno de micro-ondas) e uma em Unidade de Alimentação e Nutrição (cozido em água), realizada no Restaurante Universitário da UFV.

As amostras de arroz, pesando aproximadamente 30 g, foram servidas em pratos de polietileno codificados com números de três dígitos aleatórios e

servidas de forma sequencial, à temperatura de 40 a 50 °C. Um copo de água potável à temperatura ambiente foi fornecido para enxágüe da boca entre as avaliações. Utilizou-se a escala hedônica de nove pontos ancorada nos extremos pelos termos “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”, avaliando-se os atributos odor, textura, sabor e impressão global.

3.10.3. Aspectos Éticos

Os julgadores foram informados do estudo e do sigilo das informações e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando sua participação no estudo (Anexo 1). Os esclarecimentos foram feitos em linguagem acessível e a liberdade do consentimento em participar da pesquisa foi garantida a todos os indivíduos, conforme preconizado pelas Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Conselho Nacional de Saúde (CNS, 1997).

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (Of. Ref. Nº 061/2011) (Anexo 2).

3.11. Análise da contribuição das preparações para o suprimento das recomendações diárias de tiamina e ácido fólico

A análise da contribuição das preparações de arroz para o suprimento das recomendações de tiamina e ácido fólico foi realizada levando-se em consideração o conteúdo médio destas vitaminas no UR[®] adicionado ao arroz polido após diferentes técnicas de cocção e as recomendações diárias de tiamina e ácido fólico para diferentes grupos populacionais (Tabela 3).

Tabela 3. Recomendações diárias de tiamina e ácido fólico para diferentes faixas etárias.

Vitamina	Crianças			Mulheres			Homens		
	(EAR)			(EAR)			(EAR)		
	2 a 3 anos	4 a 8 anos	9 a 13 anos	14 a 18 anos	≥ 19 anos	Gestantes	9 a 13 anos	14 a 18 anos	≥ 19 anos
Tiamina (mg/dia)	0,4	0,5	0,7	0,9	0,9	1,2	0,7	1,0	1,0
Ác. Fólico (µg/ dia)	120	160	250	330	320	520	250	330	320

Fonte: (U.S INSTITUTE OF MEDICINE, (2000); EAR: Estimated Average Requirement

4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para análise do efeito das técnicas de cocção sobre o conteúdo e estabilidade de tiamina e ácido fólico, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições para extração de tiamina e ácido fólico. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando-se o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Para análise da aceitação sensorial foi utilizado o delineamento em blocos casualizados para a avaliação dos atributos (odor, sabor, textura e impressão global) das amostras utilizando a escala hedônica de 9 pontos, variando de “desgostei extremamente” a “gostei extremamente”. Foi realizada análise de variância para os dados de aceitação, seguida pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre as médias. Para obtenção do mapa de preferência interno ou análise de preferência multidimensional (MDPREF), os dados de aceitação foram organizados numa matriz de amostras (em linhas) e consumidores (em colunas), e esta submetida à Análise de Componentes Principais (MINIM, 2010). Os resultados foram expressos em um gráfico de dispersão das amostras em relação aos dois primeiros componentes principais e em outro representando os *loadings* (cargas) da ACP (correlações dos dados de cada consumidor com os dois primeiros componentes principais) (DANTAS *et al.*, 2009). Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE INC, 2003), licenciado para a UFV.

5. REFERÊNCIAS

ANYAKORA, C.; AFOLAMI, I.; EHIANETA, T., ONWUMERE, F. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 2, n. 2, p. 29-36, 2008.

AOAC. *Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC International* Gaithersburg, MD, USA: Association of Analytical Communities, 2002.

ARAÚJO, M. O. D., MEDEIROS, T. M. *Alimentos Per Capita*. Natal: UFRN, 2007.

BALL, G. F. M. Folate. In: BALL, G. F. M. (Ed.). *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*. Boca Raton: CRC, 2006. p. 651.

BATISTA FILHO, M. O controle das anemias no Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 4, p. 121-123, 2004.

BATISTA FILHO, M.,RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, p. 181-191, 2003.

BRASIL. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. *Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.*, Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 18 de Abril de 2012.

BROGNOLI, A. F.; NEME, L. C. L. H.; PASSONI, C. R. M. S.,PAGANOTTO, M. Gestação – Anemia ferropriva, deficiência de folato x fortificação alimentar. *Cadernos da Escola de Saúde e Nutrição*, n. 1, p. 1-7, 2008.

CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.,LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. *Química Nova*, v. 29, p. 972-976, 2006.

CECANE. *Manual para aplicação dos testes de aceitabilidade no Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE*. 2010. 56 p.

CNS. *Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos*. Brasília: Conselho Nacional de Saúde, 1997. 20 p.

DANTAS, M. I. D. S.; ANDRADE, G. F.; PIOVESAN, N. D.,MARTINO, H. S. D. Farinhas mistas de trigo e de soja agregam valor nutricional e sensorial em pães. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v. 68, p. 209-214, 2009.

DELLA LUCIA, C. M.; SILVA, E. R. D.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.,BRANDÃO, S. C. C. Otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Química Nova*, v. 34, p. 335-340, 2011.

DONG, M. W.; LEPORE, J.,TARUMOTO, T. Factors affecting the ion pair chromatography of water soluble vitamins. *Journal of Chromatography*, v. 442, p. 81-95, 1988.

DOWNES, F. P.,ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 4. ed.: American Public Health Association-APHA, 2001.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical databases*. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 18 de Abril.

FERREIRA NETO, C.; NASCIMENTO, E. M. D.; FIGUEIRÊDO, R. M. D.; QUEIROZ, A. J. D. M. Microbiologia de farinhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) durante o armazenamento. *Ciência Rural*, v. 34, p. 551-555, 2004.

FRARY, C. D.; JOHNSON, R. K. Energia In: MAHAN, L. K. E. E.-S., S. K. (Ed.). *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. São Paulo: Rocca, 2005. p. 20-34.

GOMES, J. C. *Análise de alimentos*. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos, 1996.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*, v. 80, n. 4, p. 589-596, 2003.

LANÇAS, F. M. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. 6. ed., São Carlos, 2004.

LEE, J.; HAMER, M. L.; EITENMILLER, R. R. Stability of Retinyl Palmitate During Cooking and Storage in Rice Fortified with Ultra Rice™ Fortification Technology. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 5, p. 915-919, 2000.

LEŠKOVÁ, E.; KUBÍKOVÁ, J.; KOVÁČIKOVÁ, E.; KOŠICKÁ, M.; PORUBSKÁ, J.; HOLČÍKOVÁ, K. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, n. 4, p. 252-276, 2006.

LÍBERA, B. D.; SOUZA, G. G.; PADILHA, P. C.; LEITE, P. M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. Estratégias de combate às microdeficiências no grupo materno-infantil. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 23, n. 3, p. 190-198, 2008.

MARCHI, R. P.; SZARFARC, S. C.; RODRIGUES, J. E. F. G. Consumo de arroz fortificado com ferro na profilaxia da deficiência do mineral. *Revista Nutrire*, v. 28, p. 53-64, 2004.

MINIM, V. P. R. *Análise sensorial: Estudos com consumidores*. Viçosa: UFV, 2010.

MURPHY, E. W.; CRINER, P. E.; GRAY, B. C. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 23, n. 6, p. 1153-1157, 1975.

PATH. Program for Appropriate Technology in Health. Seattle, Wa., Personal communication. 1999.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; CARO, R.; WEILL, R.; BOCCIO, J. Fortification Strategies to Combat Zinc and Iron Deficiency. *Nutrition Reviews*, v. 60, n. 2, p. 52-58, 2002.

SAMPAIO, C. R. P.; FERREIRA, S. M. R.,CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Perfil sensorial e aceitabilidade de barras de cereais fortificadas com ferro. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 20, n. 1, p. 95-106, 2009.

SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's Guide. Version 9.1* 4. ed., Cary, NC: SAS Institute Inc, 2003. 846 p.

SWAN-CHOO, K.,E-SIONG, T. Development of a HPLC method for the simultaneous determination of several B-vitamins and ascorbic acid. *Malaysian Journal of Nutrition*, v. 2, p. 49-65, 1996.

TORRES, D. P. M. Produção de refeições e alterações nutricionais nos alimentos. *SPCNA*, v. 15, n. 3, p. 66-70, 2009.

U.S INSTITUTE OF MEDICINE. *Food and Nutrition Board. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for vitamins.*, Washington: National Academy Press, 2000.

UNDERWOOD, B. A. Scientific Research: Essential, but Is it Enough to Combat World Food Insecurities? *The Journal of Nutrition*, v. 133, n. 5, p. 1434-1437, 2003.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; SALAS MARTINS, I.; CERVATO, A. M.; FORNÉS, N. S.,MARUCCI, M. D. F. N. Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, p. 157-162, 1997.

VELLOZO, E. P.,FISBERG, M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, p. 134-139, 2010.

YOUNG, V. R.,PELLETT, P. L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 59, n. 5, p. 1203-1212, 1994.

ZANCUL, M. S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. *Medicina*, v. 37, p. 45-50, 2004.

6. RESULTADOS

6.1. Artigo 1

ARROZ FORTIFICADO (ULTRA RICE®) APRESENTA ELEVADO TEOR DE FERRO, ZINCO, TIAMINA E ÁCIDO FÓLICO E ADEQUADA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL APÓS COCÇÃO

RESUMO

Objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica e nutricional de grãos de arroz fortificado (Ultra Rice[®] - UR[®]), bem como a aceitação sensorial de preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido, após cocção em escala laboratorial (cocção em água, refogamento em óleo seguido de cocção em água e cocção em água em forno de micro-ondas) e em Unidade de Alimentação e Nutrição (cocção em água). O UR[®] apresentou 7,68% de umidade; 0,12% de lipídios; 7,26% de proteínas; 0,96% de fibra alimentar total; 79,75% de carboidratos e valor energético total de 349,12 Kcal. Verificou-se elevados teores de ferro (821,24 mg), zinco (142,15 mg), tiamina (161,72 mg) e ácido fólico (20,95 mg). Os micro-organismos pesquisados estavam ausentes ou dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação sanitária. Todas as preparações foram bem aceitas, sendo que as preparações com refogamento em óleo seguido de cocção em água, cozida em água e cozida em Unidade de Alimentação e Nutrição apresentaram melhor aceitação dos atributos sabor, textura e impressão global que a preparação cozida em forno de micro-ondas. As quatro preparações apresentaram aceitação semelhante em relação ao atributo odor. Em conclusão, o UR[®] apresentou composição centesimal semelhante ao arroz polido, elevados conteúdos de ferro, zinco, tiamina e ácido fólico e com qualidade sanitária e sensorial satisfatórias. Desta forma, o UR[®] mostrou-se um alimento adequado para utilização em programas de alimentação e nutrição destinados a populações em situação de risco nutricional, e que têm o hábito de consumir arroz na dieta.

Palavras-chave: composição centesimal; micronutrientes, técnicas de cocção, CLAE-DAD.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microbiological and nutritional quality of grains of a fortified rice (Ultra Rice[®] - UR[®]) and the sensory acceptance of preparations containing UR[®] added to the polished rice after cooking in laboratory scale (boiling, stir-frying before boiling and boiling in a microwave oven) and in foodservice (boiling). UR[®] grains presented 7.68% of moisture, 0.12% of lipids, 7.26% protein, 0.96% of total dietary fiber, 79.75% of carbohydrates and total energetic value of 349.12 kcal. It was found elevated levels of iron (821.24 mg), zinc (142.15 mg), thiamine (161.72 mg) and folic acid (20.95 mg). The surveyed microorganisms were within the microbiological standards established by the health legislation. All preparations were well accepted, and preparations that were stir-fried before boiled, boiled in water and boiled in foodservice showed better acceptance of flavor, texture and overall impression than the preparation boiled in microwave oven. The four preparations showed similar acceptance in relation to the attribute odor. In conclusion, UR[®] presented chemical composition similar to polished rice, high contents of iron, zinc, thiamine and folic acid and satisfactory sensory and sanitary quality. Thus, UR[®] proved to be an adequate food for use in programs of feeding and nutrition destined to populations at nutritional risk that usually consume rice on their diet.

Key words: centesimal composition, micronutrients, cooking techniques, HPLC-DAD

1. INTRODUÇÃO

As deficiências de micronutrientes configuram-se, na atualidade, como um importante problema de saúde pública mundial, em especial, nos países em desenvolvimento. Nesses países, essas deficiências acometem diferentes grupos populacionais destacando-se as crianças em idade pré-escolar, gestantes e idosos (LÍBERA *et al.*, 2008).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas na prevenção e redução destas deficiências, destacando-se entre essas a fortificação de alimentos. O processo de fortificação, também denominado enriquecimento ou adição de nutrientes, consiste no acréscimo, de acordo com parâmetros legais, de um ou mais nutrientes, naturalmente contidos ou não em alimentos de uso massivo, com o objetivo de melhorar seu valor nutritivo (VELLOZO; FISBERG, 2010).

Para que a fortificação de um alimento seja eficaz, deve-se priorizar um tipo de alimento que faça parte do hábito alimentar e que seja amplamente consumido pela população que tem risco de deficiência de micronutrientes. Entre os alimentos utilizados como veículos de micronutrientes no processo de fortificação alimentar estão os cereais e respectivas farinhas, molhos, leite e derivados, e em menor proporção, sal, açúcar e condimentos (SALGUEIRO *et al.*, 2002; ZANCUL, 2004; BROGNOLI *et al.*, 2008).

O arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo, caracterizando-se como um alimento tipicamente consumido por grande parte da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (FAO, 2012). Por ser habitual na dieta brasileira, a fortificação deste cereal constitui-se numa importante estratégia de prevenção e redução das deficiências de micronutrientes no país (MARCHI; SZARFARC; RODRIGUES, 2004).

Entre as tecnologias utilizadas para a fortificação do arroz, destaca-se a tecnologia Ultra Rice[®] (UR[®]) que permite a obtenção de grãos com tamanho, forma e textura idênticos ao arroz do tradicional. Neste processo, os grãos são fabricados a partir da farinha de arroz adicionada de nutrientes, pelo processo de extrusão. Atualmente, duas formulações de UR[®] têm sido desenvolvidas pelo *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH), sendo uma fortificada com vitamina A e outra, com tiamina, ácido fólico, ferro e zinco (PATH, 1999). Dependendo do nível de enriquecimento desejado, os grãos de

UR[®] podem ser misturados ao arroz convencional em proporções que variam de 1:50 a 1:200 (LEE; HAMER; EITENMILLER, 2000).

Pesquisas com o UR[®] vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos objetivando avaliar e comprovar sua eficácia na prevenção e redução das deficiências de micronutrientes em diferentes populações (HASKELL *et al.*, 2005; MORETTI *et al.*, 2006; HOTZ *et al.*, 2008), bem como a estabilidade de palmitato de retinil após cocção e tiamina na presença de sais de ferro (LEE; HAMER; EITENMILLER, 2000; LI; DIOSADY; JANKOWSKI, 2008a; b) e biodisponibilidade de vitamina A adicionada (FLORES *et al.*, 1994). Os resultados desses estudos demonstraram alta biodisponibilidade e estabilidade (75 a 87 para o palmitato de retinil e quase 100% para tiamina) dos diferentes compostos empregados na formulação do UR[®] e eficácia deste alimento fortificado na prevenção das deficiências de ferro e vitamina A.

Tendo em vista a escassez de pesquisas na área, o presente estudo objetivou caracterizar grãos de UR[®] adicionados de ferro, zinco, tiamina e ácido fólico quanto à sua composição microbiológica e nutricional e avaliar a aceitação sensorial de preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido utilizando diferentes técnicas de cocção.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Matéria-Prima

Foi utilizado UR[®] fortificado com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico, fabricado e cedido por uma indústria de massas alimentícias (Indaiatuba, São Paulo, Brasil) após autorização pelo PATH. Além disso, utilizou-se arroz polido tipo 1, classe longo fino, adquirido no comércio da cidade de Viçosa, Minas Gerais.

2.2. Técnicas de cocção das preparações do UR[®] adicionado ao arroz polido

Foram utilizadas três técnicas de cocção em escala laboratorial (a) refogado em óleo de soja seguido de cocção em água, b) cozido em água e c) cozido em água em forno de micro-ondas) e uma técnica de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição - UAN (cozido em água), realizada no restaurante universitário da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para as técnicas de cocção a escala laboratorial, a quantidade preparada visou atender uma família de quatro pessoas. Na Unidade de Alimentação e Nutrição, previu-se o atendimento de, aproximadamente, 666 pessoas, de um total de 4000 refeições servidas no almoço diariamente.

Nas técnicas de cocção em escala laboratorial, a mistura do UR[®] ao arroz polido, na proporção de 1:100, foi realizada pesando-se em balança analítica digital (GEHAKA, AG 200) 2 g de UR[®] e em balança semi analítica digital (Trentin, BT - 001) 198 g de arroz polido (não lavado em água corrente). Posteriormente, a mistura foi realizada manualmente em recipiente de vidro. Para a técnica de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição foram pesados em balança semi-analítica digital (Trentin, BT - 001) 0,6 kg de UR[®] e 59,4 kg de arroz polido (previamente lavado em água corrente). A mistura dos grãos foi realizada após adição no panelão americano.

2.2.1. Cocção em escala laboratorial

2.2.1.1. Cocção em água

Adicionou-se água (600 mL) em uma panela de alumínio fundido (capacidade de 1 L), óleo de soja (20 mL) e sal (5 g). A água foi aquecida até ebulição em fogão de chama e, em seguida, acrescentou-se o UR[®] adicionado ao arroz polido (200g). Procedeu-se a cocção do arroz em fogo baixo, com a panela semi-tampada por aproximadamente 12 minutos. Após evaporação da água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz cozido foi homogeneizado e pesado em balança semi analítica digital (Trentin, BT - 001) para o cálculo do rendimento.

2.2.1.2. Refogamento em óleo seguido de cocção em água

Adicionou-se óleo (20 mL) a uma panela de alumínio fundido (capacidade de 1 L) e levou-se ao fogo, em fogão de chama. Logo em seguida, acrescentou-se o UR[®] adicionado ao arroz polido (200 g), sal (5 g). Refogou-se por, aproximadamente 3 minutos, e acrescentou-se água (600 mL) previamente aquecida até ebulição. O cozimento foi realizado em fogo baixo, com a panela semi-tampada, por, aproximadamente, 15 minutos. Após evaporação da água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por, aproximadamente, 10 minutos. Após este período, o arroz cozido foi

homogeneizado e pesado em balança semi analítica digital (Trentin, BT - 001) para o cálculo do rendimento.

2.2.1.3. Cocção em água em forno de micro-ondas

O arroz cozido em forno de micro-ondas foi preparado em recipiente de vidro apropriado, conforme descrito a seguir: acrescentou-se o UR[®] adicionado ao arroz polido (200 g), sal (5 g), óleo (20 mL) e água (400 mL). Em seguida, os ingredientes foram levados ao forno de micro-ondas, em recipiente semi-tampado, potência alta (100%), por 8 minutos. Após a cocção, o recipiente permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz cozido foi homogeneizado e pesado em balança semi analítica digital (Trentin, BT - 001) para o cálculo do rendimento.

2.2.2. Cocção em água em UAN

Acrescentou-se água (60 L) em panelão americano de 300 L juntamente com o óleo (5 L) e o sal (2 Kg). Após a ebulição da água, adicionou-se a mistura de UR[®] e arroz polido (60 Kg). O cozimento do arroz foi realizado com o panelão tampado, em vapor médio (800 a 1000 Kg/cm²), por 40 minutos. Após a cocção, o vapor foi desligado e o panelão permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, o arroz cozido foi homogeneizado e pesado em balança semi analítica digital (Trentin, BT - 001) para o cálculo do rendimento.

2.3. Análise microbiológica e atividade de água (A_w)

A análise microbiológica dos grãos de UR[®] crus foi realizada no Laboratório de Higiene de Alimentos, do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da UFV. As análises para enumeração de coliformes a 45°C, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, fungos e leveduras foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Downes e Ito (2001).

Para cada micro-organismo avaliado foram contadas as colônias típicas nos meios de cultura utilizados, conforme Downes e Ito (2001), e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), utilizando-se a seguinte fórmula para cálculo:

$$\text{UFC/g} = \text{média do n}^\circ \text{ colônias típicas} \times \text{FD} / \text{Alíquota (mL)}, \text{ sendo FD} = \text{fator de diluição, correspondente ao inverso da diluição utilizada.}$$

A atividade de água dos grãos de UR[®] crus foi realizada em triplicata e determinada utilizando equipamento Aqualab (Decagon, modelo CX₂).

2.4. Análise da composição centesimal e minerais

A análise da composição centesimal do UR[®] cru foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos do DNS - UFV. As análises para determinação do teor de água, lipídios, proteínas, ferro e zinco foram feitas com amostras de UR[®] cru em triplicata, e para determinação de fibra alimentar solúvel e insolúvel, realizou-se a análise em duplicata. Os teores de água, proteínas, lipídios, cinzas, fibras e carboidratos foram determinados segundo metodologia descrita pela AOAC (2002) sendo fibra alimentar total (FAT), fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI) determinados pelo método enzimático gravimétrico e os teores de carboidratos por diferença (AOAC, 2002). Ferro e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica segundo Gomes (1996). Para o cálculo do valor calórico, foram utilizados os fatores de conversão 4; 4 e 9 Kcal/g para proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente (FRARY; JOHNSON, 2005).

2.5. Análise de tiamina e ácido fólico

Os métodos para extração e análise de tiamina e ácido fólico nos grãos crus de UR[®] foram otimizados no Laboratório de Análise de Vitaminas do DNS – UFV.

As análises foram realizadas em cinco repetições para extração e a injeção de cada extrato foi feita em duplicata.

Durante as análises químicas, as amostras e extratos foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo *blackout*, e sob proteção do oxigênio, através da utilização de vidrarias com tampas.

Antes da etapa de extração de tiamina e ácido fólico, as amostras de UR[®] cru foram trituradas em moinho analítico (Quimis, Q298A).

2.5.1. Extração e análise de tiamina

Para extração de tiamina, pesou-se cerca de 1 g de UR[®] cru, em balança analítica digital (GEHAKA, AG 200) e adicionou-se 22 mL de solução extratora conforme Anyacora *et al* (2008) composta por sal sódico do ácido hexano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%), com pH ajustado para 3,5 com KOH (10 M). A amostra foi homogeneizada em microtritador (Marconi, MA 102), por 3 minutos, e centrifugada a 4000 rpm (1789 g) em

centrífuga de tubos (Excelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 mL, Fanem, 206-R), por 7 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de bomba à vácuo (Tecnal, TE-058) em funil de büchner, utilizando-se papel de filtro (n° JP41 J. ,Prolab, Brasil) O filtrado foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com solução extratora. O extrato foi acondicionado em frasco âmbar hermeticamente fechado e armazenado sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise, que ocorreu, no máximo, após 1 hora.

A análise de tiamina foi conduzida empregando-se sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa (CLAE) (Shimadzu, SCL 10AT VP) composto de bomba de alta pressão (LC-10 AT-VP); injetor automático, com *loop* de 500 μL (SIL-10AF) e detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M10 AVP). O sistema foi controlado pelo *Software Multi System*, modelo *Class Vp 6.1*.

As condições cromatográficas basearam-se em procedimentos descritos por Anyakora *et al* (2008) e Dong *et al* (1988) e incluíram: fase móvel composta por água ultra pura contendo sal sódico do ácido hexano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (75: 25), adicionada de trietilamina (0,1%), pH ajustado para 3,5 com KOH (10 M) ; coluna RP18 (Phenomenex Gemini 250 mm x 4,6 mm, 5 μm), equipada com coluna guarda (Phenomenex RP18 4 x 3 mm) A análise foi realizada em modo isocrático, com fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 10 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 247 nm.

A quantificação de tiamina no UR[®] cru foi feita a partir da curva analítica e equação de regressão obtidas ($y = 2381473,1982 x + 122852, 4402$; $R^2 = 0,9998$). O cálculo da concentração real foi obtido a partir da diluição realizada.

2.5.2. Extração e análise de ácido fólico

Para extração de ácido fólico, pesou-se cerca de 1 g de UR[®] cru em balança analítica digital (GEHAKA, AG 200) e adicionou-se 22 mL de solução extratora, conforme Della Lucia *et al* (2011), composta por tampão fosfato (0,1 M), pH 6,0 ajustado com KOH (10 M). A amostra foi homogeneizada em microtritador (Marconi, MA 102) por aproximadamente 3 minutos e centrifugada a 4000 rpm (1789 g) em centrífuga de tubos (Excelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 mL, Fanem, 206-R), por 7 minutos. O sobrenadante foi

filtrado com auxílio de bomba à vácuo (Tecnal, TE-058) em funil de büchner, utilizando-se papel de filtro (n° JP41 J. , Prolab, Brasil). Posteriormente, o filtrado foi transferido para balão volumétrico de 25 mL sendo o volume completado com solução extratora. O extrato foi acondicionado em frasco âmbar hermeticamente fechado e armazenado sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise, que ocorreu, no máximo, após 1 hora.

A análise de ácido fólico foi conduzida empregando-se o mesmo sistema CLAE utilizado para análise de tiamina. As condições cromatográficas basearam-se em procedimento descrito por Anyakora *et al* (2008) e Dong *et al* (1988) com adaptações: fase móvel composta por solução de sal sódico do ácido heptano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (80:20), adicionada de trietilamina (0,1%), pH ajustado para 5,0 com KOH (10 M); coluna RP18 (Phenomenex Gemini 250 mm x 4,6 mm, 5 μm), equipada com coluna guarda RP18 (Phenomenex 4 mm x 3 mm). A análise foi realizada em modo isocrático, com fluxo de 0,7 mL/min e tempo de corrida de 12 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 282 nm.

A quantificação de ácido fólico no UR[®] cru foi feita a partir da curva analítica e equação de regressão obtidas ($y = 4736910,1846x - 8543,3495$; $R^2 = 0,9997$). O cálculo da concentração real foi obtido a partir da diluição realizada.

2.6. Aceitação sensorial das preparações após diferentes técnicas de cocção

2.6.1. Seleção dos julgadores

Foram selecionados 92 julgadores, sendo 19 homens e 73 mulheres, na faixa etária de 17 a 58 anos, não treinados, consumidores habituais de arroz. Os julgadores foram abordados, no campus da UFV e selecionados com base no interesse e disponibilidade para participar do teste sensorial. A participação voluntária foi condicionada a assinatura de um termo de consentimento, no qual constavam os dados sobre a pesquisa.

2.6.2. Teste de aceitação sensorial das preparações

A aceitação sensorial em relação aos atributos odor, textura, sabor e impressão global das quatro preparações foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial e Desenvolvimento de Novos Produtos do DNS-UFV, em cabines individuais, utilizando luz branca.

Amostras de arroz (30 g) em temperatura de 40 a 50 °C, foram servidas em pratos de polietileno codificados com números de três dígitos aleatórios e servidas de forma sequencial. Um copo de água potável em temperatura ambiente foi fornecido para enxágüe da boca entre as avaliações. Utilizou-se a escala hedônica de nove pontos ancorada nos extremos pelos termos “gostei extremamente e “desgostei extremamente” para avaliação dos atributos (STONE; SIDEL, 1993).

2.6.3. Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (Of. Ref. Nº 061/2011).

Os julgadores foram informados do estudo e do sigilo das informações e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando sua participação.

Os esclarecimentos foram feitos em linguagem acessível e a liberdade do consentimento em participar da pesquisa foi garantida a todos os indivíduos, conforme preconizado pelas Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Conselho Nacional de Saúde (CNS, 1997).

2.6.4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados de aceitação sensorial

Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados para a avaliação dos atributos odor, sabor, textura e impressão global das preparações de arroz cozido. Os dados da aceitação sensorial foram submetidos à análise de variância, seguida pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram avaliados também por meio do mapa de preferência interno, baseado no modelo de Análise de Componente Principal (ACP) (MINIM, 2010). Os resultados foram apresentados em gráfico de dispersão das amostras em relação aos dois primeiros componentes principais e em outro representando os *loadings* (cargas) da ACP (correlações dos dados de cada consumidor com os dois primeiros componentes principais) (DANTAS *et al.*, 2009). As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE INC, 2003), licenciado para a UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Qualidade microbiológica e atividade de água (A_w)

Os grãos de UR[®] estavam de acordo com o padrão microbiológico estabelecido pela RDC n^o 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa (BRASIL, 2001), apresentando contagem de *Bacillus cereus*, coliformes a 45°C e fungos e leveduras inferiores aos valores de referência, bem como ausência do patógeno *Salmonella* (Tabela 1). Ressalta-se que a legislação vigente não estabelece limites de contaminação microbiológica para o arroz. Dessa forma, os resultados encontrados foram comparados com os limites estabelecidos pela RDC n^o 12/2001 da Anvisa (BRASIL, 2001), para amidos, farinhas, féculas e fubá em pó ou flocados. O valor encontrado para fungos e leveduras foi comparado com o limite estabelecido por Leitão et al (1988).

A baixa contagem de micro-organismos nas amostras indica um eficiente controle higiênico-sanitário no processo produtivo do UR[®]. Além disso, a baixa atividade de água encontrada no UR[®] cru ($0,47 \pm 0,01$) não oferece condições para o crescimento e desenvolvimento microbiano (BEUCHAT, 1981).

Tabela 1. Qualidade microbiológica do UR[®] cru.

Micro-organismo pesquisado	Valor encontrado	Referência
<i>Bacillus cereus</i>	4 UFC/g	até 3×10^3 UFC/g*
Coliformes a 45°C	< 4 NMP /g	até 10^2 NMP/g*
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência	Ausência*
Fungos e Leveduras	4×10 UFC/g	10^4 a 10^6 UFC/g**

*RDC 12 de 2001; **(LEITÃO *et al.*, 1988).

Tabela 2. Atividade de água (a_w) do UR[®] cru

Valor encontrado	Referência**
$0,47 \pm 0,01$	0,90 – Bactérias deterioradoras
	0,88 – Leveduras
	0,80 - Fungos

*Média de três replicatas; ** (BEUCHAT, 1981)

3.2. Composição nutricional do UR[®]

O UR[®] apresentou reduzido teor de água e fibra alimentar total (FAT) em relação ao observado no arroz polido cru (Tabela 3). A baixa umidade do UR[®] é atribuída à secagem dos grãos em seu processo de fabricação (PATH, 1999). O conteúdo reduzido de FAT no UR[®] (52% do teor presente no arroz polido) pode ser devido às condições de cultivo, tipo de solo e variedade, além das características genotípicas dos grãos de arroz, que na forma de farinha, compõe cerca de 90% desta matriz (PATH, 1999; LAI *et al.*, 2007). O conteúdo de lipídios, proteínas e carboidratos no UR[®] foi similar ao do arroz polido cru.

Tabela 3. Composição nutricional dos grãos de Ultra Rice[®] crus (dados em matéria seca).

Componente	UR [®] (Média ± DP)	Arroz polido cru (NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO, 2011)
Umidade (g/100g)*	7,68 ± 0,08	13,20
Lipídios (g/100g)*	0,12 ± 0,03	0,34
Proteínas (g/100g)*	7,26 ± 0,63	8,29
Cinzas (g/100g)*	4,23 ± 0,04	0,57
Fibra alimentar total (g/100g)**	0,96 ± 0,03	1,84
<i>Fibra solúvel (g/100g)**</i>	0,58 ± 0,33	-
<i>Fibra insolúvel (g/100g)**</i>	0,38 ± 0,29	-
Carboidratos	79,75	75,76
Valor energético total	349,12	339,26
Ferro (mg/100g)*	821,24 ± 54,46	0,75
Zinco (mg/100g)*	142,15 ± 0,99	1,29
Tiamina (mg/100g)***	161,72 ± 1,93	0,17
Ácido Fólico (mg/100g)***	20,95 ± 0,10	-

*Amostras de Ultra Rice[®] analisadas em triplicata; **Amostras de Ultra Rice[®] analisadas em duplicata

***Média de cinco repetições para extração em duplicata; DP: Desvio padrão

Em relação aos micronutrientes, verificaram-se elevados teores de ferro, zinco e tiamina no UR[®] cru quando comparado ao arroz polido. Além disso, o UR[®] apresentou ácido fólico, o qual é um componente sintético que não é encontrado, naturalmente, em grãos de arroz polido. Os elevados conteúdos de

ferro, zinco, tiamina e ácido fólico no UR[®] se devem ao fato deste se tratar de um arroz fortificado e que deve ser consumido, exclusivamente, misturado ao arroz polido. O consumo dos grãos de UR[®] de forma isolada pode levar a uma ingestão de micronutrientes superior ao nível máximo tolerável (UL), acarretando risco ou efeito adverso à saúde (U.S INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Os grãos de UR[®] podem ser misturados ao arroz polido em proporções que podem variar de 1:50 a 1:200, de forma a contribuir com o mínimo de 30% da ingestão diária destes micronutrientes, após a cocção do UR[®] adicionado ao arroz polido. Assim, os elevados níveis de ferro, zinco, tiamina e ácido fólico observados na composição do UR[®] analisado no presente estudo podem classificá-lo como um alimento estratégico na prevenção das deficiências específicas destas vitaminas e minerais, mediante o aumento do aporte desses micronutrientes na alimentação de populações que consomem arroz habitualmente.

3.3. Aceitação sensorial das preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido

Observou-se que todas as preparações foram bem aceitas em relação ao odor, textura, sabor e impressão global (Tabela 4). Em média, 83,9% dos escores de todos os atributos nas diferentes preparações situaram-se entre os escores hedônicos 6 e 9 (gostei ligeiramente a gostei extremamente). A boa aceitação sensorial do UR[®] adicionado ao arroz polido também foi observada por Beinner *et al* (2010) em preparação cozida em água.

Tabela 4. Frequência (%) dos escores de aceitação sensorial em relação ao odor, textura, sabor e impressão global de preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido.

Atributos	Termo hedônico	Preparações de UR [®] adicionado ao arroz polido			
		Cozida em água	Refogada em óleo seguida de cocção em água	Cozida em forno de micro-ondas	Cozida em UAN
Odor	Aceitação	86	92	78	85
	Indiferença	5,5	4	7,5	5,5
	Rejeição	8,5	4	14,5	9,5
Textura	Aceitação	85	93,5	63	80,5
	Indiferença	3	0	4	14
	Rejeição	12	6,5	33	5,5
Sabor	Aceitação	84	91	75	89
	Indiferença	2	3	4	7,5
	Rejeição	14	6	21	3,5
Impressão Global	Aceitação	86	92	78	85
	Indiferença	5,5	4	7,5	5,5
	Rejeição	8,5	4	14,5	9,5

Aceitação: escores de 6 a 9; indiferença: escore 5; rejeição: escores de 1 a 4. N = 92 julgadores

UAN: Unidade de Alimentação e Nutrição

Com base nos dados obtidos no teste de aceitação das preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido, construiu-se o mapa de preferência interno para os atributos odor, sabor, textura e impressão global (Figura 1). Os consumidores mais próximos do centro da figura não estão correlacionados com nenhum dos dois componentes principais e contribuem pouco para a discriminação das amostras. A correlação de julgadores com pelo menos um dos componentes indica diferença na aceitação das amostras.

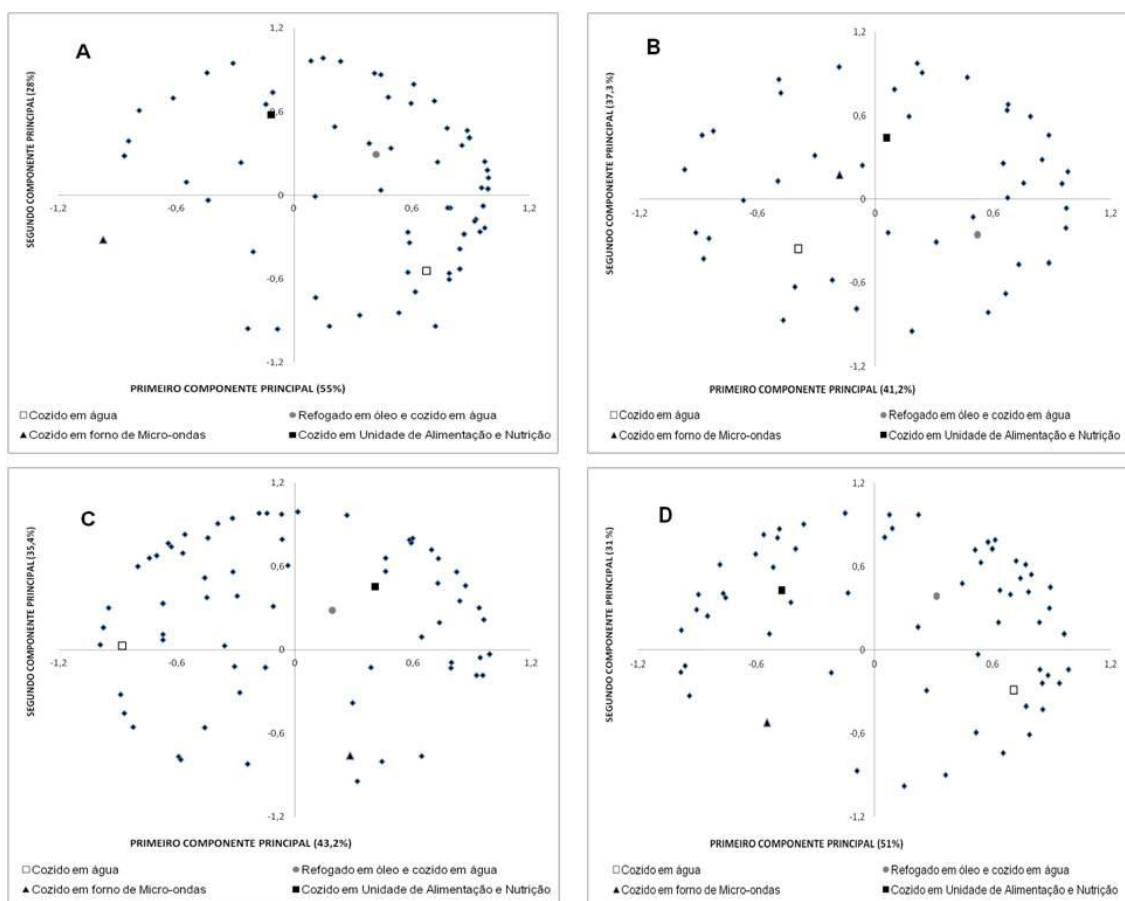


Figura 1. Dispersão das preparações após as técnicas de cocção em escala laboratorial e em Unidade de Alimentação e Nutrição em relação à aceitação pelos consumidores e correlação entre os dados de aceitação de cada consumidor e os dois componentes principais. (A) Textura, (B) odor, (C) sabor e (D) impressão global.

A soma do primeiro e segundo componentes principais explicaram, respectivamente, 78,5 % da variância entre as amostras quanto ao odor; 78,6 % para sabor; 83 % para textura e 82 % para impressão global. Dessa forma, esses componentes foram suficientes para discriminar as amostras quanto à aceitação dos atributos avaliados nas diferentes preparações.

A separação espacial das preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido sugere a formação de quatro grupos distintos para os atributos impressão global, odor e textura, e três grupos distintos para o sabor (grupo 1: preparação refogada em óleo e cozida em água e em Unidade de Alimentação

e Nutrição; grupo 2: preparação cozida em água e grupo 3: preparação cozida em água no forno de micro-ondas)

Para os atributos textura, sabor e impressão global, a maioria dos julgadores se correlacionou com os dois componentes principais para a preparação refogada em óleo de soja seguida de cocção em água, cozida em água e cozida em UAN, demonstrando melhor aceitação em relação aos mesmos atributos da preparação cozida em forno de micro-ondas. Quanto ao odor, os julgadores se correlacionaram de modo semelhante com os componentes principais, demonstrando aceitação semelhante de todas as amostras.

4. CONCLUSÃO

Os grãos de UR[®] apresentaram qualidade sanitária satisfatória e composição centesimal em termos de lipídios, proteínas e carboidratos similar ao arroz polido, além de altos teores de ferro, zinco, tiamina e ácido fólico.

Todas as preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido foram bem aceitas em relação aos atributos avaliados.

As preparações refogada em óleo seguida de cocção em água, cozida em água e cozida em UAN apresentaram melhor aceitação dos atributos sabor, textura e impressão global que a preparação cozida em forno de micro-ondas. As quatro preparações apresentaram aceitação semelhante em relação ao atributo odor.

Os achados demonstraram que o UR[®], quando preparado juntamente com o arroz polido, poder ser indicado como um alimento adequado e seguro para utilização em programas de alimentação e nutrição, especialmente para populações em situação de risco nutricional, e que têm o hábito de consumir arroz na dieta.

5. REFERÊNCIAS

ANYAKORA, C.; AFOLAMI, I.; EHIANETA, T., ONWUMERE, F. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 2, n. 2, p. 29-36, 2008.

AOAC. *Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC International* Gaithersburg, MD, USA: Association of Analytical Communities, 2002.

BEINNER, M. A.; SOARES, A. D. N.; BARROS, A. L. A., MONTEIRO, M. A. M. Sensory evaluation of rice fortified with iron. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 516-519, 2010.

BEUCHAT, L. R. Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, v. 26, n. 7, p. 345-349, 1981.

BRASIL. *RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.*, Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 18 de Abril de 2012.

BROGNOLI, A. F.; NEME, L. C. L. H.; PASSONI, C. R. M. S., PAGANOTTO, M. Gestação – Anemia ferropriva, deficiência de folato x fortificação alimentar. *Cadernos da Escola de Saúde e Nutrição*, n. 1, p. 1-7, 2008.

CNS. *Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos*. Brasília: Conselho Nacional de Saúde, 1997. 20 p.

DANTAS, M. I. D. S.; ANDRADE, G. F.; PIOVESAN, N. D., MARTINO, H. S. D. Farinhas mistas de trigo e de soja agregam valor nutricional e sensorial em pães. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v. 68, p. 209-214, 2009.

DELLA LUCIA, C. M.; SILVA, E. R. D.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M., BRANDÃO, S. C. C. Otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Química Nova*, v. 34, p. 335-340, 2011.

DONG, M. W.; LEPORE, J., TARUMOTO, T. Factors affecting the ion pair chromatography of water soluble vitamins. *Journal of Chromatography*, v. 442, p. 81-95, 1988.

DOWNES, F. P., ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 4. ed.: American Public Health Association-APHA, 2001.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical databases*. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 18 de Abril.

FLORES, H.; GUERRA, N. B.; CAVALCANTI, A. N. A. C. A.; CAMPOS, F. A. C. S.; AZEVEDO, M. C. N. A., SILVA, M. B. M. Bioavailability of Vitamin A in a Synthetic Rice Premix. *Journal of Food Science*, v. 59, n. 2, p. 371-372, 1994.

FRARY, C. D., JOHNSON, R. K. Energia In: MAHAN, L. K. E. E.-S., S. K. (Ed.). *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. São Paulo: Rocca, 2005. p. 20-34.

GOMES, J. C. *Análise de alimentos*. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos, 1996.

HASKELL, M. J.; PANDEY, P.; GRAHAM, J. M.; PEERSON, J. M.; SHRESTHA, R. K.; BROWN, K. H. Recovery from impaired dark adaptation in nightblind pregnant Nepali women who receive small daily doses of vitamin A as amaranth leaves, carrots, goat liver, vitamin A–fortified rice, or retinyl palmitate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, n. 2, p. 461-471, 2005.

HOTZ, C.; PORCAYO, M.; ONOFRE, G.; GARCÍA-GUERRA, A.; ELLIOTT, T.; JANKOWSKI, S.; GREINER, T. Efficacy of iron-fortified Ultra Rice in improving the iron status of women in Mexico. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 29, n. 2, 2008.

LAI, V. M. F.; LU, S.; HE, W. H.; CHEN, H. H. Non-starch polysaccharide compositions of rice grains with respect to rice variety and degree of milling. *Food Chemistry*, v. 101, n. 3, p. 1205-1210, 2007.

LEE, J.; HAMER, M. L.; EITENMILLER, R. R. Stability of Retinyl Palmitate During Cooking and Storage in Rice Fortified with Ultra Rice™ Fortification Technology. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 5, p. 915-919, 2000.

LEITÃO, M. F. F.; HAGLER, L. C. S. M.; HAGLER, A. N.; MENEZES, T. J. B. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo: Manole 1988. 185 p.

LI, Y.; DIOSADY, L. L.; JANKOWSKI, S. Effect of iron compounds on the storage stability of multiple-fortified Ultra Rice®. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 43, n. 3, p. 423-429, 2008a.

LI, Y.; DIOSADY, L. L.; JANKOWSKI, S. Stability of vitamin B1 in Ultra Rice® in the presence of encapsulated ferrous fumarate. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 59, n. 1, p. 24-33, 2008b.

LÍBERA, B. D.; SOUZA, G. G.; PADILHA, P. C.; LEITE, P. M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. Estratégias de combate às microdeficiências no grupo materno-infantil. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 23, n. 3, p. 190-198, 2008.

MARCHI, R. P.; SZARFARC, S. C.; RODRIGUES, J. E. F. G. Consumo de arroz fortificado com ferro na profilaxia da deficiência do mineral. *Revista Nutrire*, v. 28, p. 53-64, 2004.

MINIM, V. P. R. *Análise sensorial: Estudos com consumidores*. Viçosa: UFV, 2010.

MORETTI, D.; ZIMMERMANN, M. B.; MUTHAYYA, S.; THANKACHAN, P.; LEE, T. C.; KURPAD, A. V.; HURRELL, R. F. Extruded rice fortified with

micronized ground ferric pyrophosphate reduces iron deficiency in Indian schoolchildren: a double-blind randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 84, n. 4, p. 822-829, 2006.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. 4. ed., Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2011.

PATH. Program for Appropriate Technology in Health. Seattle, Wa., Personal communication. 1999.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; CARO, R.; WEILL, R.;BOCCIO, J. Fortification Strategies to Combat Zinc and Iron Deficiency. *Nutrition Reviews*, v. 60, n. 2, p. 52-58, 2002.

SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's Guide. Version 9.1* 4. ed., Cary, NC: SAS Institute Inc, 2003. 846 p.

STONE, H. S.,SIDEL, J. L. *Sensory evaluation practices*. San Diego: Academic Press, 1993.

U.S INSTITUTE OF MEDICINE. *Food and Nutrition Board. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for vitamins.*, Washington: National Academy Press, 2000.

VELLOZO, E. P.,FISBERG, M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, p. 134-139, 2010.

ZANCUL, M. S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. *Medicina*, v. 37, p. 45-50, 2004.

6.2. Artigo 2

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE TIAMINA E ÁCIDO
FÓLICO POR CLAE-DAD EM ARROZ FORTIFICADO (ULTRA RICE®)
ADICIONADO AO ARROZ POLIDO ANTES E APÓS COCÇÃO**

RESUMO

O presente estudo objetivou otimizar e validar métodos para determinação de tiamina e ácido fólico em grãos crus de Ultra Rice[®] (UR[®]), bem como na mistura destes grãos com arroz polido, antes e após diferentes técnicas de cocção. A análise de tiamina e ácido fólico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a detector de arranjos de diodos (CLAE-FR-DAD). Diferentes fases móveis foram testadas. Foram utilizadas diferentes proporções de modificador orgânico (metanol ou acetonitrila), faixas de pH, concentrações de trietilamina e fluxos da fase móvel de modo a se obter uma melhor condição cromatográfica para análise das vitaminas, com menor tempo de retenção, picos de interesse com boa resolução e eluição das vitaminas com tempos diferentes dos compostos interferentes presentes nas amostras. Para validação dos métodos foram realizados testes de recuperação, repetibilidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação. Os métodos otimizados apresentaram boa resolução dos picos das vitaminas pesquisadas e excelente recuperação para tiamina e ácido fólico (em média: 82,6 a 104% e 87,5 a 96% respectivamente), repetibilidade com desvio padrão relativo das áreas dos picos e dos tempos de retenção menor que 10% e altos coeficientes de determinação (0,9998 para tiamina e 0,9997 para ácido fólico). Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 0,00193 µg e 0,0193 µg para tiamina e 0,000934 µg e 0,00934 µg para ácido fólico. Os métodos otimizados demonstraram confiabilidade e sensibilidade na detecção e quantificação de tiamina e ácido fólico em grãos crus de UR[®] e na mistura destes grãos com arroz polido, antes e após diferentes técnicas de cocção, indicando que podem ser utilizados com segurança para análise destas vitaminas em arroz fortificado.

Palavras chave: Micronutrientes, fortificação de alimentos, vitaminas do complexo B.

ABSTRACT

This study aimed to optimize and validate methods for determination of thiamine and folic acid in raw grains of Ultra Rice[®] (UR[®]), as well as in the mixture of these grains with polished rice, before and after cooking. Thiamine and folic acid analysis were made by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography coupled to a photodiode array detector (RP-HPLC-DAD). Different mobile phases were tested. Different proportions of organic modifier (methanol or acetonitrile), pH ranges, triethylamine concentrations and mobile phase flows were used to obtain a better condition for chromatographic analysis of the vitamins with lower retention time, with peaks of interest with good resolution and elution of vitamins with different times of the interfering compounds present in the sample. For methods validation, tests of recovery, repeatability, linearity, limits of detection and quantification were made. The optimized methods showed good resolution of the peaks of the vitamins investigated and excellent recovery for thiamine and folic acid (average of 82.6 to 104% and 87.5 a 96%, respectively), repeatability with relative standard deviation of peak areas and retention times lower than 10% and high determination coefficients for linearity test (0.9998 for thiamine and 0.9997 for folic acid). The detection and quantification limits were, respectively, 0.00193 µg and 0.0193 µg for thiamine and 0.000934µg and 0.00934µg for folic acid. The optimized methods demonstrated reliability and sensitivity for detection and quantification of folic acid and thiamine in raw grains of UR[®] and in the mixture of these grains with polished rice, before and after different techniques of cooking, indicating that these methods can be safely used for analysis of these vitamins in fortified rice.

Key words: micronutrients, food fortification, B complex vitamins.

1. INTRODUÇÃO

A fortificação de alimentos constitui-se numa importante estratégia global de prevenção às deficiências de micronutrientes em diversas populações (ZANCUL, 2004; VELLOZO ; FISBERG, 2010). Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2012), o arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo, caracterizando-se como um alimento habitualmente consumido por grande parte da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. A produção mundial de arroz é de aproximadamente 606 milhões de toneladas, sendo que o Brasil participa com 13.140.900 t (2,17% da produção mundial) e destaca-se entre os 10 maiores produtores (WALTER; MARCHEZANII; AVILA; 2008).

Por meio da tecnologia de fortificação Ultra Rice[®] (UR[®]) é possível obter, por um processo de extrusão, grãos idênticos ao arroz convencional, a partir da farinha de arroz, os quais podem ser adicionados de ferro, zinco, tiamina, ácido fólico e vitamina A (PATH, 1999). O UR[®] pode ser misturado ao arroz convencional em proporções que variam de 1:50 a 1:200 (LEE; HAMER; EITENMILLER, 2000), com o intuito de obter preparações de arroz que veiculem maior concentração desses nutrientes e contribuam para o controle de deficiências nutricionais, especialmente nos grupos vulneráveis.

O conhecimento das concentrações de nutrientes em alimentos, entre eles as vitaminas, é imprescindível para a elaboração de planos alimentares e para a análise de estudos de ingestão de nutrientes e adequação nutricional (DELLA LUCIA *et al.*, 2011).

Assim, é essencial que se disponha de métodos de análises confiáveis de micronutrientes, especialmente as vitaminas, tanto nos grãos de UR[®] puros, como naqueles misturados ao arroz convencional antes e após diferentes técnicas de cocção de uso rotineiro.

No entanto, a determinação de vitaminas do complexo B em alimentos é bastante difícil, devido à instabilidade química e à complexidade das matrizes alimentares. Métodos analíticos para determinação de tiamina e ácido fólico em alimentos fortificados e não fortificados encontram-se disponíveis na literatura, entretanto, para arroz fortificado, estudos que analisaram estas vitaminas utilizando metodologias confiáveis como a cromatografia líquida de alta

eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) são escassos.

A escolha do método de análise depende da precisão e sensibilidade necessárias. Além disso, diferenças intrínsecas entre os diversos tipos de matrizes alimentares e a presença de compostos interferentes implicam na necessidade de otimização de técnicas específicas de extração e análise (LYNCH ;YOUNG, 2000).

A confiabilidade no desempenho de um método é obtida por meio da determinação de parâmetros de validação. Alguns dos principais requisitos e parâmetros a serem estudados durante o desenvolvimento do processo analítico para fins de validação do método em uma matriz alimentar são linearidade, sensibilidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), exatidão e precisão (PRESOTO ;ALMEIDA-MURADIAN, 2008).

De acordo com Dong *et al.* (1988), a composição da fase móvel em termos de tipo de reagente íon-par, pH, modificador orgânico e aditivos como trietilamina, influencia na análise cromatográfica por CLAE, especialmente no aumento ou redução do tempo de retenção dos compostos de interesse e na resolução dos picos.

Uma vez que não estão disponíveis na literatura estudos que tenham avaliado a concentração de tiamina e ácido fólico no UR[®], o presente trabalho teve como objetivo otimizar e validar métodos para análise dessas vitaminas por CLAE-DAD em grãos crus de UR[®] puro e em preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção por diferentes técnicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e outros materiais

Para análise de tiamina e ácido fólico foram utilizados os seguintes reagentes grau HPLC: sal sódico do ácido hexano sulfônico (Sigma-Aldrich, Alemanha); sal sódico do ácido heptano sulfônico (Sigma – Aldrich, Alemanha); ácido acético glacial (Tedia, Brasil); água ultrapura produzida em sistema Milli-Q[®] (Millipore, EUA); metanol (Tedia, Brasil) e trietilamina (Tedia, Brasil). Utilizou-se, ainda, hidróxido de potássio (Vetec, Brasil) e fosfato de sódio monobásico anidro (Synth, Brasil) com grau de pureza analítico. Para filtração

dos extratos utilizou-se papel de filtro (Inlab, tipo 50,9 cm de diâmetro) e unidades filtrantes (HV Millex, 0,45 µm de porosidade, Millipore, Brasil).

Os padrões de tiamina e ácido fólico foram obtidos da Sigma-Aldrich® (Alemanha) e Isofar (Brasil), respectivamente.

2.2. Equipamentos

Para o preparo das amostras para análise de tiamina e ácido fólico foram utilizados: processador doméstico de alimentos (Faet Multipratic, MC5), moinho analítico (Quimis, Q298A), microtritador (Marconi, MA 102), balança semi-analítica (Gehaka, BG 2000), balança analítica digital (Gehaka, AG 200), balança semi analítica digital (Trentin, BT-001), pHmetro (Hexis, UB10), bomba de vácuo (Tecnal, TE-058), centrífuga (Excelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 mL, Fanem, 206-R), agitador magnético (Marconi, MAO 89), espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60S), sistema de filtração para fase móvel (All Glass), sistema de ultrapurificação de água (Millipore, Direct Q UV 3) e degaseificador ultrassônico (Odontobrás, T-14).

Para análise de tiamina e ácido fólico foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, SCL 10AT VP) composto de bomba de alta pressão (LC-10AT VP), injetor automático com alça de amostragem de 500 µL (SIL-10AF) e detector de arranjo de diodos (SPD-M10A).

2.3. Matéria-prima

Foi utilizado um tipo de arroz fortificado (UR®) com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico, produzido a partir da farinha de arroz por um fabricante de massas alimentícias, localizado em Indaiatuba, São Paulo, Brasil após autorização pelo *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH), e uma marca de arroz polido tipo 1, classe longo fino, obtida em comércio local (Viçosa, MG, Brasil).

2.4. Técnicas de cocção das preparações de UR® adicionado ao arroz polido

Foram utilizadas três técnicas em nível laboratorial (a) refogado em óleo de soja seguido de cocção em água; b) cozido em água; c) cozido em água no forno de micro-ondas) e uma técnica em Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) de grande porte (cozido em água).

Para as técnicas de cocção em escala laboratorial, a quantidade preparada visou atender a uma família de quatro pessoas, enquanto que, em larga escala, previu-se o atendimento de aproximadamente 666 pessoas, de um total de aproximadamente 4000 refeições servidas no almoço diariamente.

Nas técnicas de cocção em nível laboratorial, a mistura do UR[®] ao arroz polido, na proporção de 1:100, foi realizada pesando-se em balança analítica digital 2 g de UR[®] e em balança semi analítica digital 198 g de arroz polido (não lavado em água corrente). Posteriormente, a mistura foi realizada manualmente em recipiente de vidro. Para a técnica de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição foram pesados em balança semi-analítica digital 0,6 kg de UR[®] e 59,4 kg de arroz polido (previamente lavado em água corrente). A mistura dos grãos foi realizada após adição no panelão americano.

2.4.1. Cocção em escala laboratorial

Para a preparação cozida em água, adicionou-se água (600 mL) em uma panela doméstica (capacidade de 1 L), juntamente com óleo de soja (20 mL) e sal (5 g). A água foi aquecida até ebulição, e logo em seguida, o UR[®] adicionado ao arroz polido foi acrescentado. O cozimento foi feito em fogo baixo, com a panela semi-tampada por aproximadamente 12 minutos. Após evaporação da água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz foi homogeneizado e pesado.

Para a preparação refogada em óleo e cozida em água, adicionou-se óleo de soja (20 mL) em uma panela doméstica (capacidade de 1 L) e levou-se ao fogo. O UR[®] adicionado ao arroz polido (200 g) foi acrescentado juntamente com o sal (5 g) e refogado por aproximadamente 3 minutos sendo, em seguida, acrescentada água previamente aquecida até ebulição (600 mL). O cozimento foi feito em fogo baixo, com a panela semi-tampada, por aproximadamente 15 minutos. Após evaporação da água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz foi homogeneizado e pesado.

A preparação cozida em água no forno de micro-ondas foi realizada em recipiente de vidro apropriado, onde foi acrescentado o UR[®] adicionado ao arroz polido (200 g), sal (5 g), óleo de soja (20 mL) e água (400 mL). A mistura foi levada ao micro-ondas, com o recipiente semi-tampado, em potência alta

(100%) por 8 minutos. Após este período, o recipiente permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos e, logo em seguida, o arroz foi homogeneizado e pesado.

2.4.2. Cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição

Acrescentou-se água (60 L) em caldeirão americano de 300 L juntamente com o óleo de soja (5 L) e o sal (2 Kg). Após aquecimento e ebulição da água, a mistura (60 Kg) foi adicionada. O cozimento foi feito com o caldeirão tampado, em vapor médio (800 a 1000 Kg/cm²) por 40 minutos. Após este período, o vapor foi desligado, e o caldeirão permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos. Logo em seguida, o arroz foi homogeneizado e pesado.

2.5. Otimização dos métodos de extração e análise de tiamina e ácido fólico

A extração e análise das vitaminas foram realizadas no Laboratório de Análise de Vitaminas (LAV), do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As análises foram realizadas em cinco repetições para extração e a injeção de cada extrato foi feita em duplicata.

Durante as análises químicas, as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo *blackout*, e sob proteção do oxigênio, por meio da utilização de vidrarias com tampas.

Para análise de tiamina e ácido fólico nos grãos de UR[®] crus e naqueles adicionados ao arroz polido cru, as amostras foram trituradas em moinho microanalítico, e para análise dessas vitaminas no UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção, as amostras foram homogeneizadas em processador doméstico de alimentos.

2.5.1. Extração de tiamina

Para otimização do método de extração de tiamina, partiu-se inicialmente da metodologia descrita por Anyakora *et al.* (2008), com as seguintes modificações: a) ajuste do pH da solução extratora para uma faixa entre 2 e 4 (faixa de pH mais estável para tiamina) (EITENMILLER; YE; LANDEN. JR, 2008); b) centrifugação para decantação dos resíduos sólidos e filtração para limpeza do extrato; c) redução do peso das amostras para

aproximadamente 1 g de UR[®] cru e 2 g do UR[®] adicionado ao arroz polido cru e após cocção; d) redução do volume de solução extratora para aproximadamente 22 mL (para definição destas quantidades, foi levado em consideração um menor tempo de centrifugação e a capacidade do solvente em extrair os compostos de interesse).

Para extração de tiamina, pesou-se em balança analítica digital 1 g de UR[®] cru e 2 g do UR[®] adicionado ao arroz polido cru e após cocção. Acrescentou-se 22 mL de solução extratora composta por solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%). O pH desta solução foi ajustado para 3,5 com KOH (10 M). A amostra foi homogeneizada em microtritador por aproximadamente 3 minutos e, logo em seguida, centrifugada a 4000 rpm (1789 g) em centrífuga de tubos por 7 minutos (UR[®] cru), 12 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido cru) e 15 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção). O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de bomba de vácuo em funil de büchner, utilizando-se papel de filtro. O filtrado foi retomado em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução extratora. O extrato foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise, que ocorreu, no máximo, após 1 hora. A análise de tiamina em cada amostra foi realizada em duplicata.

2.5.2. Extração de ácido fólico

Para otimização do método de extração de ácido fólico, também foram utilizados os mesmos procedimentos de centrifugação e filtração utilizados para tiamina. A solução extratora utilizada baseou-se em metodologia descrita por Della Lucia *et al* (2011), sendo utilizados aproximadamente 1 g de UR[®] cru e 3 g do UR[®] adicionado ao arroz polido cru e após cocção.

Para extração de ácido fólico pesou-se em balança analítica digital aproximadamente 1 g de UR[®] cru e 3 g do UR[®] adicionado ao arroz polido cru e após cocção. Acrescentou-se 22 mL de solução extratora composta por tampão monofosfato (0,1 M), pH 6,0 ajustado com KOH (10 M). A amostra foi homogeneizada em microtritador por aproximadamente 3 minutos e, logo em seguida, centrifugada a 4000 rpm (1789 g) em centrífuga de tubos por 7 minutos (UR[®] cru), 15 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido cru) e 18 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção). O sobrenadante foi

filtrado com auxílio de bomba de vácuo em funil de büchner, utilizando-se papel de filtro. O filtrado foi retomado em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução extratora. O extrato foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4 ± 1 °C) até o momento da análise, que ocorreu, no máximo, após 1 hora. A análise de ácido fólico em cada amostra foi realizada em duplicata.

2.5.3. Preparo dos padrões

Foram preparadas soluções estoque dos padrões de tiamina e ácido fólico (100 µg/mL) em HCl 0,1 N e NaOH 0,1 M, respectivamente, as quais foram utilizadas para o preparo de soluções com diferentes concentrações dos compostos.

A concentração real dos padrões de tiamina e ácido fólico foi verificada por espectrofotometria e corrigida.

Para tiamina utilizou-se a seguinte equação:

$C (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \text{ABS} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$, onde C = concentração; ABS = absorvância máxima (lida a 247 nm) e $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorvidade molar (410, solvente HCl 0,1 N) (SWAN-CHOO ;E-SIONG, 1996).

Para ácido fólico utilizou-se a seguinte equação:

$A = E_{1\text{cm}}^{1\%} \times C \times L$, onde A = absorvância máxima (lida a 282 nm) e $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorvidade molar (23,8, solvente NaOH 0,1 M) (BALL, 2006); C = concentração molar; L = largura da cubeta (1 cm).

2.5.4. Condições testadas para análise por CLAE

Diferentes composições de fase móvel foram testadas para análise de tiamina (Tabela 1) e ácido fólico (Tabela 2). Além disso, foram testados fluxos distintos para análise de ácido fólico. As análises foram realizadas em grãos de UR[®] crus e UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção. O processo de otimização seguiu os passos apresentados na Figura 1.

Para análise, inicialmente utilizou-se metodologia descrita por Anyakora *et al* (2008) e Dong *et al* (1988) com adaptações.

A condição cromatográfica descrita a seguir foi otimizada para análise de tiamina: fase móvel composta por solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (75: 25), adicionada de trietilamina (0,1%) e pH ajustado para 3,5 com KOH (10 M); coluna RP18 (Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm), equipada com coluna de guarda

(Phenomenex ODS (RP18); 4 mm x 3 mm). A análise foi realizada em modo isocrático com fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 10 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 247 nm.

A condição cromatográfica otimizada para ácido fólico, conforme apresentado na Tabela 2, baseou-se em procedimento descrito por Anyakora *et al* (2008) e Dong *et al* (1988) com adaptações: fase móvel composta por solução de sal sódico do ácido heptano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (80: 20), adicionada de trietilamina (0,1%) e pH 5,0 ajustado com KOH 10 M; coluna RP18 (Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm), equipada com coluna de guarda (Phenomenex ODS (RP18); 4 mm x 3 mm). A análise foi realizada em modo isocrático com fluxo de 0,7 mL/min e tempo de corrida de 12 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 282 nm.

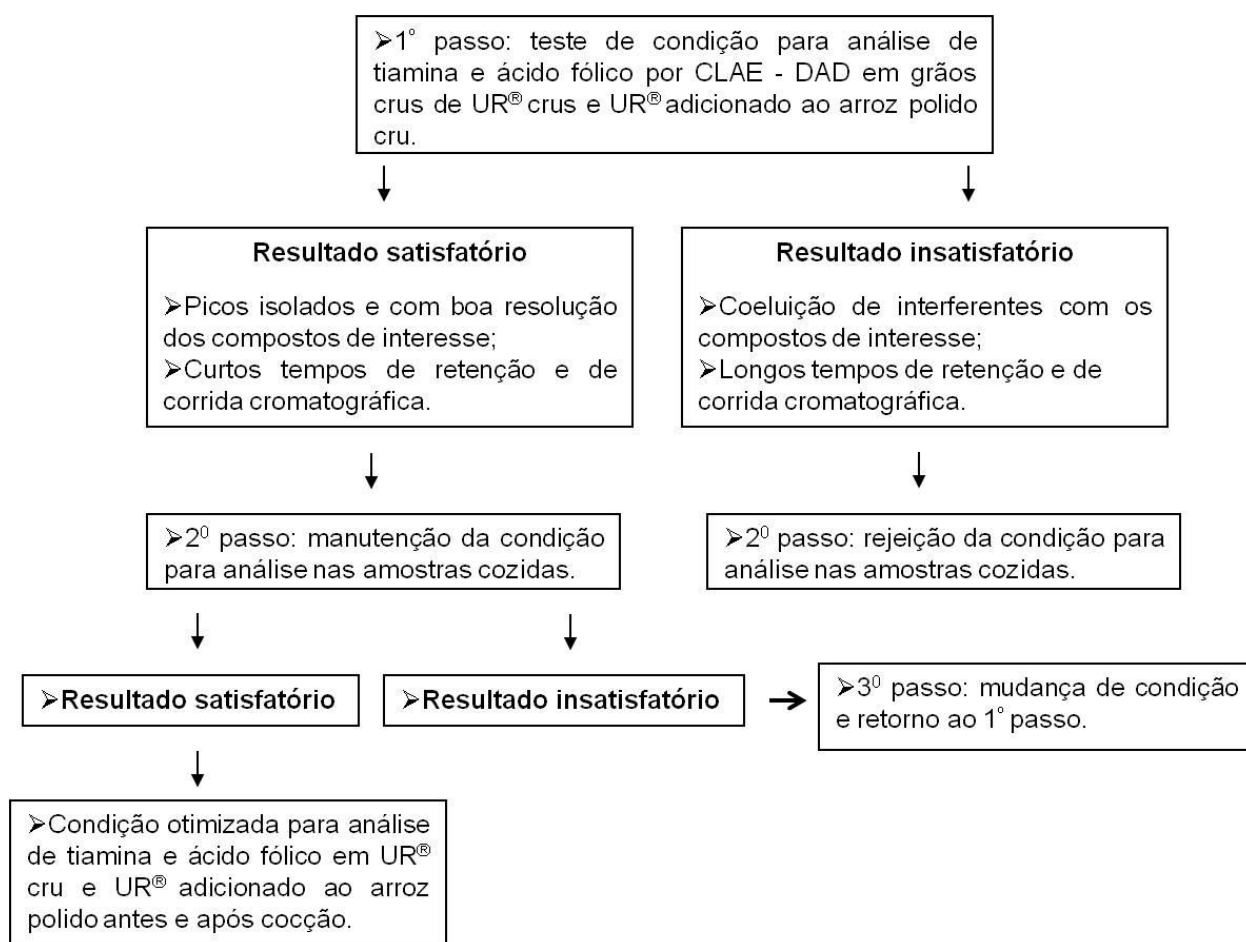


Figura 1. Árvore decisória do processo de otimização dos métodos para análise de tiamina e ácido fólico em grãos de UR® crus e UR® adicionado ao arroz polido antes e após cocção.

Tabela 1. Fases móveis e fluxos testados para análise de tiamina em UR[®] cru (A), UR[®] adicionado ao arroz polido cru (C) e UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção (B e D).

Condição	Sal sódico do ácido hexano sulfônico	Ácido acético glacial	Sal sódico do ácido hexano sulfônico+ ac. acético glacial: metanol	Trietilamina	pH	Fluxo
Anyakora <i>et al.</i> (2008)	5 mM	0,01%	70:30	-	-	1 mL/min
Dong <i>et al.</i> (1988)	4-7 mM	1%	80-87,5:12,5-20	0,1-0,13%	2,8-3,2	-
A	5 mM	0,01%	70:30	0,09%	-	1 mL/min
B	6 mM	0,5%	70:30	0,05%	-	1 mL/min
C	5 mM	1%	85:15	0,1%	2,8	1 mL/min
D	5 mM	1%	75:25	0,1%	3,5	1 mL/min

Tabela 2. Fases móveis e fluxos testados para análise ácido fólico em UR[®] cru (A e D), UR[®] adicionado ao arroz polido cru (B) e UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção (C, E e F).

Condição	Sal Sódico do ácido Heptano Sulfônico	Ácido acético glacial	Sal sódico do ácido heptano sulfônico + ác. acético glacial: Metanol	Sal sódico do ácido heptano sulfônico + ác. acético glacial: Acetonitrila	Trietilamina	pH	Fluxo
Anyakora <i>et al.</i> (2008)*	-	0,01%	-	-	-	-	1 mL/min
Dong <i>et al.</i> (1988)	5 mM	1%	85:15	93:7	0,1 – 0,13%	2,8-3,2	-
A	5 mM	1%	-	90:10	0,05%	3,5	1,2 mL/min
B	5 mM	1%	-	85:15	0,05%	3,0	0,8 mL/min
C	5 mM	1%	-	80:20	0,05%	3,0	0,5 mL/min
D	5 mM	1%	75:25	-	0,1%	3,5	1 mL/min
E	5 mM	1%	70:30	-	0,1%	5,0	0,6 mL/min
F	5 mM	1%	80:20	-	0,1%	5,0	0,7 mL/min

2.6. Identificação e quantificação da tiamina e ácido fólico

A identificação qualitativa foi realizada injetando-se os padrões de tiamina (mononitrato de tiamina) e ácido fólico e comparando-se os tempos de retenção obtidos para os padrões e para as amostras analisados sob as mesmas condições. Além disso, tiamina e ácido fólico foram identificados por co-cromatografia.

Para a quantificação dos compostos foram utilizadas curvas analíticas. Foram preparadas soluções com concentrações crescentes dos padrões nas respectivas soluções extratoras para cada vitamina (solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1%, pH 3,5, para tiamina e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, para ácido fólico).

As curvas analíticas para tiamina e ácido fólico foram elaboradas levando-se em consideração a concentração destas vitaminas no UR[®] cru e no UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção. Utilizou-se injeção em duplicata de soluções padrão, sendo injetados para tiamina três concentrações crescentes de um mesmo volume e três volumes crescentes para uma mesma concentração, na faixa de 0,014 µg/mL a 7,463 µg/mL e para ácido fólico, cinco concentrações crescentes para um mesmo volume de injeção e dois volumes crescentes para uma mesma concentração, na faixa de 0,00477 µg/mL a 0,95 µg/mL.

A quantificação da tiamina e do ácido fólico no UR[®] cru e no UR[®] adicionado ao arroz polido cru e após cocção foi feita a partir das curvas analíticas e equações de regressão obtidas (tiamina: $Y = 2381473,1982X + 122852,4402$; $R^2 = 0,9998$; ácido fólico: $Y = 4736910,1846X - 8543,3495$; $R^2 = 0,9997$). O cálculo da concentração real foi obtido a partir das diluições realizadas.

3. Validação dos métodos de análise

3.1. Testes de recuperação e faixa de linearidade

Foram realizados testes de recuperação de tiamina e ácido fólico pela adição dos padrões no UR[®] cru e nas preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção. O percentual de recuperação foi calculado por meio da fórmula: % de recuperação = (concentração final da vitamina) - (concentração adicionada da vitamina) / (concentração inicial da vitamina) x 100. As análises foram realizadas em triplicata.

A determinação da faixa de linearidade dos compostos foi realizada pela injeção, em duplicata, de seis concentrações crescentes das soluções padrão de cada vitamina, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas empregadas para análise dos extratos. Os dados obtidos para as áreas dos picos foram usados para análise de regressão linear. O coeficiente de

determinação (R^2) obtido em cada caso foi utilizado para avaliação da linearidade (LANÇAS, 2004).

3.2. Limites de detecção e de quantificação

A avaliação do limite de detecção (LD) foi realizada por diluições sucessivas dos padrões de tiamina e ácido fólico, seguida da determinação da menor quantidade detectável, como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído da linha de base ($S/R \geq 3$). O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo 10 vezes o LD (CATHARINO; GODOY; LIMA-PALLONE, 2006).

3.3. Repetibilidade

O teste de repetibilidade foi realizado pela extração e análise da tiamina e do ácido fólico, em quintuplicata, do UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção. A avaliação da repetibilidade foi realizada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das áreas dos picos e dos tempos de retenção dos componentes analisados (LANÇAS, 2004).

4. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para a análise do conteúdo de tiamina e do ácido fólico foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições para extração de tiamina e ácido fólico, sendo a análise realizada em duplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando-se o teste de Duncan ($\alpha = 5\%$). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE INC, 2003), licenciado para a UFV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização dos métodos para análise de tiamina e ácido fólico

4.1.1. Análise de tiamina

Os cromatogramas típicos das condições testadas para análise de tiamina estão apresentados na Figura 2. Inicialmente, foi testada a condição descrita por Anyakora et al. (2008), utilizada para análise de vitaminas do complexo B em cereais, cuja fase móvel foi composta por solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 0,01% em água ultrapura: metanol (70:30). Nesta condição, observou-se a eluição de outro composto muito próximo à tiamina, interferindo na resolução e qualidade da análise (Condição A = Figura 2A), inviabilizando sua utilização.

Resultado semelhante ao anterior foi observado na condição B (Figura 2B), cuja fase móvel utilizada foi composta de solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico 6 μM e ácido acético glacial 0,5% em água ultrapura: metanol (70:30) acrescida de trietilamina 0,05%. Nesta condição, também se observou eluição de um composto interferente juntamente à tiamina. O aumento na concentração do reagente íon-par (sal sódico do ácido hexano sulfônico) e do ácido acético glacial praticamente não alterou o tempo de retenção da tiamina, em relação à condição A.

A partir da condição C, as concentrações do reagente íon-par (5 μM), do ácido acético glacial (1%) e da trietilamina (0,1%) foram mantidas constantes, conforme condições ótimas para análise de vitaminas hidrossolúveis descritas por Dong *et al.* (1988), enquanto que a proporção metanol: sal sódico do ácido hexanosulfônico e ácido acético glacial sofreu variação, assim como o pH da fase móvel. Na condição C (Figura 2C) utilizou-se como fase móvel solução do sal sódico do ácido hexanosulfônico e acético glacial: metanol (85:15), pH 2,8, observando-se um pico de tiamina com boa resolução. Entretanto, como o tempo de retenção da tiamina foi relativamente longo (superior a 10 minutos), optou-se por prosseguir com a otimização para a condição D, na qual foi obtido tempo mais curto na análise cromatográfica dessa vitamina. Esta redução foi alcançada mediante aumento do volume de metanol (modificador orgânico) e variação do pH da fase móvel.

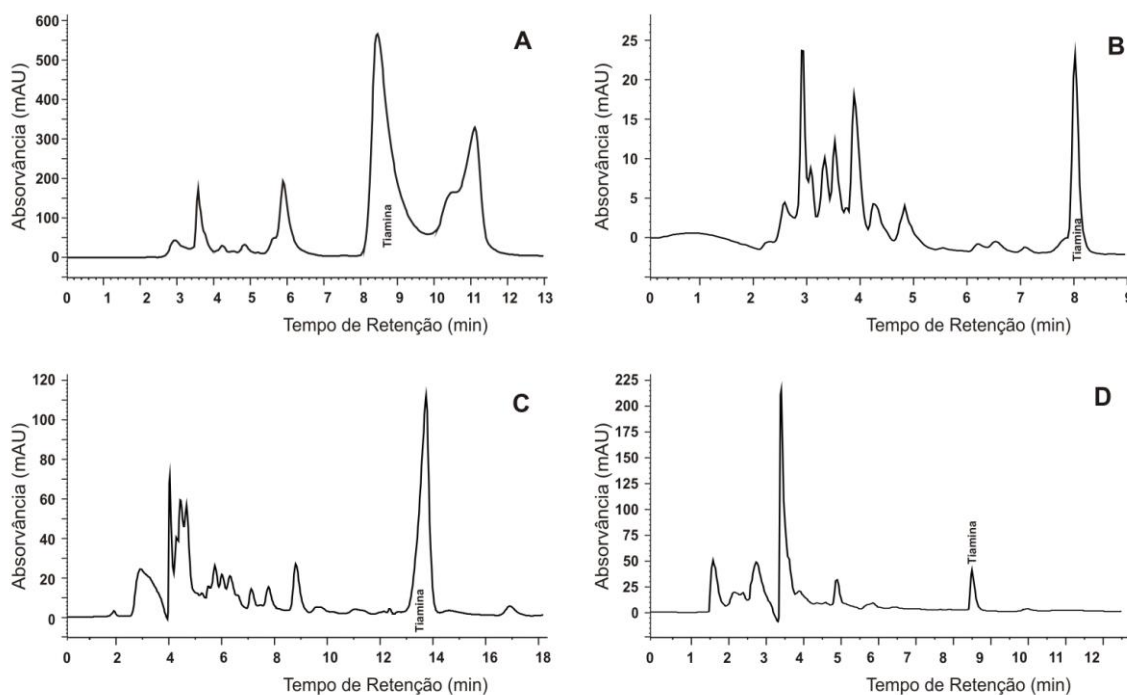


Figura 2. Cromatogramas típicos das condições testadas para análise de tiamina em UR[®] cru (A), UR[®] adicionado ao arroz polido antes da cocção (C) e UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção (B e D). As condições cromatográficas estão na Tabela 1 (Condição A = Figura 2A; Condição B = Figura 2B; Condição C = Figura 2C; Condição D = Figura 2D).

A condição otimizada para análise de tiamina foi a condição D (Figura 2D), na qual a fase móvel foi composta por solução do sal sódico do ácido hexano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1% diluídos em água ultrapura: metanol (75:25) acrescida de trietilamina 0,1%, pH ajustado para 3,5 com KOH 10 M. Essa condição apresentou boa resolução para o pico de tiamina e reduzido tempo de corrida cromatográfica, refletindo positivamente tanto na quantificação confiável desta vitamina quanto em curto tempo de análise. A menor área do pico de tiamina na Figura 2D em relação às demais deve-se ao fato de essa condição ter sido testada não somente para o UR[®] cru, na qual seria esperada maior área do pico, mas também para o UR[®] adicionado ao arroz polido submetido à cocção. Ou seja, além da concentração de tiamina apresentar-se menor (mais diluída), uma vez que o UR[®] é adicionado ao arroz polido em uma proporção de 1:100, essa vitamina ainda sofreu o impacto da cocção.

4.1.2. Análise de ácido fólico

Os cromatogramas típicos das condições testadas para análise de ácido fólico estão apresentados na Figura 3. Nas condições A, B e C, utilizou-se acetonitrila como modificador orgânico. Na condição A (Figura 3A), cuja fase móvel foi composta por solução de sal sódico do ácido heptano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1% diluídos em água ultrapura: acetonitrila (90:10), acrescida de trietilamina 0,05%, pH 3,5 ajustado com KOH 10 M e fluxo 1,2 mL/minuto, foi obtida uma boa resolução para o pico de ácido fólico. Entretanto, esta condição não foi utilizada devido ao tempo relativamente longo de corrida cromatográfica (aproximadamente 20 minutos).

Na condição B (Figura 3B) foi utilizada fase móvel composta por solução de sal sódico do ácido heptano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1% diluídos em água ultrapura: acetonitrila (85:15), acrescida de trietilamina 0,05%, com pH 3,0 ajustado com KOH 10 M e fluxo de 0,8 mL/minuto, a qual resultou em redução do tempo de retenção do ácido fólico para aproximadamente 8 minutos. Entretanto, alguns compostos interferentes co-eluíram juntamente com essa vitamina, levando a não utilização dessa condição. Na condição C, elevou-se a concentração de acetonitrila da fase móvel de 15% para 20% e o fluxo foi reduzido de 0,8 para 0,5 mL. Como resultado obteve-se uma separação quase total do ácido fólico, porém ainda não satisfatória (Figura 3C).

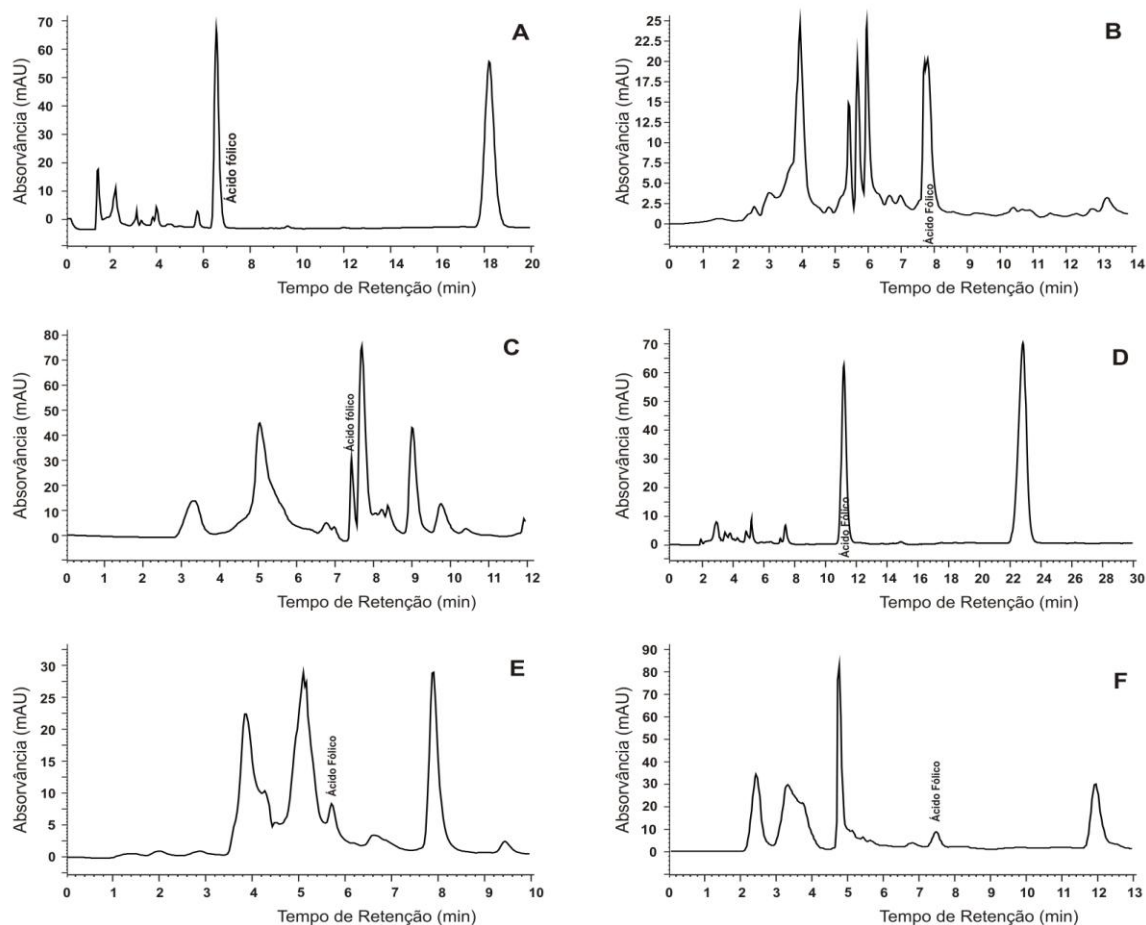


Figura 3. Cromatogramas típicos das condições testadas para análise de ácido fólico em UR[®] cru (A e D), UR[®] adicionado ao arroz polido antes da cocção (B) e UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção (C, E e F). As condições cromatográficas estão apresentadas na Tabela 2 (Condição A = Figura 3A; Condição B = Figura 3B; Condição C = Figura 3C; Condição D = Figura 3D; Condição E = Figura 3E; Condição F = Figura 3F).

Nas condições D, E e F foi utilizado metanol como modificador orgânico em substituição à acetonitrila. Na condição D (Figura 3D), cuja fase móvel foi composta por solução de sal sódico do ácido heptano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1%, diluídos em água ultrapura: metanol (75:25), adicionada de trietilamina 0,1%, pH 3,5 ajustado com KOH 10 M e fluxo de 1 mL/minuto, apesar do pico de ácido fólico ter apresentado boa resolução, o tempo de corrida cromatográfica foi longo (> 24 minutos).

A condição E difere da condição D por apresentar 30% de metanol na fase móvel, pH 5,0 e fluxo de 0,6 mL/minuto, o que levou à redução do tempo de retenção do ácido fólico para aproximadamente 5,5 minutos. Entretanto, outros compostos eluíram próximos à essa vitamina, prejudicando a resolução e a qualidade da análise (Figura 3E).

Finalmente, a condição mais adequada (condição F) para análise de ácido fólico foi obtida quando se reduziu a concentração de metanol na fase móvel para 20% e aumentou-se o fluxo para 0,7 mL/minuto, verificando-se boa resolução para o pico de interesse e curto tempo de corrida cromatográfica (13 minutos) (Figura 3F). Essa condição permitiu a quantificação confiável de ácido fólico nas amostras, além de reduzido tempo de análise. Da mesma forma que para a tiamina, a menor área do pico de ácido fólico nessa Figura em relação às demais se deve ao fato de a amostra de UR[®] ter sido misturada ao arroz polido e além disso, submetida à cocção, acarretando redução do conteúdo dessa vitamina.

4.2. Conteúdo de tiamina e ácido fólico no arroz fortificado antes e após cocção

A Tabela 3 apresenta o conteúdo de tiamina e ácido fólico nos grãos crus de UR[®], bem como no UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção. O conteúdo de tiamina foi estatisticamente superior no UR[®] adicionado ao arroz polido cozido em forno de micro-ondas (0,36 mg/100 g), seguido da preparação cozida em UAN (0,31 mg/100 g). O conteúdo de tiamina na preparação cozida em água e na preparação refogada em óleo e cozida em água não apresentou diferença estatística (média de 0,25 mg/100g). O conteúdo de ácido fólico não apresentou diferença significativa ($p = 0,1821$) entre as preparações, sendo em média de 0,75 mg/100g.

Tabela 3. Conteúdo médio (mg/100g) de tiamina e ácido fólico em grãos de UR[®] crus e no UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção (matéria fresca) .

Amostra	Tiamina (Média ± DP)	Ácido Fólico (Média ± DP)
UR [®] cru	149,30 ± 1,93	19,35 ± 0,10
UR [®] adicionado ao arroz polido cru	1,49 ± 0,38	0,24 ± 0,01
UR [®] adicionado ao arroz polido cozido no forno de micro-ondas	0,36 ± 0,01 ^a	0,077 ± 0,003 ^a
UR [®] adicionado ao arroz polido refogado em óleo e cozido em água	0,25 ± 0,01 ^c	0,081 ± 0,007 ^a
UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em água	0,26 ± 0,02 ^c	0,070 ± 0,003 ^a
UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em	0,31 ± 0,02 ^b	0,074 ± 0,011 ^a

Unidade de Alimentação e Nutrição

Médias das preparações cozidas seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$)

Na literatura não se encontram disponíveis dados acerca do conteúdo de tiamina e ácido fólico neste arroz fortificado, tanto cru quanto cozido, entretanto, de acordo com o PATH, a quantidade de tiamina e ácido fólico adicionada nos grãos crus de UR[®] é, em média, 164,6 mg e 22,2 mg em 100 g de UR[®] respectivamente. Em nosso estudo encontramos valores bem próximos aos relatados anteriormente, sendo de aproximadamente 149,3 mg para tiamina e 19,35 mg para ácido fólico em 100 g de UR[®]. Estes dados refletem confiabilidade nas metodologias otimizadas para análise de tiamina e ácido fólico nos grãos de UR[®].

4.3. Validação dos métodos de análise de tiamina e ácido fólico

4.3. 1. Linearidade

A tiamina e o ácido fólico apresentaram excelente linearidade nas faixas de concentração utilizadas (tiamina: entre 0,014 µg/mL a 7,463 µg/mL; ácido fólico: entre 0,00477 µg/mL a 0,95 µg/mL). O coeficiente de determinação para tiamina e ácido fólico foi de 0,9998 e 0,9997, respectivamente. Estudos que analisaram estas vitaminas encontraram coeficientes de determinação para tiamina na faixa de 0,9957 (SAN JOSÉ RODRIGUEZ *et al.*, 2012), 0,9967 (ALBALFI-HURTADO *et al.*, 1997), 0,9998 (HUCKER; WAKELING; VRIESEKOOOP, 2012), 0,9950 (PRESOTO; ALMEIDA-MURADIAN, 2008) e para ácido fólico na faixa de 0,9838 (ALBALFI-HURTADO *et al.*, 1997), 0,9997 (BOEN *et al.*, 2008), 0,9980 (LEBIEDZIŃSKA *et al.*, 2008) e 0,9999 (ALABURDA *et al.*, 2008).

4.3.2 Recuperação

A Tabela 4 mostra os percentuais de recuperação dos padrões de tiamina e ácido fólico adicionados ao arroz fortificado, antes e após cocção. As duas metodologias apresentaram excelentes percentuais de recuperação dos padrões adicionados às amostras, variando de 82 a 104% para tiamina e 87 a 96% para ácido fólico, estando estas faixas dentro do intervalo de 80 a 110% estabelecido pela AOAC (1993). Na literatura foram encontrados estudos semelhantes com percentuais de recuperação de tiamina entre 73 a 106% (PRESOTO; ALMEIDA-MURADIAN, 2008; HUCKER; WAKELING; VRIESEKOP, 2012; SAN JOSÉ RODRIGUEZ *et al.*, 2012) e de 81 a 103% para ácido fólico (PFEIFFER; ROGERS; GREGORY, 1997; ALABURDA *et al.*, 2008; BOEN *et al.*, 2008; LEBIEDZIŃSKA *et al.*, 2008).

Tabela 4. Percentuais de recuperação dos padrões de tiamina e ácido fólico adicionados ao UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção.

Vitamina	Amostra	Concentração inicial (µg/g)*	Padrão adicionado (µg/g)	Concentração final (µg/g)	Recuperação** (%)
Tiamina	UR [®] cru	487,60	254,80	776,70	104,62%
	UR [®] adicionado ao arroz polido cru	3,90	3,51	6,12	82,59%
	UR [®] adicionado ao arroz polido refogado em óleo e cozida em água	0,40	0,70	1,09	99,09%
	UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em forno de micro-ondas	3,69	1,93	5,26	93,59%
Ácido fólico	UR [®] cru	197,70	50	228,60	92,28%
	UR [®] adicionado ao arroz polido refogado em óleo e cozida em água	0,78	0,31	1,03	94,49%
	UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em água	0,76	0,14	0,87	96,66%
	UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em forno de micro-ondas	0,64	0,32	0,84	87,5%

*Média de amostras em triplicata

** % de Recuperação = (concentração final da vitamina) - (quantidade adicionada da vitamina) / (concentração inicial da vitamina) x 100

4.3.3. Repetibilidade

Na Tabela 5 estão apresentados os valores referentes ao desvio padrão relativo (DPR) das áreas dos picos e dos tempos de retenção de tiamina e ácido fólico nas amostras analisadas. Os resultados obtidos conferem

confiabilidade às condições de análise utilizadas na presente pesquisa visto que o desvio padrão relativo para a área dos picos e tempos de retenção obtidos para cada amostra ficou abaixo do limite de 10% (LANÇAS, 2004).

Tabela 5. Repetibilidade dos métodos de análise de tiamina e ácido fólico em UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção.

Composto	Amostra	DPR da área do pico (%)	DPR do tempo de retenção (%)
Tiamina	UR [®] cru	2,2	0,1
	UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em água	3	0,4
	UR [®] adicionado ao arroz polido refogado em óleo e cozida em água	7,4	1,2
Ácido Fólico	UR [®] cru	3,3	0,1
	UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em água	8,2	0,1
	UR [®] adicionado ao arroz polido refogado em óleo e cozido em água	3,9	0,3
	UR [®] adicionado ao arroz polido cozido em forno de micro-ondas	4,6	0,9

DPR: Desvio padrão relativo (%)

4.3.4. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção para tiamina e ácido fólico encontrados no presente estudo foram, respectivamente, de 0,00193 µg e 0,000934 µg. O valor encontrado para tiamina foi menor em relação aos limites de detecção encontrados por Hucker *et al.* (2012), Presoto; Almeida-Muradian. (2008) e San José Rodriguez. (2012), sendo, respectivamente, de 0,02 µg/g, 0,03 µg/g e 0,06 µg. Em relação ao ácido fólico, valores de 0,003 µg/mL, 0,0013 µg/mL, 0,06 µg/g foram encontrados, respectivamente, por Boen *et al.* (2008), Lebidzinska *et al* (2008) e Alaburda *et al* (2008).

O limite de quantificação foi considerado como sendo 10 vezes o valor do limite de detecção, sendo de 0,0193 µg para tiamina e 0,00934 µg para ácido fólico. Estes valores demonstram que as metodologias otimizadas permitem a detecção de concentrações muito reduzidas de tiamina e ácido fólico em arroz fortificado com estas vitaminas e adicionado ao arroz polido.

5. CONCLUSÃO

As metodologias otimizadas para análise de tiamina e ácido fólico por CLAE-DAD no UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção mostraram alta confiabilidade. Foram obtidas excelentes taxas de recuperação, boa repetibilidade, linearidade e sensibilidade demonstrada pelos baixos limites de detecção e quantificação. Além disso, as metodologias realizaram-se em modo isocrático, apresentando tempos curtos de corrida cromatográfica e de retenção das duas vitaminas (< 13 minutos), refletindo-se positivamente na economia de reagentes e tempos de análise.

6. REFERÊNCIAS

ALABURDA, J.; DE ALMEIDA, A. P.; SHUNDO, L.; RUVIERI, V., SABINO, M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, n. 4, p. 336-342, 2008.

ALBALFI-HURTADO, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; IZQUIERDO-PULIDO, M., MARINÉ-FONT, A. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 778, p. 247-253, 1997.

ANYAKORA, C.; AFOLAMI, I.; EHIANETA, T., ONWUMERE, F. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 2, n. 2, p. 29-36, 2008.

AOAC. *Peer Verified Methods Program. AOAC, Manual on Policies and Procedures* Arlington: AOAC International, 1993.

BALL, G. F. M. Folate. In: BALL, G. F. M. (Ed.). *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*. Boca Raton: CRC, 2006. p. 651.

BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; PEREIRA-FILHO, E. R., LIMA-PALLONE, J. A. Folic acid and iron evaluation in Brazilian enriched corn and wheat flours. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, p. 53-59, 2008.

CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T., LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. *Química Nova*, v. 29, p. 972-976, 2006.

DELLA LUCIA, C. M.; SILVA, E. R. D.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M., BRANDÃO, S. C. C. Otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Química Nova*, v. 34, p. 335-340, 2011.

DONG, M. W.; LEPORE, J.,TARUMOTO, T. Factors affecting the ion pair chromatography of water soluble vitamins. *Journal of Chromatography*, v. 442, p. 81-95, 1988.

EITENMILLER, R. R.; YE, L.,LANDEN. JR, W. O. Thiamin. In: . p. 297, 2008. In: EITENMILLER, R. R.; YE, L.; LANDEN. JR, W. O. (Ed.). *Vitamin Analysis for the Health and Food Science*. New York: Boca Raton, 2008. p. 291-318.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical databases*. 2012.Disponível em:<<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 18 de Abril.

HUCKER, B.; WAKELING, L.,VRIESEKOOP, F. Investigations into the thiamine and riboflavin content of malt and the effects of malting and roasting on their final content *Journal of Cereal Science*, v. 56, n. 2, p. 300-306, 2012.

LANÇAS, F. M. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. 6. ed., São Carlos, 2004.

LEBIEDZIŃSKA, A.; DĄBROWSKA, M.; SZEFER, P.,MARSZAŁŁ, M. High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Folic Acid in Fortified Food Products. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 18, p. 463-467, 2008.

LEE, J.; HAMER, M. L.,EITENMILLER, R. R. Stability of Retinyl Palmitate During Cooking and Storage in Rice Fortified with Ultra Rice™ Fortification Technology. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 5, p. 915-919, 2000.

LYNCH, P. L. M.,YOUNG, I. S. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 881, n. 1–2, p. 267-284, 2000.

PATH. Program for Appropriate Technology in Health. Seattle, Wa., Personal communication. 1999.

PFEIFFER, C. M.; ROGERS, L. M.,GREGORY, J. F. Determination of Folate in Cereal-Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 2, p. 407-413, 1997.

PRESOTO, A. E. F.,ALMEIDA-MURADIAN, L. B. D. Validação de métodos cromatográficos por clae para análise das vitaminas B1, B2, B6 e niacina naturalmente presentes em farinha de cereais. *Química Nova*, v. 31, p. 498-502, 2008.

SAN JOSÉ RODRIGUEZ, R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M.,SÁNCHEZ-MATA, M. C. Simultaneous determination of vitamin B1 and B2 in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science*, v. 55, n. 3, p. 293-299, 2012.

SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's Guide. Version 9.1* 4. ed., Cary, NC: SAS Institute Inc, 2003. 846 p.

SWAN-CHOO, K.,E-SIONG, T. Development of a HPLC method for the simultaneous determination of several B-vitamins and ascorbic acid. *Malaysian Journal of Nutrition*, v. 2, p. 49-65, 1996.

VELLOZO, E. P.,FISBERG, M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, p. 134-139, 2010.

ZANCUL, M. S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. *Medicina*, v. 37, p. 45-50, 2004.

6.3. Artigo 3

ESTABILIDADE DE TIAMINA E ÁCIDO FÓLICO EM ARROZ FORTIFICADO (ULTRA RICE®) ADICIONADO AO POLIDO APÓS DIFERENTES TÉCNICAS DE COCÇÃO

RESUMO

O presente trabalho avaliou o conteúdo e a estabilidade de tiamina e ácido fólico em preparações contendo arroz fortificado (Ultra Rice[®] -UR[®]) e arroz polido, na proporção de 1:100, após técnicas de cocção em escala laboratorial (refogado em óleo seguido de cocção em água, cozido em água, e cozido em forno de micro-ondas) e em Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN). A análise das vitaminas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-FR-DAD). A preparação cozida em forno de micro-ondas apresentou conteúdo de tiamina (0,36 mg/100g) estatisticamente superior às outras técnicas de cocção. Para ácido fólico, não houve diferença significativa entre as técnicas de cocção (conteúdo médio de 0,075 mg/100g). A maior estabilidade para tiamina e ácido fólico ocorreu na preparação cozida em forno micro-ondas (65,4% de retenção) e refogada em óleo e cozida em água (96,1% de retenção), respectivamente. A tiamina mostrou maior sensibilidade a perdas nas preparações de arroz (49,7 a 65,4% de retenção) em relação ao ácido fólico (75,6% a 96,1% de retenção). Considerando-se uma porção (62 g para crianças e 125 g para homens e mulheres acima de 9 anos), a preparação cozida em forno de micro-ondas pode contribuir com 37,5 a 50% das recomendações diárias de tiamina, enquanto que a preparação refogada em óleo e cozida em água pode contribuir com 32,5 a 52,8% das recomendações diárias de ácido fólico para diferentes grupos etários. A preparação cozida em UAN pode contribuir com 32,2 a 43% das recomendações diárias de tiamina e com 29,7 a 48,2% de ácido fólico. Em conclusão, o ácido fólico apresentou excelente estabilidade nas preparações contendo UR[®] e arroz polido. A preparação refogada em óleo de soja seguida de cocção em água e a cozida em forno de micro-ondas se destacaram apresentando maior estabilidade das vitaminas pesquisadas. As preparações contendo UR[®] e arroz polido apresentaram bom conteúdo de ácido fólico e tiamina, sendo que uma porção pode contribuir de forma importante para o atendimento das recomendações diárias das vitaminas.

Palavras-chave: Deficiência de micronutrientes, retenção, CLAE-FR-DAD, fortificação de alimentos.

ABSTRACT

This study evaluated the content and stability of thiamine and folic acid in preparations of Ultra Rice[®] (UR[®]) added to polished rice at a ratio of 1:100 after cooking techniques at a laboratory level (stir-frying before boiling, boiling, and boiling in a microwave oven) and in foodservice. The analysis was made by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography coupled to a photodiode array detector (RP-HPLC-DAD). The preparation cooked in microwave oven showed thiamine content (0.36 mg/100 g) statistically higher than the other techniques. For folic acid, there was no significant difference among cooking techniques (average content of 0.075 mg/100g). Higher stability for folic acid and thiamine occurred in the preparation cooked in microwave oven (retention of 65.4%) and stir-frying before boiling (retention of 96.1%), respectively. Thiamine showed higher sensibility to losses in rice preparations (49.7 to 65.4% of retention) compared to folic acid (75.6% to 96.1% of retention). Considering a portion (62 g for children and 125 g for men and women above 9 years old) for different age groups, the preparation cooked in microwave oven can contribute with 37.5 to 50% of the daily recommendations of thiamin, whereas the preparation using stir-frying before boiling can contribute with 32.5 to 52.8% of the daily recommendations of folic acid. The preparation cooked in foodservice can contribute with 32.2 to 43% of the daily recommendations of thiamin and 29.7 to 48.2% of folic acid. In conclusion, folic acid showed higher stability than thiamin in the different preparations of UR[®] added to the polished rice. The preparation that was stir-fried before boiled and the preparation boiled stood out showing higher stability of the vitamins studied. The preparations containing UR[®] and polished rice showed good content of folic acid and thiamin and a portion can contribute in an important way to the achievement of the vitamins daily recommendations.

Key words: Micronutrients deficiency, retention, RP-HPLC-DAD, food fortification

1. INTRODUÇÃO

A deficiência de micronutrientes é reconhecida como um importante problema em saúde pública de caráter global, sendo as deficiências de ferro, iodo e vitamina A as mais conhecidas. Outras deficiências como as de zinco, ácido fólico, vitamina D, vitamina B₁₂, cálcio e selênio são emergentes e também necessitam de atenção (ALLEN *et al.*, 2006).

Neste contexto, a fortificação de alimentos, que consiste na adição de vitaminas, minerais e outros nutrientes a alimentos de amplo consumo, tem sido recomendada como uma ação eficaz de prevenção destas deficiências (BATISTA FILHO, 2004; ZANCUL, 2004). Diversos alimentos têm sido utilizados no processo de fortificação, sendo os mais comuns, os cereais e suas respectivas farinhas (SILVA; CAMARGOS, 2006).

O arroz é um dos cereais mais produzidos no mundo, caracterizando-se como um alimento habitualmente consumido por grande parte da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), o consumo per capita anual deste cereal foi de 26,5 Kg (IBGE, 2012). Além disso, o Brasil está entre os 10 maiores produtores mundiais de arroz (cerca de 11,26 milhões de toneladas em 2010) (FAO, 2012).

A fortificação do arroz constitui-se numa importante estratégia de controle das deficiências de micronutrientes em países que tem este cereal como alimento básico da população (MARCHI; SZARFARC ;RODRIGUES, 2004). A tecnologia de fortificação de arroz Ultra Rice[®] (UR[®]) permite a produção de grãos a partir da farinha de arroz, por um processo de extrusão, idênticos ao arroz tradicional em tamanho, forma e textura. Além disso, podem ser adicionados vitamina A, ferro, zinco, tiamina e ácido fólico (PATH, 1999). Os grãos de Ultra Rice[®] (UR[®]) podem ser misturados ao arroz convencional (polido) de acordo com os níveis de enriquecimento desejados, em proporções que podem variar de 1:50 a 1:200 (LEE; HAMER; EITENMILLER, 2000).

Segundo o PATH (1999), a tecnologia UR[®] protege os micronutrientes inseridos no interior do grão fortificado, reduzindo a degradação e consequente perda dos nutrientes no período de armazenamento e nas etapas de preparação do arroz (lavagem e cocção).

No entanto, as vitaminas constituem o grupo de micronutrientes mais sensível a perdas durante a preparação dos alimentos, especialmente durante a etapa de cocção (TORRES, 2009). Além disso, o tratamento térmico é um importante fator de degradação das vitaminas, podendo variar com o tipo de matriz alimentar, o método e o tempo de cocção empregado (LEŠKOVÁ *et al.*, 2006). Outros fatores como temperatura, presença de oxigênio, luz, umidade e pH podem contribuir para essas perdas (SILVA; LOPES; VALENTE-MESQUITA, 2006). Solubilização e lixiviação dos compostos hidrossolúveis para a água de cocção e consequente degradação térmica são as principais causas de redução do conteúdo nutricional dos alimentos durante a cocção (TORRES, 2009).

Diferentes intensidades nas perdas de vitaminas são observadas quando comparadas diferentes técnicas de cocção, devido à característica termolábil destes nutrientes (TORRES, 2009). A tiamina é uma das vitaminas mais termolábeis, sendo observadas grandes perdas tanto na cocção em ambiente doméstico quanto no processamento industrial (COULTATE, 2009). O ácido fólico, assim como as outras vitaminas hidrossolúveis e minerais, está sujeito à lixiviação pela água de cozimento, além da degradação térmica, sendo o primeiro fator responsável pela maior porcentagem (20 a 75%) de perda desta vitamina, em alimentos submetidos ao processo de cocção em água (LIMA; CATHARINO; GODOY, 2003)

Assim, acredita-se que o conteúdo dessas vitaminas após cocção do UR[®] pode ser reduzido significativamente, interferindo no aporte nutricional desejado para as populações.

Em virtude da escassez de dados na literatura acerca do assunto, e dada à relevância destas informações para utilização de UR[®] em programas de alimentação e nutrição que têm como previsão o uso de alimentos fortificados para a prevenção das deficiências de micronutrientes, o presente estudo avaliou o conteúdo e a estabilidade de tiamina e ácido fólico em preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido, utilizando diferentes técnicas de cocção em escala laboratorial e em Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e outros materiais

Para análise de tiamina e ácido fólico foram utilizados os seguintes reagentes grau HPLC: sal sódico do ácido hexano sulfônico (Sigma-Aldrich, Alemanha); sal sódico do ácido heptano sulfônico (Sigma – Aldrich, Alemanha); ácido acético glacial (Tedia, Brasil); água ultrapura produzida em sistema Milli-Q[®] (Millipore, EUA); metanol (Tedia, Brasil) e trietilamina (Tedia, Brasil). Utilizou-se ainda hidróxido de potássio (Vetec, Brasil) e fosfato de sódio monobásico anidro (Synth, Brasil) com grau de pureza analítico. Os padrões vitamínicos (mononitrato de tiamina e ácido fólico) foram obtidos da Sigma-Aldrich, Alemanha, e Isofar, Brasil, respectivamente.

Para a filtração das amostras utilizou-se papel de filtro n^o JP41 J. (Prolab, Brasil), seringas descartáveis esterilizadas de 3 mL (TKL, China), unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 µm de porosidade (Millipore, Brasil).

2.2. Equipamentos

Para o preparo das amostras para análise de tiamina e ácido fólico foram utilizados: processador doméstico de alimentos (Faet Multipratic, MC5), Moinho analítico (Quimis, Q298A), microtritador (Marconi, MA 102), balança semi-analítica (Gehaka, BG 2000), balança analítica digital (Gehaka, AG 200), balança semi analítica digital (Trentin, BT - 001), pHmetro (Hexis, UB10), bomba de vácuo (Tecnal, TE-058), centrífuga (Excelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 mL, Fanem, 206-R), agitador magnético (Marconi, MAO 89), espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60S), sistema de filtração para fase móvel (All Glass), sistema de ultrapurificação de água (Millipore, Direct Q UV 3) e degaseificador ultrassônico (Odontobrás, T-14).

Para análise de tiamina e ácido fólico foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, SCL 10AT VP) composto de bomba de alta pressão (LC-10AT VP), injetor automático com alça de amostragem de 500 µL (SIL-10AF) e detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M10A).

2.3. Matéria-Prima

Utilizou-se um tipo de arroz fortificado com ferro, zinco, tiamina e ácido fólico, produzido por uma indústria de massas alimentícias (Indaiatuba, São Paulo, Brasil), após autorização pelo *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH), e uma marca de arroz polido tipo 1, classe longo fino, obtida em comércio local (Viçosa, MG, Brasil).

2.4. Técnicas de cocção

Foram utilizadas três técnicas de cocção em escala laboratorial (a) refogado em óleo seguido de cocção em água; b) cozido em água; c) cozido em água no forno de micro-ondas) e uma UAN (cozido em água).

Para as técnicas de cocção em escala laboratorial a quantidade preparada visou atender uma família de quatro pessoas, enquanto que em UAN, previu-se o atendimento de aproximadamente 666 pessoas, de um total de 4000 refeições servidas no almoço diariamente.

Nas técnicas de cocção em nível laboratorial, a mistura do UR[®] ao arroz polido, na proporção de 1:100, foi realizada pesando-se em balança analítica digital 2 g de UR[®] e em balança semi analítica digital 198 g de arroz polido (não lavado). Posteriormente, a mistura foi realizada manualmente em recipiente de vidro. Para a técnica de cocção em Unidade de Alimentação e Nutrição foram pesados em balança semi-analítica digital 0,6 kg de UR[®] e 59,4 kg de arroz polido (previamente lavado em água corrente). A mistura dos grãos foi realizada após adição no panelão americano.

2.4.1. Cocção em escala laboratorial

Para a preparação cozida em água, adicionou-se água (600 mL) em uma panela de alumínio fundido (capacidade de 1 L), juntamente com óleo de soja (20 mL) e sal (5 g). A água foi aquecida até ebulição, e logo em seguida, a mistura UR[®] e arroz polido (200g) foi acrescentada. O cozimento foi feito em fogo baixo, com a panela semi-tampada por aproximadamente 12 minutos. Após evaporação da água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz foi homogeneizado e pesado.

Para a preparação refogada em óleo e cozida em água, adicionou-se óleo de soja (20 mL) em uma panela de alumínio fundido (capacidade de 1 L) que foi levada ao fogo. A mistura UR[®] e arroz polido (200 g) foi acrescentada

juntamente com o sal (5 g) e refogada por aproximadamente 3 minutos, sendo em seguida acrescentada água previamente aquecida até ebulição (600 mL). O cozimento foi feito em fogo baixo, com a panela semi-tampada, por aproximadamente 15 minutos. Após evaporação da água de cocção, a chama do gás foi desligada. A panela permaneceu tampada por aproximadamente 10 minutos. Após este período, o arroz foi homogeneizado e pesado.

A preparação cozida em forno de micro-ondas foi realizada em recipiente de vidro apropriado, onde foi acrescentada a mistura UR[®] e arroz polido (200 g), sal (5 g), óleo de soja (20 mL) e água (400 mL). A mistura foi levada ao forno de micro-ondas com o recipiente semi-tampado em potência alta (100%) por 8 minutos. Após este período, o recipiente permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos e, logo em seguida, o arroz foi homogeneizado e pesado.

2.4.2. Cocção em UAN

Acrescentou-se água (60 L) em caldeirão americano de 300 L juntamente com o óleo de soja (5 L) e o sal (2 Kg). Após aquecimento e ebulição da água, a mistura UR[®] e arroz polido (60 kg) foi adicionada. O cozimento foi feito com o panelão tampado, em vapor médio (800 a 1000 Kg/cm²) por 40 minutos. Após este período, o vapor foi desligado, e o panelão permaneceu tampado por aproximadamente 10 minutos. Logo em seguida, o arroz foi homogeneizado e pesado.

2.5. Análise de tiamina e ácido fólico

Os métodos para extração e análise de tiamina e ácido fólico no UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção foram otimizados no Laboratório de Análise de Vitaminas (LAV) do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As análises foram realizadas em cinco repetições para extração e a injeção de cada extrato foi feita em duplicata.

Durante as etapas de extração e análise, as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo *blackout*, e sob proteção do oxigênio, através da utilização de vidrarias com tampas.

Antes da pesagem para extração das vitaminas, os grãos de UR[®] adicionados ao arroz polido antes da cocção foram triturados em moinho

microanalítico, e após cocção, homogeneizado em processador doméstico de alimentos. As análises de tiamina e ácido fólico em cada amostra foi realizada em duplicata.

2.5.1. Extração e análise de tiamina

Para extração de tiamina, pesou-se cerca de 2g de UR[®] adicionado ao arroz polido em balança analítica digital e acrescentou-se 22 mL de solução extratora, com base em Anyacora *et al* (2008), composta por solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%). O pH desta solução foi ajustado para 3,5 com KOH (10 M). A amostra foi homogeneizada em microtritador por aproximadamente 3 minutos e, logo em seguida, centrifugada em centrífuga de tubos a 4000 rpm (1789 g) por 12 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido antes da cocção) e 15 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção). O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de bomba de vácuo em funil de büchner utilizando-se papel de filtro. O filtrado foi retomado em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução extratora. O extrato foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4°C ± 1 °C) e logo em seguida analisado.

A análise de tiamina foi conduzida em sistema CLAE (Shimadzu, modelo SCL 10AT VP) composto de bomba de alta pressão (LC-10 ATVP); injetor automático, com *loop* de 500 µL (SIL-10AF) e detector de arranjos de diodos (DAD) (9SPD-M10 AVP). O sistema foi controlado pelo Software “Multi System” modelo Class Vp 6.12.

As condições cromatográficas utilizadas para tiamina basearam-se em procedimento descrito por Anyakora *et al* (2008) e Dong *et al* (1988). A fase móvel foi composta por solução de sal sódico de ácido hexano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (75: 25) adicionada de trietilamina (0,1%), pH 3,5 ajustado com KOH (10 M), coluna RP18 (Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm), equipada com coluna guarda (Phenomenex ODS (RP18)_4 mm x 3 mm). A análise foi realizada em modo isocrático com fluxo de 1 mL/minuto e tempo de corrida de 10 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 247 nm.

2.5.2. Extração e análise de ácido fólico

Para extração de ácido fólico, pesou-se cerca de 3 g de UR[®] adicionado ao arroz polido em balança analítica digital e acrescentou-se 22 mL

de solução extratora, conforme Della Lucia *et al* (2011), composta por tampão fosfato (0,1 M), pH ajustado para 6,0 com KOH (10 M). A amostra foi homogeneizada em microtritador por aproximadamente 3 minutos e, logo em seguida, centrifugada em centrífuga de tubos a 4000 rpm (1789 g) por 15 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido antes da cocção) e 18 minutos (UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção). O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de bomba de vácuo em funil de büchner, utilizando-se papel de filtro. O filtrado foi retomado em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução extratora. O extrato foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (4°C ± 1 °C) e logo em seguida analisado.

A análise de ácido fólico foi conduzida em sistema CLAE (Shimadzu, modelo SCL 10AT VP) composto de bomba de alta pressão (LC-10 ATVP); injetor automático, com *loop* de 500 µL (SIL-10AF) e detector de arranjos de diodos (DAD) (9SPD-M10 AVP). O sistema foi controlado pelo *Software Multi System* modelo *Class Vp* 6.12.

As condições cromatográficas utilizadas basearam-se em procedimento descrito por Anyakora *et al* (2008) e Dong *et al* (1988). A fase móvel composta por solução de sal sódico do ácido heptano sulfônico (5 mM) e ácido acético glacial (1%): metanol (80: 20), adicionada de trietilamina (0,1%), pH 5,0 ajustado com KOH 10 M; coluna RP18 (Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm), equipada com coluna guarda (Phenomenex ODS (RP18)_4 mm x 3 mm). A análise foi realizada em modo isocrático com fluxo de 0,7 mL/minuto e tempo de corrida de 12 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 282 nm.

2.5.3. Curvas analíticas, identificação e quantificação das vitaminas

As soluções estoque (100 µg/mL) dos padrões de tiamina e ácido fólico foram preparadas em HCl 0,1 N e NaOH 0,1 M, respectivamente. A partir destas, foram feitas soluções com concentrações crescentes dos padrões nas respectivas soluções extratoras para cada vitamina (solução de sal sódico do ácido hexano sulfônico 5 mM e ácido acético glacial 1%, pH 3,5, para tiamina e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0, para ácido fólico).

A concentração real dos padrões de tiamina e ácido fólico foi verificada por espectrofotometria e corrigida, utilizando-se as seguintes equações:

Para tiamina: $C (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = \text{ABS} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$, onde C = concentração; ABS = absorvância máxima (lida a 247 nm); $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de

absortividade molar (410, solvente HCl 0,1 N) (SWAN-CHOO; E-SIONG, 1996).

Para ácido fólico: $A = E^{1\%}_{1\text{cm}} \times C \times L$, onde A = absorvância máxima (lida a 282 nm); $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ = coeficiente de absortividade molar (23,8, solvente NaOH 0,1 M) (BALL, 2006); C = concentração molar; L = largura da cubeta (1 cm).

As curvas analíticas para tiamina e ácido fólico foram elaboradas levando-se em consideração a concentração destas vitaminas no UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção. Utilizou-se injeção em duplicata de soluções padrão, sendo que para tiamina foram injetadas três concentrações crescentes de um mesmo volume e três volumes crescentes de uma mesma concentração, na faixa de 0,014 µg/mL a 7, 463 µg/mL e para ácido fólico, cinco concentrações crescentes para um mesmo volume de injeção e dois volumes crescentes de uma mesma concentração, na faixa de 0,00477 µg/mL a 0,95 µg/mL.

A identificação da tiamina e ácido fólico nos extratos foi feita pela comparação dos tempos de retenção obtidos para as amostras e padrões, analisados sob as mesmas condições, e por co-cromatografia.

A quantificação da tiamina e do ácido fólico no UR[®] adicionado ao arroz polido, antes e após cocção, foi feita a partir das curvas analíticas e equações de regressão obtidas (tiamina: $Y = 2381473,1982 X + 122852, 4402$; $R^2 = 0,9998$; ácido fólico: $Y = 4736910,1846X - 8543,3495$; $R^2 = 0,9997$). O cálculo da concentração real foi obtido a partir da diluição realizada.

2.6. Cálculo da estabilidade de tiamina e ácido fólico nas preparações

A estabilidade das vitaminas foi calculada pela porcentagem de retenção de tiamina e ácido fólico nas preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido após as diferentes técnicas de cocção, sendo essa obtida considerando-se as alterações de peso sofridas pela mistura crua após a cocção. Para tanto, utilizou-se a fórmula da retenção verdadeira ou real (% RR) (MURPHY; CRINER; GRAY, 1975), como descrito a seguir:

$$\% \text{ RR} = \frac{\text{Tcoz ou AFcoz (mg/g)} \times \text{Pcoz (g)}}{\text{Tc ou AFc (mg/g)} \times \text{Pc (g)}} \times 100$$

Em que:

Tcoz ou AFcoz = Conteúdo de tiamina ou ácido fólico em mg por grama da preparação cozida

P_{coz} = Peso da preparação cozida

T_c ou A_{Fc} = Conteúdo de tiamina ou ácido fólico em mg por grama da mistura de UR[®] e arroz polido antes da cocção

P_c = Peso da mistura crua (UR[®] e arroz polido)

2.7. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para análise do conteúdo e da estabilidade das vitaminas, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos, representados pelas técnicas de cocção, e cinco repetições para extração de tiamina e ácido fólico, sendo a análise realizada em duplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando-se o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE INC, 2003), licenciado para a UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise qualitativa de tiamina e ácido fólico

Os cromatogramas típicos da análise das vitaminas no UR[®] adicionado ao arroz polido, antes e após cocção, estão ilustrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Nas condições cromatográficas utilizadas, a eluição da tiamina e do ácido fólico ocorreu em aproximadamente 8 e 7,5 minutos, respectivamente. As condições de análise utilizadas permitiram boa resolução dos picos assegurando uma adequada quantificação das vitaminas nas diferentes amostras.

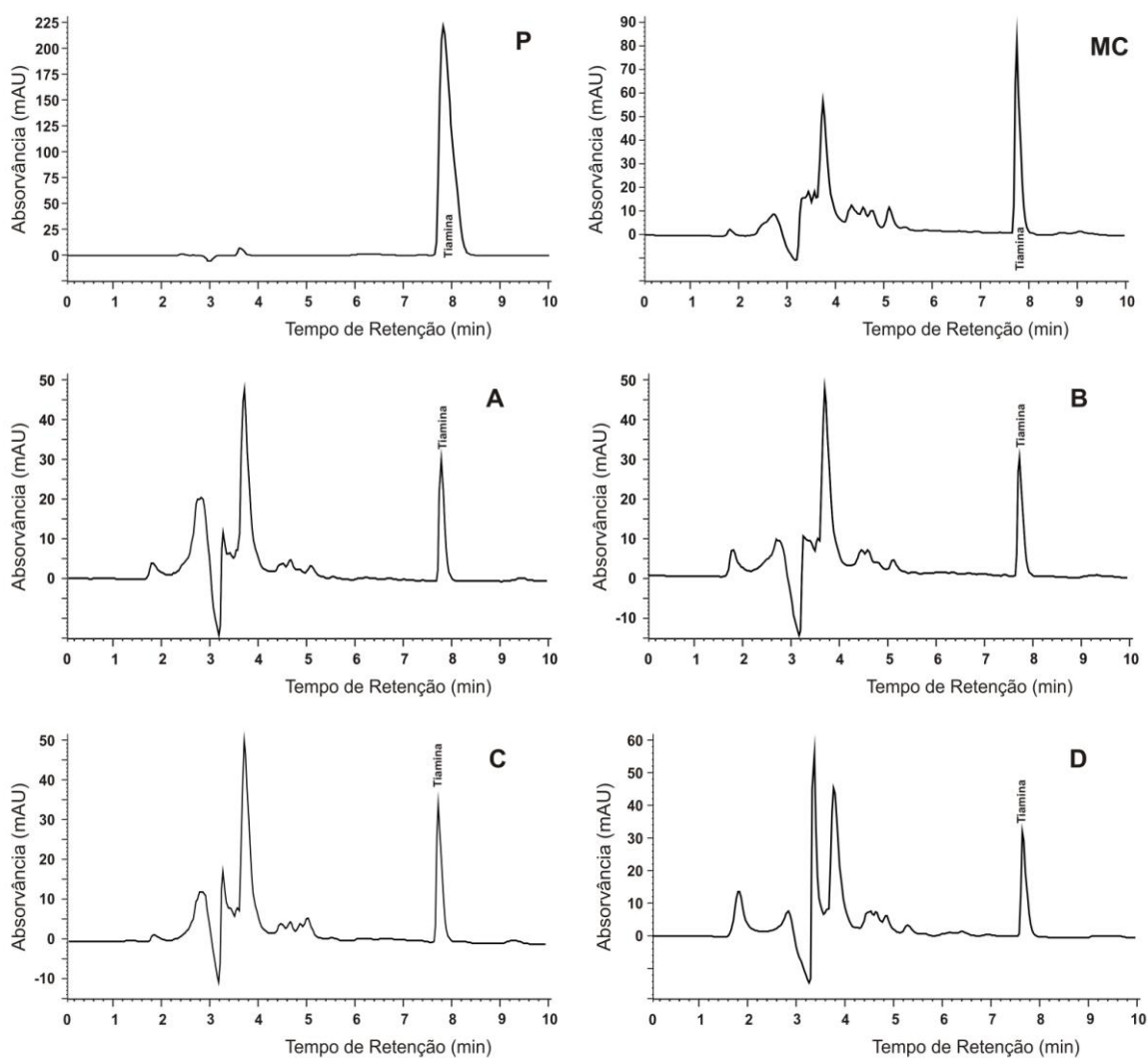


Figura 1. Análise de tiamina por CLAE-DAD. Padrão de mononitrato de tiamina (P); mistura crua de UR[®] e arroz polido (MC); preparações (UR[®] e arroz polido) utilizando diferentes técnicas de cocção: cozido em água (A); refogado em óleo e cozido em água (B); cozido em forno de micro-ondas (C); cozido em Unidade de Alimentação e Nutrição (D). Condições cromatográficas: conforme descrito no item 2.5.1.

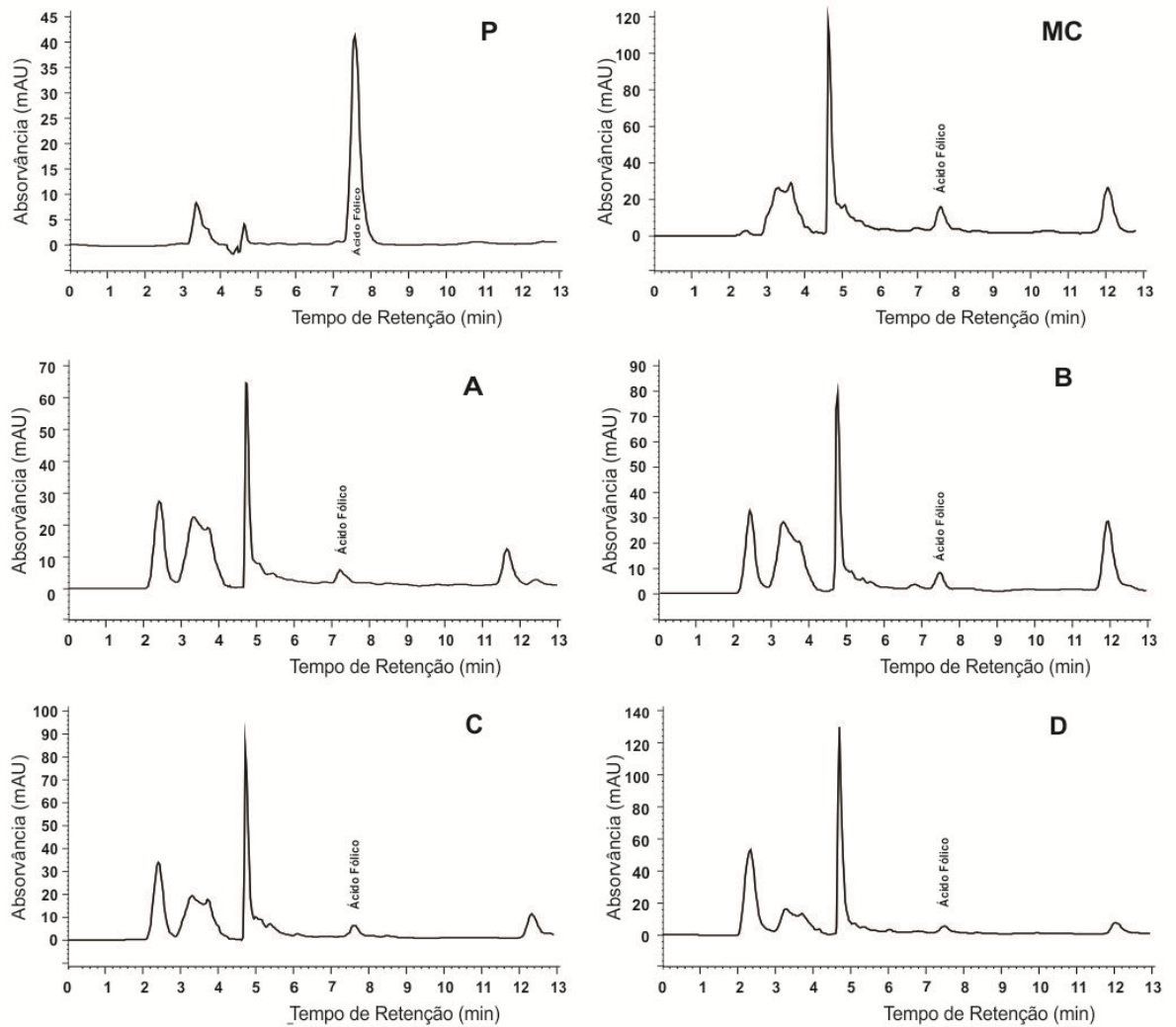


Figura 2. Análise de ácido fólico por CLAE-DAD. Padrão de ácido fólico (P); mistura crua de UR[®] e arroz polido (MC); preparações (UR[®] e arroz polido) utilizando diferentes técnicas de cocção: cozido em água (A); refogado em óleo e cozido em água (B); cozido em forno de micro-ondas (C); cozido em Unidade de Alimentação e Nutrição (D). Condições cromatográficas: conforme descrito no item 2.5.2.

3.2. Conteúdo de tiamina e ácido fólico

Os conteúdos médios de tiamina e ácido fólico no UR[®] adicionado ao arroz polido, antes e após diferentes técnicas de cocção, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Conteúdo médio (mg/100g) de tiamina e ácido fólico no UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após diferentes técnicas de cocção (dados em matéria fresca).

Mistura crua/Técnica de cocção	Tiamina (Média ± DP)	Ácido Fólico (Média ± DP)
Mistura crua UR [®] e arroz polido	1,49 ± 0,38	0,245 ± 0,010
Cozido em forno de micro-ondas	0,36 ± 0,01 ^a	0,077 ± 0,003 ^a
Cozido em água	0,26 ± 0,02 ^c	0,070 ± 0,003 ^a
Refogado em óleo seguido de cocção em água	0,25 ± 0,01 ^c	0,081 ± 0,007 ^a
Cozido em UAN	0,31 ± 0,02 ^b	0,074 ± 0,011 ^a

Médias de tiamina ou ácido fólico, no arroz cozido, seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

UAN: Unidade de Alimentação e Nutrição

O conteúdo de tiamina foi estatisticamente superior na preparação cozida em forno de micro-ondas (0,36 mg/100 g), seguido da preparação cozida em UAN (0,31 mg/100 g). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os conteúdos de tiamina nas preparações refogada em óleo seguida de cocção em água e cozida em água (média de 0,25 mg/100g). Estudos utilizando outros tipos de arroz fortificado e cocção em água encontraram conteúdo superior de tiamina (0,35 mg/100g) (PORASUPHATANA *et al.*, 2008) e inferior (0,19 mg/100g) (CARVALHO *et al.*, 2004) ao encontrado no presente estudo.

Já para o ácido fólico avaliado no presente estudo, houve uma variação de conteúdo nas preparações (0,074 a 0,081 mg/100g), sem diferença significativa entre as técnicas ($p = 0,1821$). Teores inferiores (0,057 mg e 0,010 mg/100g) foram encontrados por Porasuphatana *et al* (2008) e Carvalho *et al* (2004), respectivamente em outros tipos de arroz fortificado, utilizando cocção em água.

3.3. Estabilidade das vitaminas após diferentes técnicas de cocção

Os percentuais de retenção para tiamina e ácido fólico obtidos nas diferentes preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção, a partir da fórmula de retenção verdadeira ou real, estão apresentados na Tabela 2.

Observou-se uma retenção bem mais elevada de ácido fólico (entre 75,69 a 96,11%) quando comparadas àquelas obtidas para tiamina (entre 49,66 a 65,41%), sugerindo uma maior sensibilidade da tiamina às condições

utilizadas para as preparações de arroz. Assim, mesmo que a tecnologia UR[®] vise à redução de perdas destas vitaminas adicionadas aos grãos após a cocção (PATH, 1999), não houve uma alta estabilidade de tiamina após as técnicas de cocção utilizadas no presente estudo.

A alta estabilidade do ácido fólico após as diferentes técnicas de cocção sugere que as condições utilizadas para preparação contribuíram para a preservação dessa vitamina. Além disso, a tecnologia UR[®] pode ter contribuído de forma importante para a proteção do ácido fólico no interior dos grãos fortificados durante a etapa de preparação.

O percentual de retenção para tiamina foi maior quando se utilizou a cocção em forno de micro-ondas (65,4%). Para as outras técnicas de cocção, (refogado em óleo seguido de cocção em água, cozido em água, e em UAN), houve uma maior redução da tiamina, sendo os percentuais de retenção estatisticamente iguais entre si (média de 52,1%).

Tabela 2. Porcentagem média de retenção de tiamina e ácido fólico nas preparações de UR[®] e arroz polido, utilizando diferentes técnicas de cocção.

Técnica de cocção	Retenção de tiamina (%)	Retenção de ácido fólico (%)
Cozido em forno de micro-ondas	65,41 ^a	83,63 ^b
Cozido em água	52,68 ^b	84,21 ^b
Refogado em óleo seguido de cocção em água	49,66 ^b	96,11 ^a
Cozido em UAN	54,03 ^b	75,69 ^b

Médias dos percentuais de retenção de tiamina ou ácido fólico seguidos por uma mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

UAN: Unidade de Alimentação e Nutrição

A maior retenção de tiamina em forno de micro-ondas pode estar relacionada ao menor tempo de cocção (8 minutos) em relação às outras técnicas utilizadas (13 minutos para cozido em água, 15 minutos para refogado em óleo seguido de cocção em água e 40 minutos para cozido em UAN).

Segundo Silva *et al* (2006), a cocção em micro-ondas permite um aquecimento mais uniforme e mais rápido do alimento, quando comparado ao cozimento convencional, no qual a condução do calor se processa de maneira mais lenta.

Em estudo realizado por Kaushik *et al* (2012) foi observado maior retenção de vitaminas do complexo B (niacina, piridoxina e riboflavina) após cocção em forno de micro-ondas, em comparação à cocção em água com e sem pressão. Os autores associaram uma maior intensidade de lixiviação destas vitaminas para a água cocção e conseqüentemente maior degradação térmica nas técnicas de cozimento em água com e sem pressão, quando comparadas ao cozimento em forno de micro-ondas.

No presente estudo, a maior retenção para ácido fólico foi obtida com a preparação refogada em óleo seguida de cocção em água (96,1%), enquanto que para as outras técnicas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na retenção desta vitamina. Menor intensidade de lixiviação do ácido fólico, proporcionada pelo refogamento da mistura em óleo, pode ter sido o fator responsável pela maior retenção desta vitamina (LEŠKOVÁ *et al.*, 2006).

Os resultados encontrados no atual estudo demonstraram uma maior retenção de ácido fólico na preparação refogada em óleo seguida de cocção em água em relação à preparação cozida em água. O maior tempo gasto na técnica de cocção do arroz refogado em óleo seguida de cocção em água (15 minutos) em relação ao arroz cozido em água (12 minutos) não proporcionou uma maior degradação desta vitamina. Este resultado reforça o efeito do óleo na redução da intensidade de lixiviação desta vitamina para a água de cocção, como citado por Lesková *et al* (2006).

De forma semelhante, Crepaldi (2006) também encontrou percentual de retenção de ácido fólico maior em arroz refogado em óleo seguido de cocção em água (84%) em relação ao arroz cozido em água (74%), sendo os tempos gastos na cocção de 15 minutos e 10 minutos, respectivamente.

Tiamina e ácido fólico são vitaminas termolábeis e hidrossolúveis, estando, portanto, sujeitas à lixiviação pela água de cocção e conseqüente degradação térmica (TORRES, 2009). Segundo Lesková *et al* (2006), métodos que minimizam a intensidade de lixiviação, o tempo de cocção e o contato direto do alimento com a água de cocção, como cozimento sob

pressão, em forno de micro-ondas e o refogamento em óleo, podem ter um importante efeito protetor na degradação térmica destas vitaminas. No presente estudo, o menor tempo de cocção utilizado na preparação em forno de micro-ondas (para tiamina), e refogamento em óleo de soja antes da cocção em água (para o ácido fólico), podem ter sido fatores preponderantes para maior retenção destas vitaminas.

Alguns trabalhos relataram percentuais de retenção de 28% a 69% para tiamina e de 96% a 99% para ácido fólico em massas após o cozimento (ABDEL-RAHMAN, 1982; DEXTER; MATSUO; MORGAN, 1982; BERGLUND; DICK; DREHER, 1987; VANDRASEK; WARTHESEN, 1987; WATANABE; CIACCO, 1990; CARVALHO; SILVA; PARRA, 1997; BUI; SMALL, 2007; HAU FUNG CHEUNG *et al.*, 2008; HAU FUNG CHEUNG *et al.*, 2009; ÖHRVIK *et al.*, 2010). Em pães, 74% a 88% de retenção foi obtida para ácido fólico (GUJSKA; MAJEWSKA, 2005; OMAR *et al.*, 2009; ÖHRVIK *et al.*, 2010). Embora a matriz alimentar avaliada nestes estudos seja diferente da analisada no presente estudo, a maior parte dos percentuais de retenção encontrados foi similar ao nosso estudo, além de evidenciar a maior sensibilidade da tiamina (perdas de 35 a 50%) em relação ao ácido fólico (perdas de 4 a 25%) durante os processos de cocção.

Alguns estudos avaliaram a estabilidade de tiamina e de ácido fólico após cocção de outros tipos de arroz fortificado. Kristi *et al* (2011) encontraram percentuais de retenção de 76,7% e 89,9% para tiamina em arroz fortificado por dois métodos (pulverização e imersão), e cozido em água. O processo de fortificação empregado pode ter sido o fator responsável pelos altos percentuais de retenção encontrados quando comparado ao encontrado no presente estudo, no cozimento em água (52,6%), já que o tempo gasto na cocção foi o mesmo em ambos os estudos (12 minutos).

Percentuais de retenção de 7 a 39% e perdas de até 100% para o ácido fólico foram encontrados em arroz fortificado cozido em água por Shrestha *et al* (2003). Os baixos percentuais de retenção em relação aos encontrados no presente trabalho podem ter sido influenciados pela quantidade de água (4 vezes a quantidade de arroz) utilizada na cocção, tempo de cocção (30 minutos), levando a perdas da vitamina por destruição e lixiviação.

Outro estudo encontrou altos percentuais de retenção para tiamina (75%) e ácido fólico (92%) em arroz fortificado cozido em água (PORASUPHATANA *et al.*, 2008). Ressalta-se que o tempo de cocção foi muito curto (5 minutos), quando comparado ao tempo gasto no cozimento do arroz em água no presente estudo (12 minutos). Este fator pode explicar o menor percentual de retenção de tiamina (52,6%) e ácido fólico (84,2%) encontrado no atual estudo, em relação aos encontrados no estudo anterior. Estes resultados mostram a influência do tempo de cocção na retenção de tiamina e do ácido fólico, além do tipo de fortificação empregado.

3.4. Contribuição das preparações com UR[®] para o suprimento das recomendações diárias de vitaminas

Diferentes intensidades de perdas de tiamina e ácido fólico foram observadas no UR[®] adicionado ao arroz polido, de acordo com a técnica de cocção empregada. Dessa forma, verificou-se variação no conteúdo final dessas vitaminas e, conseqüentemente, diferenças na contribuição das preparações contendo UR[®] para o suprimento da Ingestão Diária recomendada (IDR) de tiamina e ácido fólico na alimentação de diferentes grupos etários.

O percentual de contribuição das preparações com UR[®] para o suprimento das recomendações diárias de tiamina (Tabela 3) e ácido fólico (Tabela 4), para diferentes grupos variou de acordo com a técnica de cocção empregada.

Considerando-se as técnicas de cocção que apresentaram a maior retenção para tiamina (cozimento em forno de micro-ondas) e ácido fólico (refogado em óleo seguido de cocção em água), bem como o consumo de uma porção da preparação (crianças de 2 a 8 anos: 62 g = 2 colheres de sopa; adolescentes e adultos: 125 g = 4 colheres de sopa), o UR[®] adicionado ao arroz polido cozido em forno de micro-ondas pode contribuir com 37,5 a 64,2% das recomendações diárias de tiamina e 31 a 50,5% das recomendações de ácido fólico, enquanto que a preparação refogada em óleo seguida de cocção em água pode contribuir com 26 a 34,7% das recomendações de tiamina e 32,5 a 69,8% das recomendações diárias de ácido fólico. A preparação cozida em UAN pode contribuir com 32,2 a 55,3% das recomendações diárias de tiamina e com 29,7 a 63,8% de ácido fólico.

Tabela 3. Contribuição das preparações com UR[®] para o suprimento das recomendações diárias de tiamina de acordo com a porção recomendada*.

	% de adequação de Tiamina (segundo a EAR)**			
	Crianças 4 a 8 anos	Mulheres ≥ 14 anos	Gestantes	Homens ≥ 14 anos
Técnica de cocção				
Cozido em forno de micro-ondas	44,6	50	37,5	45
Refogado em óleo seguido de cocção em água	31	34,7	26	31,2
Cozido em água	32,2	36,1	27	32,5
Cozido em Unidade de Alimentação e Nutrição	38,4	43	32,2	38,7

Fonte: (U.S INSTITUTE OF MEDICINE, (2000)

**EAR – Estimated Average Requirement ou Necessidade Média Estimada

*1 porção: crianças (2 a 8 anos: 62 g (PHILIPPI; CRUZ ;COLUCCI, 2003); mulheres e homens ≥ 9 anos: 125 g (PHILIPPI *et al.*, 1999).

Tabela 4. Contribuição das preparações com UR[®] para o suprimento das recomendações diárias de ácido fólico de acordo com a porção recomendada*.

	% de adequação de Ácido fólico (segundo a EAR)**			
	Crianças 4 a 8 anos	Mulheres ≥ 19 anos	Gestantes	Homens ≥ 19 anos
Técnica de cocção				
Cozido em forno de micro-ondas	50,1	50,5	31	50,5
Refogado em óleo seguido de cocção em água	52,3	52,8	32,5	52,8
Cozido em água	45,7	46	28,3	46
Cozido em Unidade de Alimentação e Nutrição	47,8	48,2	29,7	48,2

Fonte: (U.S INSTITUTE OF MEDICINE, (2000)

*EAR – Estimated Average Requirement ou Necessidade Média Estimada

**1 porção: crianças (2 a 8 anos: 62 g (PHILIPPI; CRUZ ;COLUCCI, 2003); mulheres e homens ≥ 9 anos: 125 g (PHILIPPI *et al.*, 1999).

A fortificação de alimentos tem como objetivo atender no mínimo 30% da *Dietary Reference Intake* (DRI) de referência para alimentos sólidos (Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) (BRASIL, 1998).

Pela análise das Tabelas 3 e 4, verificou-se que uma porção do UR[®] adicionado ao arroz polido após cocção em forno de micro-ondas e em UAN, na proporção de 1:100 podem contribuir com 32,2 a 50% da IDR de tiamina para todos os grupos etários, enquanto que para o ácido fólico a preparação refogada em óleo seguida de cocção em água e a cozida no forno de micro-ondas podem contribuir com 31 a 52,8% da IDR desta vitamina para os diferentes grupos etários.

Entretanto, para o grupo das gestantes, devido à necessidade aumentada destas vitaminas, uma porção das preparações refogada em óleo seguida de cocção em água e a cozida em água não podem atender ao mínimo 30% da IDR de tiamina (contribuição de 26 e 27%, respectivamente) e a preparação cozida em água e em UAN podem atender um pouco menos que o mínimo da IDR de o ácido fólico (28,3 e 29,7% da IDR, respectivamente).

Ressalta-se que a tecnologia UR[®] permite o enriquecimento do arroz convencional em diversos níveis (1:50 a 1:200) e que, tanto para o grupo das gestantes quanto para outros grupos, de acordo com as necessidades nutricionais, estado fisiológico, sexo, faixa etária e porção ingerida, uma proporção superior de UR[®] em relação ao arroz polido, por exemplo (1:50), pode ser utilizada objetivando contribuir com um aporte maior destas vitaminas. Além disso, o consumo de mais de uma porção pode possibilitar o atendimento de uma maior porcentagem da IDR.

Segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), o consumo diário *per capita* de arroz no Brasil foi de 160,3 g para ambos os sexos e faixa etária ≥ 10 anos (IBGE, 2012). Considerando-se esta quantidade de arroz consumida e a proporção UR[®] e arroz polido utilizada no presente estudo, as diferentes preparações poderiam contribuir em ambos os sexos e faixa etária ≥ 10 anos, inclusive no grupo das gestantes, com o aporte mínimo de 30% da IDR de tiamina e ácido fólico.

4. CONCLUSÃO

O ácido fólico apresentou excelente estabilidade nas preparações contendo UR[®] e arroz polido. A preparação refogada em óleo de soja seguida de cocção em água e a cozida em forno de micro-ondas se destacaram apresentando maior estabilidade das vitaminas pesquisadas.

As preparações contendo UR[®] e arroz polido apresentaram bom conteúdo de ácido fólico e tiamina, sendo que uma porção pode contribuir de forma importante para o atendimento das recomendações diárias das vitaminas.

Os dados obtidos são úteis para orientação quanto à melhor técnica de cocção a ser empregada, além de serem imprescindíveis no cálculo da contribuição diária de tiamina e ácido fólico fornecida pelo arroz contendo UR[®] na alimentação de populações que apresentam deficiências destes micronutrientes.

5. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, A. H. Y. Effect of cooking time on the quality, minerals and vitamins of spaghetti produced from two Italian durum wheat varieties. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 17, n. 3, p. 349-353, 1982.

ALLEN, L.; DE BENOIST, B.; DARY, O., HURRELL, R. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva, Switzerland: World Health Organization and Food and Agricultural Organisation of the United Nations., 2006.

ANYAKORA, C.; AFOLAMI, I.; EHIANETA, T., ONWUMERE, F. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 2, n. 2, p. 29-36, 2008.

BALL, G. F. M. Folate. In: BALL, G. F. M. (Ed.). *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*. Boca Raton: CRC, 2006. p. 651.

BATISTA FILHO, M. O controle das anemias no Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 4, p. 121-123, 2004.

BERGLUND, P. T.; DICK, J. W., DREHER, M. L. Effect of Form of Enrichment and Iron on Thiamin, Riboflavin and Niacinamide, and Cooking Parameters of Enriched Spaghetti. *Journal of Food Science*, v. 52, n. 5, p. 1367-1371, 1987.

BRASIL. *Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais*. 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/31_98.htm>. Acesso em: 12 de maio de 2012.

BUI, L. T. T., SMALL, D. M. The influence of formulation and processing on stability of thiamin in three styles of Asian noodles. *Food Chemistry*, v. 102, n. 4, p. 1394-1399, 2007.

CARVALHO, P. R. N.; DA SILVA, M. G.; MANTOVANI, D. M. B.,MORGANO, M. *Enriquecimento de arroz polido. Relatório de assistência tecnológica.* Campinas: ITAL, 2004.

CARVALHO, P. R. N.; SILVA, M. G.,PARRA, E. B. Efeito da cocção sobre os teores de tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina e ferro em macarrão enriquecido tipo espaguete. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1/2, p. 57-60, 1997.

COULTATE, T. P. *Food chemistry of its components*. 5. ed., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. 500 p.

CREPALDI, P. F. *Desenvolvimento e validação de metodologia por clae para o estudo da estabilidade do ácido fólico em arrozes enriquecidos*. (2006). 132 f. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

DELLA LUCIA, C. M.; SILVA, E. R. D.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.,BRANDÃO, S. C. C. Otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Química Nova*, v. 34, p. 335-340, 2011.

DEXTER, J. E.; MATSUO, R. R.,MORGAN, B. C. Effects of processing conditions and cooking time on riboflavin, thiamine, and niacin levels in enriched spaghetti. *Cereal chemistry*., v. 59, n. 5, p. 328-332, 1982.

DONG, M. W.; LEPORE, J.,TARUMOTO, T. Factors affecting the ion pair chromatography of water soluble vitamins. *Journal of Chromatography*, v. 442, p. 81-95, 1988.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical databases*. 2012.Disponível em:<<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 18 de Abril.

GUJSKA, E.,MAJEWSKA, K. Effect of Baking Process on Added Folic Acid and Endogenous Foliates Stability in Wheat and Rye Breads. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, v. 60, n. 2, p. 37-42, 2005.

HAU FUNG CHEUNG, R.; HUGHES, J. G.; MARRIOTT, P. J.,SMALL, D. M. Investigation of folic acid stability in fortified instant Asian noodles by use of capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, v. 112, n. 2, p. 507-514, 2009.

HAU FUNG CHEUNG, R.; MORRISON, P. D.; SMALL, D. M.,MARRIOTT, P. J. Investigation of folic acid stability in fortified instant noodles by use of capillary electrophoresis and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1213, n. 1, p. 93-99, 2008.

IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*., 2012.Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/default.shtm>. Acesso em: 25 de Agosto.

- KAUSHIK, G.; NAIK, S.,SATYA, S. Effect of domestic processing on nutrients and pesticide residues in chickpea. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 5, n. 1, p. 21-30, 2012.
- KYRITSI, A.; TZIA, C.,KARATHANOS, V. T. Vitamin fortified rice grain using spraying and soaking methods. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, n. 1, p. 312-320, 2011.
- LEE, J.; HAMER, M. L.,EITENMILLER, R. R. Stability of Retinyl Palmitate During Cooking and Storage in Rice Fortified with Ultra Rice™ Fortification Technology. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 5, p. 915-919, 2000.
- LEŠKOVÁ, E.; KUBÍKOVÁ, J.; KOVÁČIKOVÁ, E.; KOŠICKÁ, M.; PORUBSKÁ, J.,HOLČÍKOVÁ, K. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, n. 4, p. 252-276, 2006.
- LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.,GODOY, H. T. Folatos em vegetais: importância, efeito do Processamento e biodisponibilidade. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 14, n. 1, p. 123-129, 2003.
- MARCHI, R. P.; SZARFARC, S. C.,RODRIGUES, J. E. F. G. Consumo de arroz fortificado com ferro na profilaxia da deficiência do mineral. *Revista Nutrire*, v. 28, p. 53-64, 2004.
- MURPHY, E. W.; CRINER, P. E.,GRAY, B. C. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 23, n. 6, p. 1153-1157, 1975.
- ÖHRVIK, V.; ÖHRVIK, H.; TALLKVIST, J.,WITTHÖFT, C. Foliates in bread: retention during bread-making and in vitro bioaccessibility. *European Journal of Nutrition*, v. 49, n. 6, p. 365-372, 2010.
- OMAR, R. M.; ISMAIL, H. M.; EL-LATEEF, B. M. A.; YOUSEF, M. I.; GOMAA, N. F.,SHETA, M. Effect of processing on folic acid fortified Baladi bread and its possible effect on the prevention of colon cancer. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 7, p. 1626-1635, 2009.
- PATH. Program for Appropriate Technology in Health. Seattle, Wa., Personal communication. 1999.
- PHILIPPI, S. T.; CRUZ, A. T. R.,COLUCCI, A. C. A. Pirâmide alimentar para crianças de 2 a 3 anos. *Revista de Nutrição*, v. 16, p. 5-19, 2003.
- PHILIPPI, S. T.; LATTERZA, A. R.; CRUZ, A. T. R.,RIBEIRO, S. M. R. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha dos alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 1, p. 65-80, 1999.

PORASUPHATANA, S.; CHAVASIT, V.; VASINRAPEE, S.; SUTHUTVORAVUT, U., HURRELL, R. F. Production and Shelf Stability of Multiple-Fortified Quick-Cooking Rice As a Complementary Food. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 7, p. 359-366, 2008.

SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's Guide. Version 9.1* 4. ed., Cary, NC: SAS Institute Inc, 2003. 846 p.

SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J., PATERSON, J. L. Edible coating materials—their properties and use in the fortification of rice with folic acid. *Food Research International*, v. 36, n. 9–10, p. 921-928, 2003.

SILVA, A. P. R., CAMARGOS, C. N. Fortificação de alimentos: instrumento eficaz no combate a anemia ferropriva? *Comunicação em Ciências da Saúde*, v. 17, n. 1, p. 53-61, 2006.

SILVA, P. T. D.; LOPES, M. L. M., VALENTE-MESQUITA, V. L. Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geléia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 678-682, 2006.

SWAN-CHOO, K., E-SIONG, T. Development of a HPLC method for the simultaneous determination of several B-vitamins and ascorbic acid. *Malaysian Journal of Nutrition*, v. 2, p. 49-65, 1996.

TORRES, D. P. M. Produção de refeições e alterações nutricionais nos alimentos. *SPCNA*, v. 15, n. 3, p. 66-70, 2009.

U.S INSTITUTE OF MEDICINE. *Food and Nutrition Board. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for vitamins.*, Washington: National Academy Press, 2000.

VANDRASEK, H. T., WARTHESEN, J. J. Thiamine Partitioning and Retention in Cooked Rice and Pasta Products. *Cereal Chemistry Journal*, v. 64, n. 2, p. 116-120, 1987.

WATANABE, E., CIACCO, C. F. Influence of processing and cooking on the retention of thiamine, riboflavin and niacin in spaghetti. *Food Chemistry*, v. 36, n. 3, p. 223-231, 1990.

ZANCUL, M. S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. *Medicina*, v. 37, p. 45-50, 2004.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os grãos de UR[®] apresentaram qualidade sanitária satisfatória e composição centesimal em termos de lipídios, proteínas e carboidratos similar ao arroz polido, além de altos teores de ferro, zinco, tiamina e ácido fólico.

Todas as preparações de UR[®] adicionado ao arroz polido foram bem aceitas em relação aos atributos avaliados.

As preparações refogada em óleo seguida de cocção em água, cozida em água e cozida em UAN apresentaram melhor aceitação dos atributos sabor, textura e impressão global que a preparação cozida em forno de micro-ondas. As quatro preparações apresentaram aceitação semelhante em relação ao atributo odor.

Os métodos otimizados para análise de tiamina e ácido fólico por CLAE-DAD no UR[®] cru e UR[®] adicionado ao arroz polido antes e após cocção mostraram alta confiabilidade. Foram obtidas excelentes taxas de recuperação, boa repetibilidade, linearidade e sensibilidade demonstrada pelos baixos limites de detecção e quantificação. Além disso, as metodologias realizaram-se em modo isocrático, apresentando tempos curtos de corrida cromatográfica e de retenção das duas vitaminas, refletindo-se positivamente na economia de reagentes e tempos de análise.

O ácido fólico apresentou excelente estabilidade nas preparações contendo UR[®] e arroz polido. A preparação refogada em óleo de soja seguida de cocção em água e a cozida em forno de micro-ondas se destacaram apresentando maior estabilidade das vitaminas pesquisadas.

As preparações contendo UR[®] e arroz polido apresentaram bom conteúdo de ácido fólico e tiamina, sendo que uma porção pode contribuir de forma importante para o atendimento das recomendações diárias das vitaminas.

Os dados obtidos são úteis para orientação quanto à melhor técnica de cocção a ser empregada, além de serem imprescindíveis no cálculo da contribuição diária de tiamina e ácido fólico fornecida pelo arroz contendo UR[®] na alimentação de populações que apresentam deficiências destes micronutrientes.

Os achados demonstraram que o UR[®], quando preparado juntamente com o arroz polido, poder ser indicado como um alimento adequado e seguro para utilização em programas de alimentação e nutrição, especialmente para populações em situação de risco nutricional, e que têm o hábito de consumir arroz na dieta.

ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/______ Sexo: _____

Declaro ter sido informado e concordo com minha participação, como voluntário, da pesquisa denominada “Caracterização nutricional, microbiológica e sensorial de um arroz fortificado (Ultra Rice®) com vitaminas e minerais e estabilidade de ácido fólico e tiamina após diferentes técnicas de cocção”, desenvolvida pelo Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, sob a coordenação da professora Helena Maria Pinheiro Sant’Ana.

Estou ciente de que minha participação nesta pesquisa não traz complicações legais e nenhum dos procedimentos utilizados oferece riscos à minha integridade.

Autorizo os autores do estudo a utilizar as informações obtidas no estudo para elaborar relatórios e artigos para divulgação em encontros e publicações acadêmico-científicas.

Também estou ciente do sigilo das informações que prestarei.

Fui informado de que não terei nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago pela minha participação.

Viçosa, 28 de Março de 2012.

Assinatura do Voluntário

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-1269

Of. Ref. Nº 061/2011/Comitê de Ética

Viçosa, 31 de maio de 2011.

Prezada Professora:

Cientificamos V. S^a. de que o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, em sua 4^a Reunião de 2011, realizada nesta data, analisou e aprovou, sob o aspecto ético, o projeto de pesquisa intitulado *Caracterização nutricional e funcional de um arroz fortificado (Ultra Rice®) e seu impacto no estado nutricional de ferro, zinco, tiamina e folato em pré-escolares.*

Atenciosamente,

Professor Ricardo Junqueira Del Carlo
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Vice-Presidente em exercício

Professora
Helena Maria Pinheiro Sant'Ana
Departamento de Nutrição e Saúde

/rhs.