

## Avaliação da metodologia microbiológica para determinação de 5-metiltetrahidrofolato em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.)

*Evaluation of a microbiological method for the determination of 5-methyltetrahydrofolate in cashew apple juice (Anacardium occidentale L.)*

Soraya de Oliveira SANCHO<sup>1\*</sup>, Geraldo Arraes MAIA<sup>2</sup>, Raimundo Wilane de FIGUEIREDO<sup>2</sup>, Sueli RODRIGUES<sup>2</sup>, Maria Cristiane RABELO<sup>1</sup>

### Resumo

Embora o suco de caju seja bastante consumido no Brasil e muitos estudos sobre seu valor nutricional tenham sido publicados, a literatura não reporta estudos sobre a determinação de folatos nesse suco. Várias técnicas analíticas podem ser utilizadas visando à detecção da referida vitamina. Optou-se por utilizar o ensaio microbiológico oficial de determinação de folatos em alimentos, utilizando-se *Lactobacillus casei* como microrganismo de teste. Foram testados a utilização de ultrassom e tratamento enzimático como fases preparatórias, a fim de determinar qual a melhor metodologia a ser empregada. Foram comparados também o uso de padrões de ácido fólico e folato. Os resultados mostraram que o emprego de enzima é indicado como fase preparatória na determinação desta vitamina em suco de caju. A utilização de ultrassom não interferiu, significativamente, nos resultados encontrados, sendo seu emprego dispensável. Os teores de folato encontrados no suco de caju integral in natura indicam que o consumo de uma porção de 200 mL do suco equivale à ingestão de aproximadamente 500 µg de folato, valor superior à ingestão diária recomendada para adultos.

**Palavras-chave:** suco de caju; folato; tratamento enzimático; ultrassom; *Lactobacillus casei*.

### Abstract

Although cashew apple juice has been highly consumed in Brazil and several studies on its nutritional value have been published, no studies on the determination of folate contents in this juice were found in the literature. Several analytic techniques can be employed for the folate determination in foods. In this study, the microbiological assay using *Lactobacillus casei* was employed. Enzyme treatment and ultrasound waves were tested as pretreatment. The use of standards of folic acid and folate were also evaluated. The results showed that the enzyme treatment cannot be replaced by ultrasound treatment. The consumption of 200 mL of in natura cashew apple juice corresponds to a folate intake of 500 µg, which is higher than the recommended daily intake for adults.

**Keywords:** cashew apple juice; folate; enzyme treatment; ultrasound; *Lactobacillus casei*.

## 1 Introdução

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é um fruto típico do nordeste brasileiro e cada vez mais o seu cultivo e sua importância socioeconômica aumentam. O cultivo do cajueiro é realizado visando principalmente à produção de castanha de caju, sendo o aproveitamento do pseudofruto ainda mínimo em relação à quantidade de matéria-prima disponível. O consumo do pseudofruto fresco ainda é limitado. Entretanto, o suco de caju é amplamente aceito pela população. Estima-se que, do total produzido anualmente na região nordeste, apenas 15% seja aproveitado para a fabricação do suco, que é o segundo suco de frutas mais consumido no Brasil (BROINIZI et al., 2007; LIMA et al., 2007; SANCHO et al., 2007; ALCÂNTARA et al., 2009).

O ácido fólico, também conhecido como ácido pteroilglutâmico, é um composto que se encontra amplamente

distribuído na natureza, estando naturalmente presente em alimentos, geralmente na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, conhecidos como folatos. Folato é o termo genérico para uma família de compostos quimicamente semelhantes que pertencem ao complexo B. Estas combinações estão relacionadas a muitos processos bioquímicos, incluindo o metabolismo de aminoácidos, além de síntese, reparo e metilação de DNA (BARRIOS; GÓMEZ, 1997; MARTÍNEZ et al., 2005; OLIVEIRA, 2006; FACCO et al., 2007; TAM et al., 2009).

O organismo humano depende totalmente da ingestão alimentar diária para suprir sua necessidade. Quantidades apreciáveis desta vitamina podem ser encontradas em vegetais de folhas verdes, gema de ovo, fígado, rins, peixes, cereais integrais, gérmen de trigo, legumes e em algumas frutas como

Recebido para publicação em 28/4/2008

Aceito para publicação em 7/7/2009 (003478)

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará – UFC, Campus do Pici, s/n, CP 12168, CEP 60356-000, Fortaleza – CE, Brasil, E-mail: soraya\_sancho@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará – UFC, Campus do Pici, s/n, CP 12168, CEP 60356-000, Fortaleza – CE, Brasil, E-mail: sueli@ufc.br

\*A quem a correspondência deve ser enviada

maçã, morango, mamão, laranja e caju. Folatos em alimentos são encontrados principalmente nas formas de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) e formiltetrahydrofolato (formil-THF), sendo o 5-MTHF a forma mais abundante em produtos de origem vegetal (BARRIOS; GÓMEZ, 1997; NOGUEIRA; COZZOLINO, 1998; MAYES, 1999; FOOD...; WORLD..., 2000; NASSER et al., 2005; SANCHO, 2006; QUINATO; DEGÁSPARI; VILELA, 2007; TÂMEGA; COSTA, 2007; TAM et al., 2009).

A carência de folatos causa a anemia megaloblástica e aumenta a ocorrência de defeitos no tubo neural, que são defeitos congênitos que se referem ao desenvolvimento incompleto da medula espinhal ou do cérebro. Ensaios clínicos randomizados e outros estudos científicos apontam para a importância do uso periconcepcional desta vitamina na prevenção de doenças do tubo neural, como a espinha bífida e a anencefalia. Deste modo, a Organização Mundial da Saúde recomenda que todas as mulheres em idade reprodutiva aumentem o consumo desta vitamina (DIERKES; KROESEN; PIETRZIK, 1998; GERÊNCIA..., 2004; PACHECO et al., 2006; MEZZOMO et al., 2007).

A análise de vitaminas em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que se encontram, da presença de inúmeros interferentes, da complexidade da matriz e da exigência de cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes (CATHARINO; GODOY; LIMA-PALLONE, 2006).

O conteúdo de folatos em alimentos e tecidos biológicos normalmente é determinado por ensaios microbiológicos que utilizam *Lactobacillus casei* como microrganismo de teste (GOLI; VANDERSLICE, 1992; ASSOCIATION..., 1996; QUIRÓS et al., 2004). Contudo, pode ser utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção em UV e/ou fluorescência, além de CLAE acoplada à espectrometria de massas (PAWLOSKY; FLANAGAN, 2001; THOMAS; FLANAGAN; PAWLOSKY, 2003).

Segundo Andriquetto et al. (2002), a maior parte do ácido fólico encontrado nos alimentos naturais apresenta-se conjugado a duas ou mais moléculas do ácido glutâmico, sendo, nesta forma, inativo. Entretanto, no pâncreas, fígado e rins, existem enzimas capazes de libertar o ácido fólico destes conjugados.

Diversos autores têm reportado o uso de tratamento enzimático para preparação da amostra utilizada para determinação de folatos. De acordo com Stinson, Widmer e Moore (2000), a utilização da enzima gamma-glutamyltranspeptidase (extraída de rins de cavalo), que atua removendo proteínas da porção glutamyl do folato, tem sido recomendada para análise de folatos em suco de frutas.

Como alternativa ao tratamento enzimático, o uso de ultrassom como pré-tratamento para desconjugação de folatos em cogumelos foi reportado como uma metodologia rápida e eficiente para determinação cromatográfica de folatos (FURLANI; GODOY, 2007).

Embora o suco de caju seja bastante consumido no Brasil e muitos estudos sobre seu valor nutricional tenham sido publicados, até a presente data, estudos sobre a determinação de folatos nesse suco não foram encontrados. Desta forma, utilizando-se o ensaio microbiológico oficial de determinação de folatos em alimentos da AOAC (ASSOCIATION..., 1996), o presente estudo teve como objetivo avaliar o referido método na determinação de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) em suco de caju integral.

Também foram testadas fases preparatórias com a utilização de ultrassom e tratamento enzimático, a fim de determinar como estes tratamentos influenciariam ou melhorariam a determinação da vitamina em estudo. Foram comparados também o uso de padrões de ácido fólico e o de 5-MTHF, uma vez que a metodologia reporta o uso de ácido fólico como padrão.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Reagentes utilizados

Ácido tricloroacético, fosfato de potássio dibásico (Vetec), cloreto de sódio P.A. (Vetec), glicerina P.A. (Vetec), padrão de ácido fólico (Fluka), padrão de folato (5-methyltetrahydrofolic acid disodium salt – Biochemika), ácido ascórbico P.A. (Synth), enzima gamma-glutamyltranspeptidase tipo VI (Sigma-Aldrich), meio de cultura *Folic Acid Casei* (Himedia), meio de cultura *Lactobacilli MRS broth* (Difco). Os padrões de folato e a enzima, obtida na forma liofilizada, foram armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; o padrão de ácido fólico e os meios de cultura MRS e *Folic Acid Casei* foram armazenados sob refrigeração a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Equipamentos utilizados

Estufa B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) (Marconi), espectrofotômetro (Spectrum SP-2100), aparelho de ultrassom (Marconi Model USC, 25 kHz, 150 W) com 2,7 L de volume útil (dimensões internas  $14 \times 24 \times 9\text{ cm}$ ), balança analítica (Gehaka), centrífuga (Fanem), autoclave (Phoenix), agitador de tubos (Certomat), mixer (Braun), freezer vertical (Prosdócimo).

### 2.3 Amostra avaliada

A matéria-prima utilizada neste trabalho consistiu de pseudofrutos selecionados de caju (pedúnculos) são e maduros, descartando-se as castanhas (verdadeiro fruto). Os pedúnculos foram triturados em mixer de duas velocidades e o suco polposo obtido foi mantido sob congelamento, à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em freezer, até o início das determinações. O suco de caju in natura foi então submetido a vários tratamentos, sendo os ensaios realizados em triplicata. Vale ressaltar que não foram adicionados aditivos, tendo em vista sua utilização como substrato no método analítico utilizado.

### 2.4 Microrganismo utilizado

Foi utilizada a cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus casei* ATCC 7469, recomendada pela AOAC para determinação microbiológica de vitaminas.

## 2.5 Ativação do microrganismo

A cultura liofilizada de *Lactobacillus casei* foi transferida para um tubo de ensaio contendo 8 mL de caldo MRS, previamente esterilizado à temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Em seguida, foi transferido 1 mL deste tubo para um erlenmeyer contendo 50 mL do caldo MRS e foi incubado à temperatura de 37 °C, em estufa B.O.D., durante 15 horas.

Após este período, foi transferido 1 mL do meio de cultura MRS fermentado para o meio de cultura *Folic Acid Casei*, previamente preparado, contendo a seguinte composição: 4,7 g de meio dissolvido em 100 mL de água destilada contendo 25 mg de ácido ascórbico. Foi adicionado ainda 0,3 µg.L<sup>-1</sup> de uma solução de ácido fólico (para induzir o crescimento do microrganismo), de acordo com os escritos de Wilson e Horne (1982). O meio foi incubado durante 18 horas à temperatura de 37 °C em estufa B.O.D., até atingir um crescimento microbiano satisfatório, que foi atestado com o acompanhamento do pH e da biomassa. Ao final da fermentação, o pH apresentou um valor igual a 5,17 e a biomassa, medida através da absorbância em comprimento de onda de 540 nm (após a diluição da amostra na proporção de 1:10) apresentou um valor igual a 0,191.

## 2.6 Preparação das soluções-padrões de vitaminas

As soluções-padrão de ácido fólico e 5-MTHF foram elaboradas a partir de soluções-estoque, de concentrações iguais a 1 mg.L<sup>-1</sup>. Foram realizadas diluições seriadas até atingirem a concentração final de 0,01 mg.L<sup>-1</sup>.

## 2.7 Preparação de cultura-estoque em glicerol

Para a elaboração das culturas-estoque de *Lactobacillus casei*, foram separados dez tubos de ensaio estéreis com tampa de rosca e, em seguida, foi acrescentado, a cada um deles, 2,5 mL de glicerol (glicerina) estéril e 2,5 mL de meio *Folic Acid Casei* fermentado (descrito no item 2.5). As culturas-estoque foram armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C. O procedimento foi baseado na metodologia descrita por Wilson e Horne (1982).

## 2.8 Preparação do tampão fosfato

Foram preparados 100 mL de uma solução-tampão a partir de fosfato de potássio dibásico (50 mM) acrescido de 0,15 g de ácido ascórbico; 50 mL desta solução teve o pH ajustado para 6,1 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ácido fosfórico) e 50 mL teve o pH ajustado para 8,5 com NaOH (hidróxido de sódio).

## 2.9 Preparação da solução salina

Foram preparados 50 mL de solução de NaCl, de concentração igual a 9 g.L<sup>-1</sup>. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos à temperatura de 121 °C.

## 2.10 Tratamento enzimático

O ensaio foi realizado empregando-se a enzima gammaglutamiltranspeptidase, a fim de verificar sua atuação na desconjugação dos folatos presentes na amostra de suco de caju natural.

Para isto, foram adicionados, em *eppendorf*, 1 mL de tampão fosfato (ajustado em pH igual a 6,1), 100 µL de suco de caju e aproximadamente 4 mg de enzima. A mesma composição foi adicionada em outro *eppendorf*, diferindo apenas no pH do tampão fosfato, sendo este ajustado a 8,5 (a fim de determinar qual a melhor condição para a realização do experimento).

Após este procedimento, os recipientes foram mantidos por 12 horas à temperatura de 25 °C. Após este período procedeu-se à inativação da enzima pelo emprego de calor, segundo metodologia descrita por Rader, Weaver e Angyal (1998).

## 2.11 Metodologia empregada para a determinação de 5-metiltetrahidrofolato

Foi utilizado o ensaio microbiológico oficial de determinação de folatos em alimentos, segundo a AOAC (ASSOCIATION..., 1996), utilizando-se o microrganismo *Lactobacillus casei* como microrganismo de teste.

Inicialmente pesou-se 1 g da amostra de suco de caju e a ela se adicionaram 10 mL de tampão fosfato. Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos e centrifugada durante 10 minutos a 7000 rpm. Foi realizado o ajuste do pH para 6,2, com NaOH (hidróxido de sódio) e o volume foi completado até 20 mL, com tampão fosfato. A amostra foi então diluída (com tampão), através de diluições seriadas, até atingir a diluição de 1:2000, uma vez que o método é linear para amostras contendo folatos na faixa de nanogramas.

Após este procedimento, foi adicionado 1,5 mL da amostra diluída a tubos de ensaio contendo 1,5 mL de meio *Folic Acid Casei* (com pH igual a 6,2), sendo autoclavados em seguida, à temperatura de 121 °C durante 5 minutos.

Em seguida, foi transferido, asepticamente, 1 mL da cultura-estoque de *Lactobacillus casei* para um erlenmeyer contendo 25 mL de solução salina estéril. Após agitação manual, foram transferidos 50 µL desta mistura aos tubos de ensaio (que continham a amostra e o meio de cultura já esterilizados). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Procedeu-se à incubação dos tubos por 18 horas à temperatura de 37 °C, em estufa B.O.D. Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se à leitura da biomassa, através da determinação da absorbância em espectrofotômetro ajustado em comprimento de onda de 540 nm.

## 2.12 Amostras submetidas ao ultrassom e ácido

A metodologia empregada obedeceu às etapas descritas no item anterior, diferindo apenas antes da etapa de agitação e centrifugação, em que o suco foi previamente submetido ao ultrassom por 15 minutos e, em seguida, adicionado de 0,30 mL de ácido tricloroacético 0,5 M, de acordo com os escritos de Furlani e Godoy (2007). A mesma diluição final (1:2000) foi realizada para as amostras previamente submetidas ao ultrassom e ácido.

### 2.13 Amostras submetidas a tratamento enzimático

A metodologia empregada obedeceu às etapas descritas no item 2.11, diferindo apenas antes da etapa de agitação e centrifugação, em que o suco foi previamente submetido ao tratamento enzimático, de acordo com os estudos de Rader, Weaver e Angyal (1998). A mesma diluição final (1:2000) foi realizada para as amostras previamente submetidas ao tratamento enzimático.

### 2.14 Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração foram utilizadas soluções-estoque de ácido fólico e 5-MTHF, previamente preparadas, de concentrações iguais a 0,01 mg.L<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que, mesmo não tendo sido adicionado ácido fólico ao suco, o método oficial da AOAC (ASSOCIATION..., 1996) utiliza curva construída com esta vitamina. O procedimento consistiu em adicionar frações de concentrações conhecidas da solução de ácido fólico e 5-MTHF, em tubos de ensaio contendo 1,5 mL de meio *Folic acid casei* (com pH igual a 6,2), completando-se seu volume para 3 mL com tampão fosfato (pH 6,2). Os tubos foram esterilizados por 5 minutos a 121 °C (conforme indicação do fabricante do meio *Folic acid casei*). Após resfriamento, foram transferidos 50 µL da solução salina contendo o microrganismo *Lactobacillus casei*, segundo o procedimento descrito no item 2.11. Os tubos foram incubados à temperatura de 37 °C, por 18 horas em estufa B.O.D. Sua leitura foi feita em espectrofotômetro, ajustado em comprimento de onda igual a 540 nm. A curva de calibração foi construída através de regressão linear, com o auxílio do software OriginLab versão 7.0 (Microcal Corporation), considerando-se oito pontos experimentais com concentração variando de 0,1 a 1,4 ng de 5-MTHF ou de ácido fólico.

### 2.15 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, considerando intervalo de confiança de 95% de probabilidade. O software OriginLab 7.0 foi utilizado para tratamento dos dados.

## 3 Resultados e discussão

A Tabela 1 sumariza os resultados obtidos para determinação de folatos em suco de caju integral.

**Tabela 1.** Resultados obtidos para determinação de folato em suco de caju integral.

Amostras	Folato (mg.L <sup>-1</sup> )*	Ácido fólico (mg.L <sup>-1</sup> )*
Sem tratamento	0,876 ± 0,125 <sup>a,A</sup>	0,320 ± 0,100 <sup>a,B</sup>
Submetido ao ultrassom	0,852 ± 0,199 <sup>a,A</sup>	0,300 ± 0,160 <sup>a,B</sup>
Submetida a tratamento enzimático a pH 6,1	1,628 ± 0,303 <sup>b,A</sup>	0,926 ± 0,245 <sup>b,c,B</sup>
Submetida a tratamento enzimático a pH 8,5	2,581 ± 0,080 <sup>b,A</sup>	1,695 ± 0,064 <sup>b,c,B</sup>

\*Padrão utilizado na curva de calibração. As diferenças estatísticas, segundo o teste de Tukey, com nível de confiança de 95%, são denotadas por letras minúsculas diferentes na coluna e letras maiúsculas diferentes na linha.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, houve diferença significativa entre os resultados obtidos utilizando-se 5-MTHF e ácido fólico como padrão para o ensaio. Resultados bastante diferentes foram obtidos comparando-se os valores de 5-MTHF obtidos para o suco com estes dois padrões, tanto para suco analisado sem tratamento prévio como para todos os tratamentos estudados neste trabalho. Resultados bastante superiores foram encontrados para as determinações realizadas utilizando-se 5-MTHF como padrão. Estes resultados indicam que, mesmo sendo o ácido fólico mais estável e de menor custo, sendo, portanto, sua utilização como padrão desejável por razões econômicas, sua utilização em determinações microbiológicas de suco de caju, baseadas no crescimento de *Lactobacillus casei*, pode levar a resultados subestimados.

Ao comparar os resultados encontrados para a amostra sem tratamento prévio e submetida ao tratamento de ultrassom, verifica-se que o tratamento da amostra com ultrassom não apresentou influência significativa nos resultados obtidos. Este comportamento foi observado para ambos os padrões utilizados. Dessa forma, a metodologia de ultrassom não é capaz de desconjugar os folatos presentes no suco de caju e torná-los disponíveis ao microrganismo.

Já a atuação da enzima proporcionou a liberação do 5-MTHF, que porventura estava ligado à matriz do alimento. Deste modo, sua utilização é importante a fim de não subestimar a real quantidade de vitamina presente. Além disto, de acordo com a Tabela 1, é possível constatar que, em pH mais elevado (8,5) houve uma maior atuação enzimática sobre a amostra, demonstrando que a enzima utilizada neste trabalho é mais eficiente em pH 8,5 para a liberação do 5-MTHF no suco em estudo.

Não é possível comparar os resultados obtidos neste trabalho com resultados obtidos por outros autores, pois não há, até o momento, trabalhos publicados sobre a determinação de folatos em suco de caju. Entretanto, vale ressaltar que os teores de 5-MTHF encontrados no suco de caju integral in natura (2,581 ± 0,080 mg.L<sup>-1</sup>) indicam que o consumo de uma porção de 200 mL do suco equivale à ingestão de aproximadamente 500 µg de 5-MTHF, valor superior à IDR (ingestão diária recomendada) de folatos para adultos (291 µg) na Europa (BREE et al., 1997). No Brasil, encontramos apenas a IDR para o ácido fólico. De acordo com a RDC nº 269 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a IDR para adultos de ácido fólico é de 240 µg e para gestantes a IDR é de 355 µg (BRASIL, 2005). Deste modo, é necessário realizar a conversão destes valores, baseada nos pesos moleculares das referidas vitaminas (ácido fólico: 441,40 e 5-MTHF: 503,42). Encontramos então que a IDR para adultos de 5-MTHF deve ser igual a 273 µg e para gestantes 404 µg. Em ambos os casos, a quantidade de vitamina encontrada no suco é superior às IDRs recomendadas.

## 4 Conclusões

Os resultados obtidos demonstraram que o microrganismo *Lactobacillus casei* se desenvolveu melhor em meio de cultura contendo 5-MTHF como padrão, não sendo recomendado o

uso de ácido fólico para determinação microbiológica desta vitamina.

O emprego de tratamento enzimático para a preparação da amostra proporcionou resultados mais elevados na determinação de 5-MTHF, sendo, então, indicado como fase preparatória na determinação microbiológica desta vitamina em suco de caju.

A utilização de ultrassom e ácido não interferiu, significativamente, nos resultados encontrados, sendo seu emprego dispensável.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) a concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) o apoio financeiro.

## Referências bibliográficas

- ALCÂNTARA, S. R. et al. Isotermas de adsorção do pedúnculo seco do caju. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 81-87, 2009.
- ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal: bases e fundamentos**. 1 ed. São Paulo: Editora Nobel, 2002. 395 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Methods for the microbiological analysis of selected nutrients**. Washington, 1996. 86 p.
- BARRIOS, M. F.; GÓMEZ, H. G. D. Papel del ácido fólico em la etiología de las anemias megaloblásticas. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 13, n. 2, p. 77-89, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.
- BREE, A. et al. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 643-660, 1997.
- BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.
- CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.; LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para determinação de folato e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 972-976, 2006.
- DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 68, p. 98 – 103, 1998.
- FACCO, E. M. P. et al. Quantificação de 5-metiltetrahidrofolato no processamento e conservação de vinhos de uvas viníferas e híbridas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 874-877, 2007.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Food Standards Programme. Codex Alimentarius. Codex standards for foods for special dietary use including foods for infants and children and related code of hygienic practice**. Rome, 2000.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Contents of folates in edible mushrooms commercialised in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 278 – 280, 2007.
- GERÊNCIA GERAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA – GGLAS. **Avaliação preliminar da capacidade laboratorial na determinação de ácido fólico, ferro total, glúten e ácidos graxos trans em alimentos**. Brasília, 2004. 38 p.
- GOLI, D. M.; VANDERSLICE, J. T. Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate. **Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 57-64, 1992.
- LIMA, E. S. et al. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) industrializado e cajuína. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1143-1146, 2007.
- MARTÍNEZ, A. B. O. et al. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 55, n. 1, p. 5-14, 2005.
- MAYES, P. A. Estrutura e função das vitaminas hidrossolúveis. In: MURRAY, R. K. et al. (Ed.). **Harper: bioquímica**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 582-596.
- MEZZOMO, C. L. S. et al. Prevenção de defeitos do tubo neural: prevalência do uso da suplementação de ácido fólico e fatores associados em gestantes na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 11, p. 2716-2726, 2007.
- NASSER, C. et al. Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 11, n. 4, p. 199-203, 2005.
- NOGUEIRA, N. N.; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos nutricionais do ácido fólico. **Cadernos de Nutrição**, v. 16, p. 41-54, 1998.
- OLIVEIRA, F. C. **Avaliação nutricional e efeito de fubá fortificado na dieta de idosos institucionalizados**. 206 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- PACHECO, S. S. et al. Prevalência dos defeitos de fechamento do tubo neural em recém-nascidos do Centro de Atenção à Mulher do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP: 2000-2004. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, supl. 1, p. s35-s42, 2006.
- PAWLOSKY, R. J.; FLANAGAN, V. P. A Quantitative Stable-Isotope LC-MS Method for the Determination of Folic Acid in Fortified Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1282-1286, 2001.
- QUINATO, E. E.; DEGÁSPARI, C. H.; VILELA, R. M. Aspectos nutricionais e funcionais do morango. **Visão Acadêmica**, v. 8, n. 1, p. 11-17, 2007.
- QUIRÓS, A. R. B. et al. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 135-139, 2004.
- RADER, J. I.; WEAVER, C. M.; ANGYAL, G. Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 451-465, 1998.
- SANCHO, S. O. **Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. 137 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- SANCHO, S. O. et al. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 878-882, 2007.

- STINSON, W. S.; WIDMER, W. W.; MOORE, E. L. Health benefits of folic acid in orange juice. In: INTERNATIONAL FEDERATION OF FRUIT JUICE SYMPOSIUM, 23., 2000, Habana-Cuba. **Annals...** p. 328-339
- TAM, T. T. T. et al. Photodegradation of 5-methyltetrahydrofolate in the presence of uroporphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 94, p. 201-204, 2009.
- TÂMEGA, I. E.; COSTA, C. D. Níveis de ácido fólico sérico em lactentes eutróficos, alimentados com leite materno, leite de vaca ou fórmula modificada. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, n. 2, p. 150-155, 2007.
- THOMAS, P. M.; FLANAGAN, V. P.; PAWLOSKEY, R. J. Determination of 5-Methyltetrahydrofolic Acid and Folic Acid in Citrus Juices Using Stable Isotope Dilution-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1293 – 1296, 2003.
- WILSON, S.; HORNE, D. W. Use of glycerol-protected Lactobacillus casei for microbiological assay of folic acid. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 1198-2000, 1982.