

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

**Validación del método microbiológico en micro placa  
para la determinación de ácido fólico en alimentos  
fortificados**

Trabajo de tesis presentado por  
**Bárbara Elizabeth Juárez Montoya**  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2005



**Validación del método microbiológico en micro placa  
para la determinación de ácido fólico en alimentos  
fortificados**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

**Validación del método microbiológico en micro placa  
para la determinación de ácido fólico en alimentos  
fortificados**

Trabajo de tesis presentado por  
**Bárbara Elizabeth Juárez Montoya**  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2005

Dedico este trabajo de tesis,

- A **Dios**, gracias por todas las bendiciones, por todo lo que soy y todo lo que tengo.
- A mi familia, especialmente a mis papás, **Carlos y Blanca**, gracias por todo su amor apoyo y paciencia. Este logro también es suyo.
- A **Javier**, por todo su amor y apoyo.
- A **Víctor y Claudia**, por su amistad incondicional, su cariño y apoyo durante todo este tiempo. No hubiera sido posible sin Ustedes.
- Al **Dr. Héctor Aguilar**, por su apoyo y ayuda incondicional a lo largo de mi carrera universitaria.
- Al personal del Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Composición de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, INCAP: **Carolina, Paola, Mónica, Susan, Doña María, Doña Maria Luisa y Adriana**. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con Ustedes y ser parte del grupo.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE GRÁFICAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiii
II. INTRODUCCIÓN	1
III. MARCO TEÓRICO	3
A. Importancia nutricional del Ácido Fólico	3
1. Formas químicas	3
2. Funciones y metabolismo	5
3. Relación del Ácido Fólico con otros nutrientes	8
4. Fuentes	8
5. Recomendaciones y requerimientos	9
6. Deficiencia	10
B. Fortificación de Alimentos	15
1. Importancia de la fortificación de alimentos	15
2. Fortificación de alimentos con Ácido Fólico	16
3. Impacto de la fortificación de alimentos	17
C. Estabilidad del Ácido Fólico en alimentos	20
1. Alimentos naturales	20
2. Alimentos fortificados	21
D. Métodos de análisis de Ácido Fólico	24
1. Métodos microbiológicos de análisis	25
2. Métodos instrumentales	26
3. Métodos inmunológicos	26
E. Validación del método	28
1. Estándar de referencia	28
2. Desarrollo del método	29
3. Cuantificación	30
IV. OBJETIVOS	31
V. HIPÓTESIS	32



## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Alimentos que son fuente de Folatos	9
2. Ingesta nutricional de referencia Folatos de la dieta (ug EFA/día)	10
3. Alimentos fortificados en Costa Rica	18
4. Niveles de Folato en suero antes y después de la fortificación en Costa Rica	19
5. Tasa de defectos del tubo neural por provincia, Costa Rica 1996-2000	20
6. Estabilidad de Folato en trigo y harina	23
7. Descripción del material de referencia utilizado para la validación del método de determinación de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos	33
8. Descripción de la muestra de pasta alimenticia no fortificada	33
9. Descripción de la muestra de pasta alimenticia fortificada	34
10. Valores sugeridos de peso y volúmenes a usar en el análisis de Ácido Fólico con base en la concentración presente en los alimentos analizados	35
11. Prueba de extracción enzimática introducida al método	37
12. Diluciones de inóculo probadas, por lote	37
13. Densidad óptica a 650 nm para la muestra de harina de trigo tratada con la enzima alfa-amilasa y no tratada con la enzima	43
14. Densidad óptica medida a 650 nm para las diferentes concentraciones de inóculo utilizadas	44
15. Determinación de límite de detección, límite de cuantificación y rango de trabajo para el método adaptado a microplaca de 96 pozos	46
16. Determinación del porcentaje de recuperación de Ácido Fólico en el material de referencia VMP-1	48
17. Variaciones del valor teórico aceptado para la muestra de referencia VMP-1 al evaluar la recuperación del método en microplaca de 96 pozos	49
18. Concentración de Ácido Fólico obtenida en el análisis de muestras de alimentos no fortificados	49
19. Determinación de la concentración de Ácido Fólico en harina de trigo fortificada	50
20. Determinación de la concentración de Ácido Fólico en pasta alimenticia fortificada	51
21. Determinación de la concentración de Ácido Fólico en galleta fortificada	51

Tabla	Página
22. Promedio de la concentración de Ácido Fólico calculada para los diferentes alimentos fortificados	51
23. Variación de la concentración de la solución madre de Ácido Fólico durante almacenamiento a 4 °C	52
24. Variación de la concentración de Ácido Fólico en los alimentos analizados durante el almacenamiento a 4 °C	53
25. Comparación de las concentraciones de Ácido Fólico presente en las diferentes pastas comerciales analizadas	56
26. Descripción de diferentes bacterias utilizadas en la determinación de Ácido Fólico	72
27. Composición de los medios de cultivo utilizados en el análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos	73
28. Valores sugeridos de peso y volúmenes de aforo y alícuotas a usar en el análisis de Ácido Fólico, dependiendo de la concentración del mismo en el alimento	76
29 Volúmenes utilizados en el análisis de Ácido Fólico en tubo para realizar las diluciones	77
30. Reactivos químicos utilizados para la validación del método de análisis de Ácido Fólico en microplaca	80

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Frecuencia de defectos del tubo neural en nacimientos hospitalarios por región, Guatemala	14
2. Casos de DNT en el Hospital Nacional de Niños, Costa Rica	19
3. Otros tipos de defectos congénitos en el Hospital Nacional de Niños en Costa Rica	19
4. Cambios en el contenido de micronutrientes del grano de trigo con la molienda	22
5. Diferencia de la densidad óptica a 650 nm en función del tiempo de incubación	45
6. Densidad óptica en función de la concentración de Ácido Fólico para el rango de trabajo determinando en el análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos	48
7. Análisis de concordancia comparando el método microbiológico de determinación de Ácido Fólico en tubo contra el método microbiológico en microplaca de 96 pozos	55
8. Concentración de Ácido Fólico en función del tiempo de cocción para la pasta alimenticia “La Moderna”	56
9. Concentración de Ácido Fólico en función del tiempo de cocción para la pasta alimenticia “Sabemas”	57
10. Porcentaje de retención de Ácido Fólico para pasta “La Moderna” a diferentes tiempos de cocción	57
11. Porcentaje de Retención de Ácido Fólico para pasta “Sabemas” a diferentes tiempos de cocción	58

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Fórmula estructural del Ácido Fólico (PGA) y otros Folatos comunes	4
2. Diagrama de flujo del metabolismo del folato en el Hombre	68

## RESUMEN

Se realizó la validación del método microbiológico en microplaca para el análisis de Ácido Fólico en alimentos fortificados, así como el análisis de estabilidad de esta vitamina en pastas alimenticias fortificadas durante diferentes tiempos de cocción.

Previo a la validación se determinó el procedimiento de extracción adecuado para este método. En relación al método de análisis en tubo se introdujo una digestión enzimática con  $\alpha$  amilasa. Se estableció que la concentración de inóculo de *Enterococcus hirae* ATCC 8040 adecuada para el método de análisis microbiológico de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos es de 0.5  $\mu$ L por cada mL de medio. No es posible preparar el inóculo por lote utilizando glicerina al 15% en solución salina al 0.85%.

El periodo de incubación ideal para el método de análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos es de 22 hrs. Además se estableció un límite de detección de 0.0771 OD, un límite de cuantificación de 0.1953 ng/mL y un rango de trabajo de 12.5-0.1953 ng/mL. En cuanto a la curva de calibración que más se adapta al método de análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos para realizar la cuantificación en las muestras es el parámetro 4.

Se analizó el material de referencia VMP-1 con el cual se calculó el porcentaje de recuperación. Con base a esto se obtuvo un porcentaje de recuperación de 102.45%.

Se analizaron tres diferentes alimentos para los cuales se estableció su respectiva precisión y repetibilidad. Se obtuvo una variación del 2.73% para harina de trigo, 3.96% para pasta alimenticia y de 2.96% para galleta nutricionalmente mejorada.

Por otro lado, a las pastas comerciales fortificadas analizadas se determinó la degradación del Ácido Fólico debido al proceso de cocción. En cuanto al porcentaje de retención se calculó que para la pasta alimenticia "La Moderna" fue de 16.29% después de 12 min. de cocción, 11.08% después de 15 min. de cocción, 9.27% después de 20 min. de cocción y de 6.83 % después de 25 min. de cocción para las muestras lavadas.

Para las muestras no lavadas el porcentaje de retención de Ácido Fólico fue de 20.24% después de 12 min. de cocción, 13.30% después de 15 min. de cocción, 11.23% después de 20 min. de cocción y de 9.72 % después de 25 min. de cocción.

Para la pasta alimenticia "Sabemas" el porcentaje de retención de Ácido Fólico fue de 44.40% después de 8 min. de cocción, 17.80 % después de 13 min. de cocción, 27.29% después de 18 min. de cocción para las muestras lavadas y de 62.06%, 43.12% y 30.64% para las muestras no lavadas.

## I. INTRODUCCIÓN

Los Folatos son vitaminas solubles en agua que pertenecen al complejo B. Son cofactores enzimáticos necesarios para la síntesis de nucleótidos de purinas y timidinas y para la síntesis de metionina a partir de homocisteína. La deficiencia de Folatos puede llevar a patologías cardiovasculares, cáncer y desarrollo de defectos congénitos como defectos del tubo neural (Stover, 2004).

La fortificación de alimentos es una estrategia de salud pública muy efectiva para disminuir la deficiencia de Ácido Fólico y así disminuir sus consecuencias para la salud. Actualmente se fortifica la harina de trigo y por ende los productos fabricados con ella tienen altos niveles de Ácido Fólico para cumplir con la ingesta diaria recomendada. Entre otros alimentos que pueden fortificarse están la leche y las pastas alimenticias, para que se pueda extender la cobertura de la fortificación.

Existen diferentes métodos para cuantificar Ácido Fólico en alimentos fortificados como el método por HPLC, el cual es mayormente utilizada para determinar y caracterizar las diferentes formas de Folatos naturales presentes en los alimentos, los métodos inmunológicos como ELISA y RIA, que son mayormente utilizados para análisis en plasma y tienen poca aplicación para alimentos. El método oficial de la AOAC para alimentos es el método microbiológico. Para éste se utiliza la bacteria *Enterococcus hirae* ATCC 8043 o *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Éstas son bacterias que dependen del Ácido Fólico para desarrollarse, lo que permite cuantificar la cantidad de Ácido Fólico en las diferentes muestras en función de la turbidez provocada por la bacteria a diferentes concentraciones. Este procedimiento presenta resultados satisfactorios, con la única desventaja que se debe esperar por lo menos 16 hrs. para obtener resultados.

En el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), este método ha sido validado para la determinación de Ácido Fólico en tubo, sin embargo, éste consume mucho tiempo y recursos y para hacerlo más eficiente existe la opción de desarrollar y validar un método semiautomatizado utilizando una microplaca de 96 pozos y obtener los resultados por medio de un lector de microplacas acoplado a un software donde se analizan los datos. Esto, además de ahorrar tiempo, también reduce costos ya que siendo un método micrométrico se reducen las cantidades de muestras y reactivos necesarios para el análisis.

Este trabajo tiene como objetivo la adaptación y validación del método microbiológico para análisis de Ácido Fólico en alimentos fortificados a microplaca de 96 pozos, analizando tres alimentos: harina de trigo, pasta alimenticia y galleta fortificada. Los parámetros fundamentales

para la validación de un método son exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, repetibilidad y estabilidad (FDA, 2001). Para el proceso de validación que a continuación se presenta, se determinaron estos parámetros, así como el rango de trabajo, curva de calibración y porcentaje de recuperación para muestras a base de cereales. Todos ellos cumplieron dentro de las normas establecidas para la validación de métodos detallado por Eurochem y FDA.

Por otro lado, se realizó un análisis de estabilidad de Ácido Fólico durante el cocimiento a diferentes tiempos de pastas alimenticias fortificadas. Aquí se observó una retención muy baja por lo que se recomienda tomar en cuenta esta situación para determinar la cantidad de Ácido Fólico agregado a los alimentos para cumplir con el requerimiento de ingesta nutricional diaria.

## XI. ANTECEDENTES

### A. Importancia nutricional del Ácido Fólico

Los Folatos son vitaminas hidrosolubles del complejo B (Brody, 1999). Se degradan por el calor, la oxidación y la luz ultravioleta. Están presentes en las células como una familia de enzimas interconvertibles necesarias para la síntesis de nucleótidos de purina y timidina y para la síntesis de metionina a partir de homocisteína (Stover, 2004). Es considerado un nutriente esencial ya que la única fuente de Folatos es la dieta (Acuña *et al.*, 1998).

**1. Formas químicas.** Folato es el término genérico usado para los compuestos que tienen actividad similar al ácido pteroilglutámico, en los que se incluye a los Folatos naturales y al Ácido Fólico de los suplementos y alimentos fortificados (Bailey *et al.*, 2003). Los Folatos se presentan en varias formas reducidas, metabólicamente activas, generalmente conjugadas en enlaces peptídicos (Shils *et al.*, 1999). Se han identificado un número de compuestos relacionados que se encuentran en tejidos de plantas y animales que presentan diferentes funciones. Los compuestos de Ácido Fólico se han nombrado vitamina Bc, factor *Lactobacillus casei*, leucovorin, factor de citrovorum y folacina (Stokstad, 1965). Sin embargo, la comisión de nomenclatura bioquímica ha establecido que

*« los Folatos y el Ácido Fólico se usan como sinónimos para el pteroglutamato y el ácido pteroglutámico, respectivamente. El término Folatos pueden también utilizarse en un sentido genérico para designar cualquier miembro de la familia de los pteroglutamatos o mezclas de éstos, teniendo varios niveles de reducción del anillo de pteridina, sustituciones en C-1 y numerosos residuos de glutamato »* (Herbert, 1999).

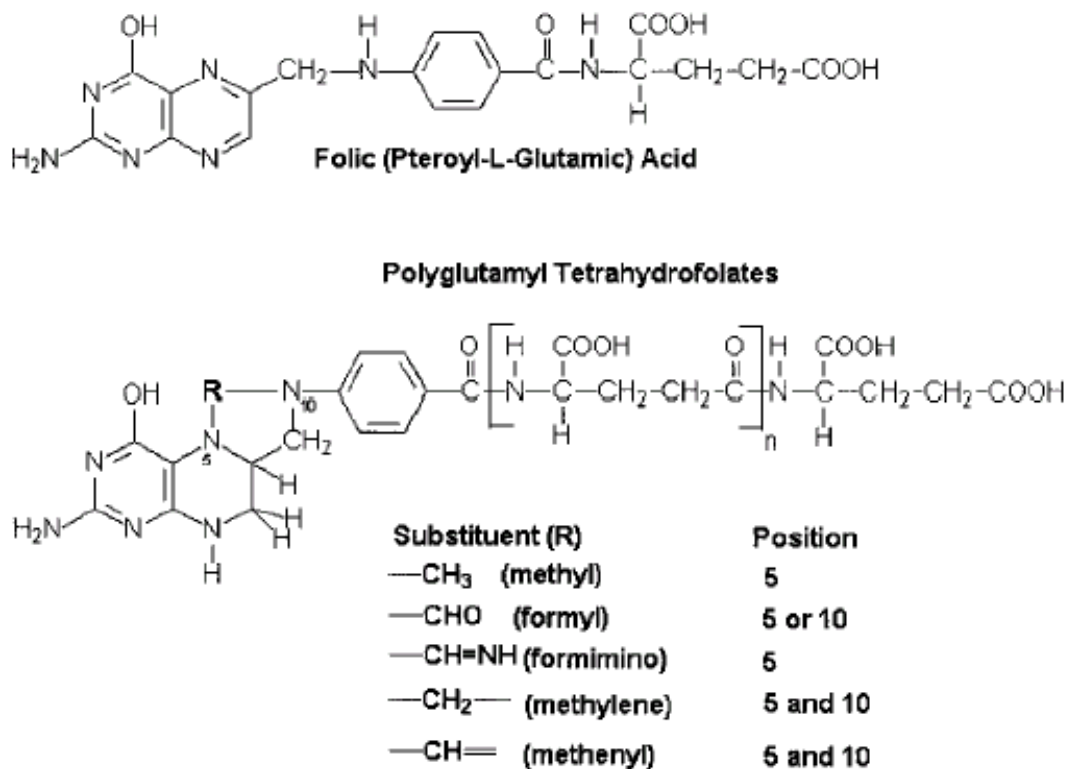
Su nombre químico es ácido N-[4-[(2-amino-1,4-dihidro-4-oxo-6-pteridini-metil) amino] benzoil]-L-glutámico y tiene un peso molecular de 441.41 g / mol. En estado puro se presenta como un polvo cristalino de color amarillo a café, ligeramente soluble en agua e insoluble en compuestos orgánicos, pero soluble en hidróxidos alcalinos y carbonatos diluidos (Hazra, 2001).

Los Folatos se caracterizan por un sistema de anillo bencílico de pteridina, el ácido p-amino benzoico y uno o más residuos de ácido glutámico, como se puede notar en la Figura # 1. La mayoría de Folatos naturales posee una cadena lateral que contiene de cinco a ocho residuos de glutamatos unidos por enlaces  $\gamma$  - peptídicos. El término Ácido Fólico se refiere a la forma monoglutámica completamente oxidada de la vitamina, siendo ésta la forma sintética de uso comercial en suplementos y alimentos fortificados y que no es común en la naturaleza (Bailey *et al.*, 2003).

En la Figura # 1 se presenta la forma estructural del Ácido Fólico. Las mayores subunidades de la molécula es la parte pteridina unida por el puente de metileno al ácido p-amino benzoico, el cual está unido por un enlace peptídico al ácido glutámico. Debido a su estabilidad característica, la forma sintética es utilizada para la fortificación de alimentos y para la preparación de suplementos que contienen Folatos (Shils *et al.*, 1999).

La estructura de la molécula puede variar debido a la reducción del residuo de pteridina a ácido dihidrofólico y tetrahidrofólico (THF), la elongación de la cadena para formar poliglutamatos y la sustitución de las unidades 1-C en las posiciones 5 y 10 formando puentes entre ambas posiciones. Las coenzimas del Folato son las formas del poliglutamato de THF, como las que contienen sustitutos metilenos, metilo, metileno, formilo o formino (Bailey *et. al*, 2003).

**Figura # 1. Fórmula estructural del Ácido Fólico (PGA) y otros Folatos comunes**



(Gregory, 2001)

El ácido folilpteroil-L-glutámico (PGA), el compuesto oxidado, no se encuentra normalmente en los alimentos o el cuerpo humano de forma significativa, las formas más predominantes son

las formas reducidas, las cuales se diferencian de la forma principal en una o tres modificaciones estructurales:

- Todos son Folatos reducidos y excepto por el 7,8 dihidrofolato, todas son 5, 6, 7,8 tetrahidrofolatos (THF).
- Varios compuestos monocarbonados pueden estar unidos al THF en N-5, N-10 o N-5,10.
- El número de residuos de glutamato pueden variar de uno a siete y algunas veces hasta 11, cada una unida por un enlace peptídico entre los grupos amino y  $\gamma$  carboxilo del glutamato predecesor.

(Herbert, 1999).

El suero humano normal contiene de 5-16 ng /mL de actividad de Ácido Fólico. La forma de Folatos dominante en el suero y los eritrocitos es el 5-metil THF (Herbert, 1999).

Los Folatos que contienen una cadena de poliglutamato se conocen como folipoliglutamatos; éstos en los tejidos mamíferos corresponden a folilpentaglutamato y folilhexaglutamato, con cinco y seis residuos de ácido glutámico respectivamente (Brody, 1999).

Por otro lado, en las bacterias se conocen derivados de hasta 12 residuos de glutamato. Además, los Folatos extracelulares presentes en la orina, bilis, plasma y líquido cefalorraquídeo son derivados de monoglutamato (Krumdieck, 1991).

**3. Funciones y metabolismo.** Los Folatos actúan como coenzimas para las reacciones de transferencia de un carbono y como sustratos de la reacción de óxido-reducción que cambia el estado de oxidación de los fragmentos de carbono unidos a los Folatos. Las transferencias de un carbono que requieren Folatos son necesarias para la biosíntesis de los nucleótidos de purina y ácido desoxitimidílico, esenciales para la síntesis de ADN y ARN. También es necesario para la síntesis de metilos que sustentan un gran número de reacciones de metilación mediadas por la S-adenosilmetionina cuando la ingesta de metionina es limitada (Krumdieck, 1991).

El Ácido Fólico, así como la vitamina B12, son necesarios para la síntesis de timidilatos y por lo tanto del ácido desoxiribonucleico (ADN). El daño al ADN causado por la deficiencia de alguna de estas vitaminas aumenta el riesgo de cáncer. La megaloblastosis resulta de la disminución de la síntesis de ADN (Balley *et al.*, 1999).

Los Folatos de alimentos naturales deben ser convertidos a monoglutamato por la acción de la enzima pteroilpoliglutamato hidrolasa que se localiza en el yeyuno. El pH óptimo de esta enzima es de 6.5 a 7.0, el monoglutamilfolato formado es transportado a través de la membrana por un mecanismo de transporte dependiente del pH, si las concentraciones intra luminales de Folatos son altas (arriba de 10  $\mu\text{mol/L}$ ), predomina un proceso de transporte no saturable por medio de iones (Bailey *et al.*, 2003).

Antes de ingresar a la circulación portal, el Ácido Fólico sufre una reducción a THF y la metilación o formilación dentro de las células de la mucosa. Este proceso se satura rápidamente por lo que se puede detectar grandes cantidades en plasma y orina en personas que consumen de 400 – 800  $\mu\text{g/día}$ . La forma predominante de Folatos en el plasma es de 5-metilTHF que se une a la albúmina y a la proteína ligadora de Ácido Fólico de alta afinidad, éstas últimas transportando los Folatos hacia las células de determinados tejidos (riñón, placenta) (Bailey *et al.*, 2003).

Una vez en el interior de las células, el 5-metilTHF es desmetilado y convertido en una forma poliglutamilo por acción de la folipoliglutamato sintetasa. Antes de ser liberados de los tejidos hacia la circulación se reconvierten a poliglutamatos por medio de la poliglutamato hidrolasa. Aproximadamente, el contenido corporal de Folatos en el ser humano varía entre 34 – 68  $\mu\text{mol}$  (15-30 mg). Se estima que el hígado tiene el 50% de los depósitos de Folato del cuerpo. La fracción de Folatos que no se une a proteínas es reabsorbida. La mayor parte de los Folatos se excreta como escisión. La excreción fecal es difícil de determinar debido a que hay una contribución de la síntesis de microbiana colónica (Bailey *et al.*, 2003).

Estudios cinéticos han demostrado que existen uno o más fondos de intercambio rápido con tiempos de residencia medios de 0.5 a 2 días y reservas más abundantes, con recambios más lentos y permanencia media de 100 a 200 días para un consumo de Folatos igual o menor a 400  $\mu\text{g/día}$  (Bailey *et al.*, 2003).

El Ácido Fólico se absorbe a lo largo de todo el intestino delgado, principalmente en el tercio proximal. Antes de ser absorbido, el exceso de glutamatos deben separarse de la cadena lateral de la molécula de vitamina por medio de la enzima conjugasa (pteroilpoliglutamato hidrolasa). La biodisponibilidad de los Folatos monoglutamatos (PteGlu) es significativamente mayor que la de los Folatos poliglutamatos (PteGlu<sub>n</sub>) en humanos, posiblemente debido a que los últimos se deben de hidrolizar (Herbert, 1999).

El Ácido Fólico absorbido del intestino a concentraciones fisiológicas es convertido en grandes cantidades en el lumen y los enterocitos a sus formas reducidas y después metilados o formilados, en altas concentraciones son transportados a través de los enterocitos sin estas modificaciones. Sin embargo, las formas reducidas o metiladas del Folato se transfieren más rápidamente desde el intestino hacia la circulación que la forma sintética, el Ácido Fólico (Herbert, 1999).

Los Folatos en el plasma aparecen distribuidos en tres fracciones: Folato libre, Folato que se une a moléculas de baja afinidad y Folato que se une a moléculas de alta afinidad; los dos primeros se encuentran en una cantidad similar, mientras que el último está presente en menor magnitud. Las moléculas de baja afinidad pueden ser proteínas no específicas del plasma como la albúmina. En el caso de las moléculas de unión de alta afinidad, se ha determinado que solamente son segregadas en caso de enfermedad, aunque todo suero humano las contiene. Se cree que solamente existe una clase de estas moléculas. Éstas son glucoproteínas con peso molecular de aproximadamente 40000, son sintetizadas y liberadas de los granulocitos y son modificadas en el hígado y riñón (Herbert, 1999).

Sus funciones fisiológicas no se han demostrado, pero se cree que juegan un papel importante en distribuir Folatos hacia el hígado, controlar la distribución, rompimientos y excreción de Folatos en estados de deficiencia y transportar los Folatos oxidados del fluido cerebroespinal hacia la sangre, además pueden estar relacionados con la toma de Folatos mediada por la membrana. Estas proteínas parecen tener más afinidad por el Ácido Fólico que por el Folato reducido (Herbert, 1999).

Los Folatos son llevados a las células de la médula espinal, reticulocitos, hígado, fluido cerebro espinal y células tubulares renales en contra de un gradiente de concentración de forma que sugiere un transporte mediado por acarreadores dependientes de energía. El metil THF parece ser transportado de manera más eficiente que el Ácido Fólico a través de las células intestinales hacia las células del organismo. Se ha identificado un receptor de membrana específico para los Folatos (Herbert, 1999).

La mayoría de los Folatos almacenados se encuentran en forma de poliglutamatos. Su transporte posiblemente requiera de la hidrólisis a monoglutamatos, por lo que las enzimas poliglutamato hidrolasa y conjugasa juegan un papel importante en el almacenamiento de los Folatos. Algunas evidencias indican que los poliglutamatos son los sustratos preferidos y coenzimas activas de varias vías de metabolismo de un carbono. Un exceso de PGA sintético

tomado de forma oral, al ser absorbido de manera intacta como la forma oxidada, puede interferir con el metabolismo de los Folatos (Herbert, 1999).

Los Folatos son excretados en la orina y la bilis en la forma metabólicamente activa e inactiva. La excreción urinaria de los materiales metabólicamente activos ocurre después de la filtración glomerular de la fracción libre y la reabsorción de algunos Folatos filtrados por medio de transporte activo a través de la pared celular tubular. El principal producto de la degradación de Folatos en la orina es el acetomidobenzoilglutamato. Esto sugiere que la principal ruta del catabolismo de los Folatos ocurre a través de ruptura oxidativa de la molécula de Folato entre los enlaces 9-10 con la acetilación de la fracción p-aminobenzil en el hígado antes de la excreción. Por otro lado, por medio de la bilis se excretan diariamente aproximadamente 100 ug de Folatos biológicamente activos en forma de un compuesto que no es producto del rompimiento de los enlaces 9-10. (Herbert, 1999).

La vía metabólica del Ácido Fólico se describe con detalle en el Apéndice A.

b. **Biodisponibilidad.** La biodisponibilidad de los Folatos naturales es variable y puede ser incompleta. Muchos aspectos, como la matriz de los alimentos, fármacos, inestabilidad de ciertos THF o situaciones fisiológicas, pueden afectar la biodisponibilidad de esta vitamina. Debido a que la digestión, absorción y metabolismo es diferente entre individuos no hay un acuerdo general de la biodisponibilidad de los Folatos ya que se presenta una gran variación; esto puede deberse a diferencias entre protocolos o discrepancias analíticas, ya que los métodos de análisis no están estandarizados y es muy difícil obtener un método repetible. Además, se ha determinado que la biodisponibilidad de Ácido Fólico en alimentos enriquecidos es comparable a la de alimentos naturales, alcanzando hasta 85% (Bailey *et al.*, 2003).

3. **Relación del Ácido Fólico con otros nutrientes.** La deficiencia de la vitamina B-12 puede inducir la deficiencia de Folato, debido a que la vitamina B-12 es requerida para la conversión de 5-MTH a THF. La vitamina B-12 es cofactor de la metionina sintasa, la enzima que cataliza esta reacción. El metabolismo de Folatos está íntimamente relacionado con el metabolismo de la vitamina B-12; debido a esta relación, los síntomas de la deficiencia son muy similares (Brody, 1999).

4. **Fuentes.** Los Folatos naturales se concentran en determinados alimentos, entre los que se pueden mencionar jugo de naranja, hortalizas de color verde oscuro, los espárragos, frutas, manías y legumbres como las habas (Bailey *et al.*, 2003).

Los Folatos están presentes en todos los alimentos naturales. En la Tabla #1 se listan algunos alimentos y la cantidad de Ácido Fólico que contienen. En el apéndice B se presenta una lista más completa (Herbert, 1999).

El Ácido Fólico es altamente susceptible a la oxidación, entre un 50-95% de los Folatos se pierden durante el cocimiento u otros procesos como el enlatado y todos los Folatos se pierden de alimentos refinados como azúcar, licor y dulces. Los alimentos con más alto contenido de Ácido Fólico por unidad de peso seco incluyen levadura, hígado, vegetales verdes y algunas frutas (Herbert, 1999).

**Tabla # 1. Alimentos que son fuente de Folatos**

<b>Alimento</b>	<b>Microgramos por cada 100 gramos</b>
Vegetales verdes	120-160
Otros vegetales	40-100
Frutas (particularmente cítricos)	50-100
Frijoles (legumbres)	50-300
Granos enteros	60-120
Cereales de desayuno fortificados	100 ó 400

(FDA, 1999)

**5. Recomendaciones y requerimientos.** Tradicionalmente, los aportes se han definido como la ingesta para prevenir el déficit con síntomas clínicos. Recientemente, en la publicación de la ingesta nutricional de referencia (INR) se destacó el objetivo de las recomendaciones sobre el consumo de nutrientes a la identificación de las ingesta que promuevan la salud óptima. La INR se expresa en términos de equivalentes de Folato alimentario (EFA), una unidad que considera las diferencias típicas de biodisponibilidad entre el Ácido Fólico y el Folato alimentario (Bailey *et al.*, 2003).

La estimación de los requerimientos de Folatos se basan en la ingesta asociada con el mantenimiento de las concentraciones normales de Folatos en el plasma y los eritrocitos y las pruebas funcionales que reflejan anormalidades en las reacciones dependientes de Folatos. En la Tabla # 2 se presentan los valores de la ingesta de Folatos recomendada en términos de ingesta adecuada (IA) e INR para todas las categorías de edad y ambos sexos. Los datos que asocian la ingesta diaria de Ácido Fólico con la reducción del riesgo de malformaciones del tubo neural se consideran suficientes como base para una recomendación independiente del ANR para las mujeres que pueden concebir. Cabe notar que para adultos mayores de 19 años la ingesta recomendada en la dieta (RDA) es de 400 ug/d de equivalentes de Folatos de la dieta (DFE); para las mujeres embarazadas y lactando la RDA incluye 200 y 100 ug de DFE/d adicionales para cada una (Bailey *et al.*, 1999).

**Tabla # 2. Ingesta nutricional de referencia de Folatos de la dieta (ug EFA/día)**

Grupo	Ingesta adecuada (ug de DEF/d)	Cantidad recomendada (ug de DEF/d)
Infantes (ambos sexos)		
0-5	65	
6-11	80	
Niños y adolescentes		
1-3		150
4-8		200
9-13		300
14-18		400
Adultos a partir de 19 años		400
Mujeres embarazadas de todas las edades		600
Mujeres lactantes de todas las edades		500

(Bailey *et al.*, 1999)

Además, en el INR se incluye el requerimiento promedio estimado (RPE), aporte nutricional recomendado (ANR) y límite superior tolerable de ingesta (LS), que se definió como la ingesta diaria más alta que probablemente no se asocie con efectos negativos en casi toda la población. Los efectos adversos del consumo excesivo de Ácido Fólico se relacionan con los observados en pacientes con déficit de vitamina B-12 que recibieron suplementos de Ácido Fólico. El LS se basa en datos que sugieren que un exceso de Ácido Fólico suplementario puede precipitar o exacerbar el daño neurológico de la deficiencia de vitamina B-12 ya que el Ácido Fólico enmascara o interfiere con la deficiencia de Vitamina B-12 debido a que la anemia responde al Ácido Fólico, enmascarando la deficiencia de la vitamina B12. No se han informado efectos adversos en relación con el consumo de Folatos naturales por lo que solo se aplica al Ácido Fólico sintético y se estableció en 1000 ug/día para todos los adultos (Bailey *et al.*, 20043).

**6. Deficiencia.** La deficiencia nutricional se refiere a que la cantidad del nutriente biológicamente activo en uno o más sistemas intracelulares es insuficiente para mantener las funciones bioquímicas normales. Esto se presenta en uno o más de estas categorías: ingesta inadecuada, absorción inadecuada, utilización inadecuada, excreción aumentada y desnutrición. La secuencia de eventos que llevan a la deficiencia de Folatos son las siguientes:

- **Etapa 1:** balance negativo de los nutrientes caracterizado por una baja en los niveles de Folato debajo de 3 ng/mL.
- **Etapa 2:** depleción de los Folatos que se caracteriza por una baja en los Folatos séricos y eritrocíticos debajo de 160 ng/mL.
- **Etapa 3:** eritropoyesis deficiente de Folatos indicada por la síntesis defectiva de ADN, resultados anormales de la prueba de supresión de deoxiuridina.

- **Etapa 4:** deficiencia clínica de Folatos manifestada por macroovalocitosis, volumen corpuscular elevado (MVC) y anemia.

(Herbert, 1999)

La deficiencia de Ácido Fólico puede desarrollarse debido a baja ingestión en la dieta, aumento de la demanda en determinado periodo (infancia y pubertad), lactancia y embarazo, una absorción deficiente, anemias hemolíticas y algunas enfermedades, como leucemia (Krishnaswamy & Nair, 2001). Otras causas se presentan en detalle en el Apéndice C.

El déficit grave de Folatos se asocia con anemia megaloblástica; también disminuye el número de leucocitos y de plaquetas debido a la alteración general de la división celular relacionada con la función de los Folatos en la síntesis de ADN. Los síntomas gastrointestinales suelen aparecer como resultado de un déficit grave de Folatos y a menudo se asocian con una absorción anormal. Además puede presentarse daño vascular. El déficit de Folatos suele observarse en el alcoholismo crónico y puede deberse a la ingesta insuficiente combinada con los efectos deletéreos del etanol sobre la absorción, metabolismo hepatobiliar y excreción renal (Bailey *et al.*, 2003).

Las mujeres embarazadas presentan un riesgo elevado de sufrir deficiencias de Folatos a causa de mayores necesidades de esta vitamina para la síntesis de ADN y otras reacciones de transferencia de 1-C (véase Apéndice A). El estado deficitario de Folatos se asocia con mayor riesgo de parto prematuro, bajo peso al nacer y retardo del crecimiento fetal. La elevación de las concentraciones maternas de homocisteína se asocia con complicaciones del embarazo como abortos espontáneos, preeclampsia, sangrado y rompimiento de placenta (Bailey *et al.*, 2003; Krishnaswamy & Nair, 2001).

Las dos enfermedades más importantes que se relacionan con los Folatos son los defectos del tubo neural (DTN) y la homocisteinemia (Krishnaswamy & Nair, 2001). Los DTN incluyen un amplio espectro de malformaciones congénitas. Éstas se producen cuando el tubo neural abierto presente en etapas tempranas del desarrollo embrionario no se cierra antes del día 28 de desarrollo. Casi la mitad de casos de DTN son de anencefalia. En este caso los bebés tienen un corto periodo de vida. La otra mitad de DTN incluye defectos a lo largo de la espina dorsal, desde la parte superior del tubo neural hasta el canal espinal. Estos defectos provocan discapacidad y tienen una de las mayores incidencias en cuanto a malformaciones congénitas (Acuña *et al.*, 1998).

En el caso de los DTN, no se ha establecido el mecanismo genético y bioquímico por el cual se generan. Se ha asumido que los DTN resultan de un metabolismo de Folatos maternal / fetal impedido, afectando las vías metabólicas de síntesis de metionina o deoxitimindina monofosfato (dTMP) (ver Apéndice A). Algunos mecanismos propuestos incluyen la acumulación de homocisteína, tasas de síntesis de ADN bajas debido a la síntesis limitada de dTMP, lo que afecta la migración y proliferación celular durante el periodo crítico de cierre del tubo neural y una razón elevada de S- adenosil homocisteína (SAH) / S-adenosilmetionina (SAM), lo que afecta la metilación del ADN y altera la expresión de genes que son críticos para la formación del tubo neural (Stover, 2004).

La hiperhomocisteinemia se considera un factor importante de riesgo de vasculopatía arteroesclerótica coronaria, cerebral y de vasos periféricos y de trombo embolismo arterial y venoso, agravándose éstos en caso de tabaquismo e hipertensión. La homocisteína se ha relacionado con retardo mental en niños, desordenes de desarrollo, osteoporosis; además es un factor de riesgo para isquemia del corazón. (Krishnaswamy & Nair, 2001).

Por otro lado, varios estudios epidemiológicos relacionan el riesgo de cáncer con un estado deficiente de Folatos, habiendo una fuerte asociación con el cáncer colorrectal. Este fenómeno se explica con el hecho de que la insuficiencia de Folatos posee efectos pro cancerígenos al interferir con la síntesis y la metilación normales de ADN. En respuesta al déficit, la síntesis de timidato se altera y el desequilibrio nucleotídico resultante incrementa la incorporación errónea al ADN de bases de uracilo provenientes del pozo de nucleótidos o de la desaminación de citosina no metilada. Debido a este proceso erróneo se puede producir una ruptura del ADN durante el proceso de reparación, provocando una inestabilidad genética aumentando el riesgo de contraer cáncer por medio de transformación celular. Otro mecanismo que explica la relación entre la deficiencia de Folatos y el cáncer se refiere a las modificaciones de metilación del ADN: dos estudios en voluntarios sanos muestran la inducción de una hipometilación genómica del ADN linfocitario humano como respuesta a una dieta baja en Folatos (Bailey *et al.*, 2003; Stover, 2004). Además, una baja concentración de Folatos en glóbulos rojos se asocia a alto riesgo de displasia cervical, especialmente carcinoma *in situ* (Krishnaswamy & Nair, 2001).

Además, numerosos fármacos pueden afectar la absorción y metabolismo de los Folatos, como el metotrexano, con una estructura muy similar a la del Ácido Fólico, tiene alta afinidad por la dihidrofolato-reductasa. Éste se usa en el tratamiento de artritis reumatoidea, soriasis, asma y enfermedades inflamatorias intestinales. Otros antagonistas de los Folatos incluyen: aminopterina, trimetoprima, trimetrexato. Éstos pueden bloquear la producción de timidina e inhibir la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos. Estos medicamentos se usan en el

tratamiento de cáncer. Si se administran de forma simultánea dietas altas en Folatos o suplementos de Ácido Fólico, los efectos colaterales tóxicos disminuyen sin afectar la eficacia del fármaco (Bailey *et al.*, 2003).

Es importante controlar esta relación fármaco-vitamínica ya que se ha demostrado que las mujeres que ingieren metotrexan tienen un mayor riesgo de tener hijos con malformaciones congénitas y esto podría depender de la acción antifolato del fármaco. También el uso crónico de anticonvulsivantes como difenaldantoína y fenobarbital se asocia al estado deficiente de Folatos. Se sugiere que estos fármacos interfieren en la utilización de los Folatos, pero no se conoce el mecanismo exacto. Otros medicamentos mencionados como antagonistas de los Folatos son la salicilazosulfapiridina (antiinflamatorio) y biganidas (control de glicemia). El alto consumo de alcohol puede alterar la utilización de los Folatos mediante mecanismos que afectan la absorción y alteraciones metabólicas que provocan mayor catabolismo y excreción del nutriente (Bailey *et al.*, 2003).

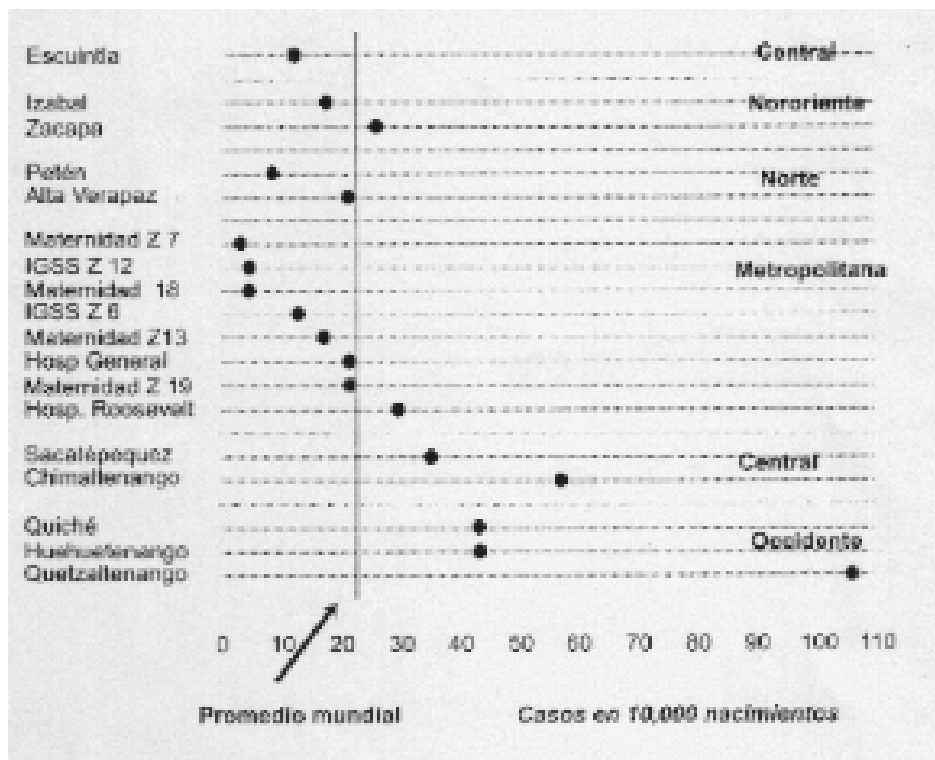
#### **a. Situación de deficiencia en Centro América**

1) **Guatemala.** No hay datos representativos. En la región peri urbana de la Ciudad de Guatemala la prevalencia de deficiencia de vitamina B-12 es muy alta en mujeres, niños e infantes, mientras que no se reportaron casos de bajo Folato en plasma en diferentes estudios realizados (Allen, 2004).

El primer estudio en niños de edad escolar, los cuales se seleccionaron ya que estaban infectados con *Giardia*. Se trabajó con 109 niños entre 6-12 años. De este grupo, 13% tenía deficiencia de vitamina B-12, ninguno presentaban baja concentración de Folatos en plasma, sólo el 7% presentaban deficiencia de hierro y 10% tenían anemia. En el otro estudio se midió el nivel de Folato y vitamina B-12 en plasma en 128 infantes entre 7-12 meses, provenientes de una región peri urbana pobre de la Ciudad de Guatemala. Ninguna presentó una baja concentración de Folatos en plasma, mientras que se detectó una deficiencia de vitamina B12 en el 25% de la población analizada (Allen, 2004).

Entre 2001 y 2002 se realizó una investigación a nivel de 18 maternidades de centros hospitalarios del país a fin de conocer la tasa de defectos de tubo neural en los niños nacidos vivos. En la Gráfica # 1 se presentan los resultados, destacándose que el número de casos en los departamentos de Zacapa, Sacatepéquez, Chimaltenango, Quiché, Huehuetenango, Quetzaltenango y la maternidad del Hospital Roosevelt de la ciudad capital excede la cifra correspondiente al promedio mundial (Cifuentes, 2002)

**Gráfica # 1. Frecuencia de defectos del tubo neural en nacimientos hospitalarios por región, Guatemala**



(Cifuentes, 2002)

Por otro lado, según el Centro de Investigación de Ciencias Médicas de la Salud (CICS) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en Guatemala, el 30% de los bebés que nacen muertos presentan problemas congénitos, siendo la principal causa la falta de Ácido Fólico en la madre. El 67% de las anomalías congénitas es del tubo neural, de éstos el 90% fallecen en los primeros cinco meses de vida y el 10% restante sufre severas discapacidades. No existen estudios que reporten el número de casos diagnosticados en la etapa prenatal. Los departamentos más afectados son: Guatemala, con 54 casos por cada 10 mil nacidos, Quetzaltenango, 24 casos por cada 10 mil nacidos, Sacatepéquez, 21 casos por cada 10 mil nacidos, Alta Verapaz, 21 casos por cada 10 mil nacidos y Huehuetenango, 19 casos por cada 10 mil nacidos (Valdéz, 2005).

2) **Costa Rica.** Se tienen datos de concentración de Folatos en suero reportados en la Encuesta Nacional realizada en 1996. Esto se discute con más detalle en la sección de fortificación de alimentos. Los datos de Costa Rica, que usan una muestra representativa a nivel nacional, se expresan en términos de severo (menor de 6.8nmol/L), moderado (6.8-13.9 nmol/L), normal (14-45nmol/L) y alta (arriba de 45 nmol/L), todo en

concentración de Folato sérico. En mujeres no lactantes, no embarazadas de edad fértil la prevalencia fue de 4, 11, 68 y 8%, respectivamente, en niños arriba de seis años fue de 2, 9,66 y 22%, respectivamente. Esto indica que hay un bajo riesgo de deficiencia de Folatos en el país (Allen, 2004).

No se cuentan con datos del resto de países centroamericanos.

## **B. Fortificación de alimentos**

La fortificación de alimentos se ha desarrollado como una estrategia para eliminar problemas nutricionales y deficiencia de ciertas vitaminas y minerales. Lo que se conoce como fortificación o enriquecimiento de alimentos se define como:

*« la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento con el propósito de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o grupo específico de población »* (Guamuch, 2003).

La fortificación de alimentos es la estrategia de mejor costo-efectividad y, a diferencia de la diversificación de la dieta, no afecta los hábitos alimentarios de la población; además se tiene un amplia cobertura, sin necesidad de coordinar logística y distribución y verificar la ingestión del suplemento (Guamuch, 2003).

**1. Importancia de la fortificación de alimentos.** La fortificación de alimentos de consumo masivo representa una estrategia importante para combatir la deficiencia de micronutrientes, mejorando la situación nutricional de la población. Ésta presenta diferentes beneficios para la salud pública, entre los que se pueden mencionar:

- Crecimiento económico y social de las naciones.
- Ahorro en el gasto público para tratar enfermedades
- Incremento en la productividad individual y colectiva.
- Desarrollo de las capacidades físicas y mentales de las personas y las comunidades.

(Dary, 1999)

Además presenta varias ventajas como un costo-efectividad favorable, el costo total de la fortificación es permisible, es fácil de controlar y administrar y puede orientarse a grupos especiales (Dary, 1999).

**2. Fortificación de alimentos con Ácido Fólico.** Las evidencias científicas que vinculan el efecto protector que tiene una mayor ingesta de Ácido Fólico contra la aparición de DTN, como la espina bífida y la anencefalia, han secundado la recomendación formulada por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos en 1992 y por el Instituto de Medicina en la Academia Nacional de Ciencias en 1998, que todas las mujeres en edad reproductiva deben consumir diariamente 0,4 mg (400 mcg) de Ácido Fólico sintético, además de un régimen alimentario rico en Folatos naturales (OPS/OMS, 2004).

La consulta de expertos de la FAO/OMS realizada en 1998 sobre las *Necesidades humanas de vitaminas y minerales* también apoyó esta recomendación. Sin embargo, alcanzar el nivel recomendado mediante el consumo de Folatos naturales en los alimentos es muy difícil debido a su baja biodisponibilidad. Por otro lado, administrar suplementos de Ácido Fólico a toda la población en riesgo también constituye un reto logístico importante, aun en los países desarrollados (OPS/OMS, 2004).

Por estas razones, la fortificación con Ácido Fólico es una alternativa efectiva para que gran proporción de la población objetivo aumente sus concentraciones de Folatos. La fortificación de alimentos con Ácido Fólico ha sido considerada una intervención favorable debido a la compatibilidad tecnológica de agregar el Ácido Fólico a la premezcla; además, no se ha demostrado que el Ácido Fólico ocasione cambios organolépticos en los productos finales y el costo de agregarlo a los alimentos no aumenta significativamente el costo de los productos finales (OPS/OMS, 2004).

El Ácido Fólico ha sido incluido en los programas de fortificación de cereales en los últimos 10 años. La razón principal para incluirlo fue la prevención de DTN (Wesley, 2002).

La estrategia de salud pública que parece ser más efectiva para prevenir los DTN parece ser la fortificación de alimentos con Ácido Fólico. El Ácido Fólico se considera no tóxico, aún cuando se consume en grandes cantidades, pero se debe considerar a las personas que tienen deficiencia de vitamina B-12 y las personas con epilepsia que están en tratamiento con anticonvulsivantes (Brower, 1995).

Si se agregara el Ácido Fólico que pierden durante el proceso a las harinas, pan, cereales y jugos de frutas y vegetales se estima que se prevendrían en un 21% los DTN. Si se agrega el doble de la cantidad perdida a estos mismos alimentos, se prevendrían en un 38% y si se agregara el 50% del IDR a la harina y cereales para el desayuno, se prevendrían en un 66%.

Además, Se tiene evidencia que la fortificación con Ácido Fólico puede reducir los niveles de homocisteína en la sangre (Bower, 1995).

Es casi imposible obtener una cantidad adecuada de Folatos de los alimentos naturales, principalmente porque los Folatos naturales tienen solamente el 60% de actividad que el Ácido Fólico sintético, por lo que la mejor manera de obtener Ácido Fólico es por medio de la adición de éste a diferentes alimentos, siendo la harina la principal elección (Wesley, 2004).

**3. Impacto de la fortificación de alimentos.** Varios países desarrollados han implementado la fortificación de alimentos para controlar las deficiencias de nutrientes en sus poblaciones (Guamuch, 2003).

En los Estados Unidos de América, se agrega Ácido Fólico a los alimentos de grano enriquecidos. A partir del 1er. de enero de 1998, todos los productos de grano de cereal que figuran como enriquecidos en la etiqueta (pan, pastas, harina, cereales listos para consumir, arroz) y alimentos mixtos que contiene estos granos han sido fortificados por mandato de la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA), esto con el objeto de incrementar el consumo de Ácido Fólico en mujeres de edad fértil (Bailey *et al.*, 2003).

Numerosos informes reportan que el estado vitamínico respecto al Ácido Fólico mejoró a nivel poblacional a partir de esta normativa, sin embargo los datos no alcanzan para determinar el efecto de ésta sobre la incidencia global de defectos del tubo neural (Bailey *et al.*, 2003).

La iniciativa de Estados Unidos de fortificación con Ácido Fólico se realizó para ayudar a la población a alcanzar la ingesta de 400 microgramos / día para prevenir los DTN. Desde la fortificación, la incidencia ha disminuido en un 19%. Aunque no se conoce una concentración tóxica de Ácido Fólico se fijaron niveles de acuerdo para evitar efectos dañinos como el enmascaramiento de la deficiencia de vitamina B-12 y porque no se conocen los efectos del consumo de cantidades elevadas de Ácido Fólico a largo plazo en la población (Stover, 2004).

Desde enero de 1998, la mayoría de cereales en Canadá se fortifican con Ácido Fólico, buscando agregar entre 0.1 y 0.2 mg de esta vitamina a la dieta de la población y reducir así los defectos del tubo neural. Desde la implementación de esta fortificación se ha incrementado de forma dramática las reservas de Ácido Fólico en mujeres de todas las edades. El beneficio que se ha documentado a la fecha es la reducción en un 50% de los DTN. Se está considerando agregar vitamina B-12 a los alimentos fortificados para evitar el enmascaramiento de la deficiencia de esta vitamina, sobre todo en personas mayores (Ray, 2004).

Entre los países en desarrollo, Centroamérica ha sido pionera al tomar medidas en este campo. Si la fortificación de alimentos ha tenido un impacto tan grande en la salud de poblaciones de las naciones desarrolladas, su importancia y efecto en el mundo en desarrollo debe ser mayor. Latinoamérica posee las condiciones necesarias para que la fortificación de alimentos se dé con éxito (Dary, 1999).

En los años noventa se renovaron los programas de fortificación de alimentos en Centroamérica. En 1996, los países de la región acordaron establecer normas regionales uniformes para la fortificación de alimentos con diferentes micronutrientes. Al presente, en todos los países más del 80% de harina de trigo se fortifica con hierro, Ácido Fólico y otras vitaminas del complejo B (OPS, 2003). Durante este año, se aumentó el nivel de Ácido Fólico de 0.35 mg/Kg a 1.8 mg/Kg.

Además se desarrolló el Reglamento Técnico Centroamericano de Fortificación de Harina de trigo adoptado por El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua en noviembre del 2002. Un factor decisivo en el éxito de este programa de fortificación es el hecho que en la región se cuenta con un sector productivo convencido y comprometido con éste. En cuanto a la fortificación de harina de maíz, El Salvador y Costa Rica cuentan con una legislación, mientras que Honduras y Nicaragua tienen una propuesta en discusión y Guatemala está en proceso de definir propuestas de reglamento (Román, 2003).

En Costa Rica se fortifica la harina de trigo con Ácido Fólico desde 1997 y la harina de maíz desde 1999, teniendo un gran impacto en la salud pública. Los niveles de fortificación para los diferentes alimentos se muestran en la Tabla # 3.

**Tabla # 3. Alimentos fortificados con Ácido Fólico en Costa Rica**

Alimento	Consumo (g/día)	Fortificación (mg/kg)	Ácido Fólico (ug/día)	DDR (%)
Harina de trigo	60	1.8	108	27
Harina de Maíz	20	1.8	36	3
Leche	220	0.4	88	22
Arroz	114	1.8	205	51
Total			437	109

Ministerio de Salud, Costa Rica 2003

(Chen *et al.*, 2004)

Una prevalencia de deficiencia de Folatos en suero del 25% en mujeres en edad fértil en 1996 disminuyó en un 87% en áreas urbanas dos años después, mientras que en áreas rurales disminuyó un 63% en el mismo periodo (Tabla # 4) (Chen *et al.*, 2004).

**Tabla # 4. Niveles de Folato en suero antes y después de la fortificación en Costa Rica**

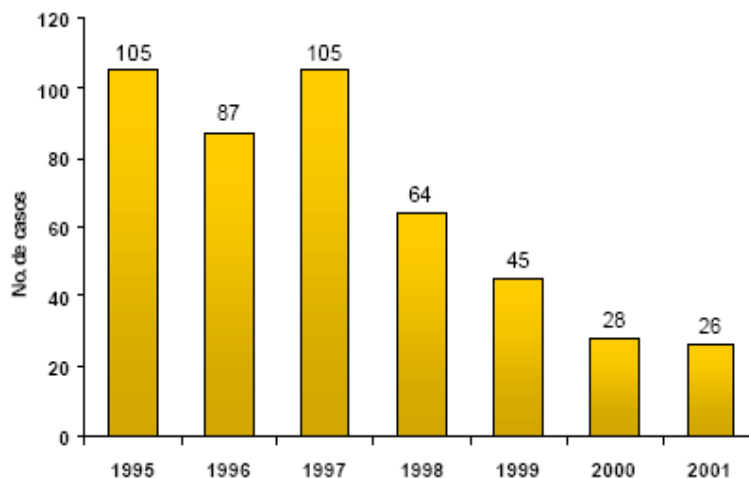
	Antes de la fortificación (1996)		Después de la fortificación (2000)	
	Área metropolitana	Área rural	Área metropolitana	Área rural
<b>Folato en Suero (ng/mL)</b>	10.1 (9.3-10.9)*	9.6 (8.6-10.6)	15.8 (14.7-16.9)	12.5 (10.4-14.6)
<b>Deficiencia de Folatos (%)</b>	19 (13.2-25.0)	31.4 (24.8-38.0)	2.5	11.6 (6.5-17.7)

\* Intervalos de Confianza

(Chen *et al.*, 2004)

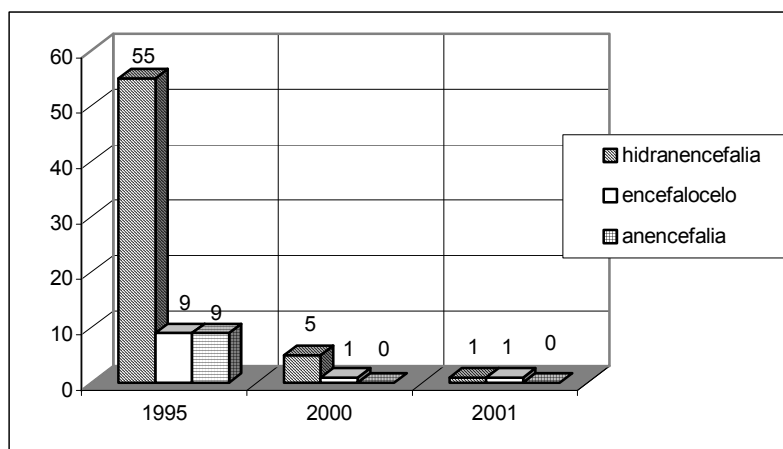
Adicionalmente, una reducción significativa de los defectos del tubo neural a nivel nacional se ha reportado, bajando tasas de 9.7 por 1000 lb durante el periodo 1996-1998 a 6.3 por 1000 lb en el periodo 1999-2000 (Gráficas # 2 y 3) (Chen *et al.*, 2004).

**Gráfica # 2. Casos de DNT en el Hospital Nacional de Niños, Costa Rica**



(Chen *et al.*, 2004)

**Gráfica # 3. Otros tipos de defectos congénitos en el Hospital Nacional de Niños, Costa Rica**



(Chen *et al.*, 2004)

Además se ha reportado una reducción de 74% en el número de DTN al nacer en el Hospital Nacional, resultando de 105 casos tratados en 1995 a 26 casos en 2001 (Tabla # 5) (Chen *et al.*, 2004).

**Tabla # 5. Tasa de defectos del tubo neural por provincia, Costa Rica 1996-2000**

Provincia	1996-1998	1999-2000
San José	12.6	5.3
Alajuela	7.3	6.5
Cartago	9.3	8.6
Heredia	7.7	3.8
Guanacaste	10.5	6.6
Puntarenas	8.3	5.6
Limón	5.9	9.4
COSTA RICA	9.7	6.3

(INCIENSA, Centro de registro de enfermedades congénitas, 2002)

(Chen *et al.*, 2004)

En Chile, empezando en enero de 2000, el Ministerio de Salud legisló a favor de la fortificación de harina de trigo con Ácido Fólico. Esta estrategia tuvo como resultado el aumento de Folato sérico y de glóbulos rojos por una razón de 3.8 y 2.4 respectivamente, en mujeres en edad fértil, un año después de la fortificación. El impacto en la reducción de DTN está en estudio actualmente; resultados preliminares muestran una reducción de 40% en el periodo de pre-fortificación (1999-2000) al periodo post fortificación (2001-junio 2002) (Hertranpf, 2004).

### **C. Estabilidad del Ácido Fólico en alimentos**

La estabilidad de los Folatos naturales y el Ácido Fólico se deben considerar de forma separada. La fortificación con Ácido Fólico se debe considerar en términos de punto de adición (antes, durante o después del procesamiento). El efecto del cocimiento en algunos alimentos fortificados como la pasta debe de profundizarse. Un punto que debe destacarse es el hecho que la estabilidad de esta vitamina ha sido estudiada principalmente en relación al calentamiento convencional y métodos de cocción y no se le ha dado la atención adecuada a otros procesos como congelado, secado, irradiación y calentamiento con microondas (NHMR, 1994).

**1. Alimentos naturales.** Las formas naturales de Folatos son susceptibles a la destrucción por cocimiento o procesamiento resultando en menor cantidad ingerida (Acuña *et al.*, 1998).

La mayoría de Folatos naturales en alimentos son THF, 5-metil THF y 5-formil THF en varias de sus formas de poliglutamato. Los Folatos se consideran una de las vitaminas más inestables y tienen un potencial de destrucción considerable durante el procesamiento y preparación de los

alimentos. Estos Folatos son además destruidos por la oxidación y la luz ultravioleta (Krishnaswamy & Nair, 2001).

El blanqueo de vegetales destruye los Folatos, pero altos niveles de vitamina C parecen conservar los Folatos en varias etapas de la cocción. Se ha determinado que en vegetales y cereales se da una retención de Folatos de entre 20-84 % al hervir, de 54-76 % durante el blanqueo y de 89-98 % durante otros procesos. La retención de Folatos en leche de vaca varía entre 35-100% dependiendo del proceso. También se ha reportado una mayor pérdida de Folatos en vegetales con gran área superficial en relación a la masa. Por otro lado, se debe considerar que los análisis se realizan bajo condiciones ideales por lo que la pérdida puede ser mayor (NHMR, 1994).

Por otro lado, McKillop y sus colaboradores analizaron el efecto de diferentes métodos de cocción en varios alimentos de la dieta típica en el Reino Unido. Los métodos de cocción más usados se determinaron por medio de una encuesta realizada a compradores locales. Los resultados fueron los siguientes:

- Al hervir por periodos típicos resultaron en la retención del 49% de Folatos en la espinaca, 44% en brócoli.
- Cocción al vapor de espinaca y brócoli no representó una pérdida significativa de Folatos.
- El cocimiento de carne a la plancha por tiempo prolongado (19 min.) no representó una pérdida representativa de contenido de Folatos.
- Las papas hervidas no presentaron un cambio significativo en el contenido de Folatos, y no hubo ninguna diferencia entre las papas peladas y las no peladas.

(McKillop *et al.*, 2002)

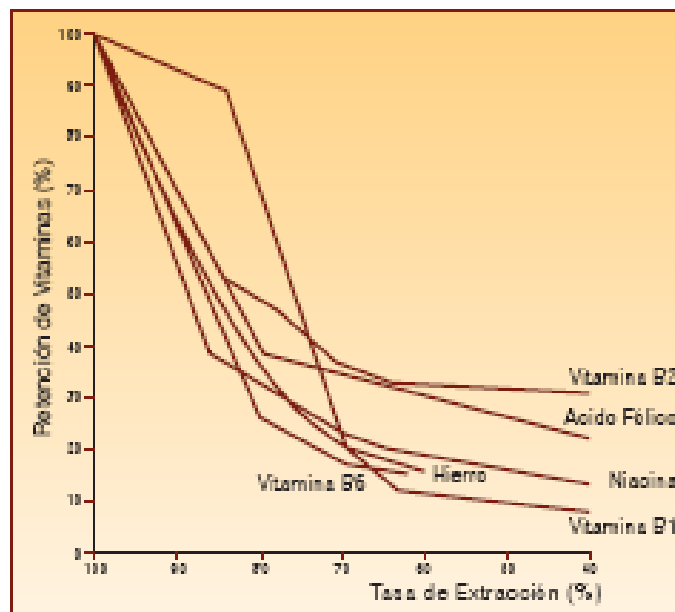
## 2. Alimentos fortificados

a. **Harina de trigo.** El grano molido generalmente contiene una menor cantidad de Folatos que el grano entero. La cantidad de Ácido Fólico en harina blanca es menos de la mitad que en el grano entero (Ranhotra & Ranum, 1994). El Ácido Fólico presente en una pre mezcla de vitaminas se comportó de manera estable después de 6 meses almacenado a temperatura ambiente y también presentó excelente estabilidad al añadirse al harina y ser almacenado durante 6 meses a temperatura ambiente ó 2 meses a 45 °C. Ácido Fólico añadido a niveles de 1 ó 5 ug/g de harina de trigo mostró una pérdida de folacina nativa de 40% después de 12

semanas de almacenamiento, sin ninguna pérdida significativa durante las 52 semanas siguientes (NHMR, 1994).

El procesamiento del trigo entero a harina de trigo generalmente se concentra en molinos. La harina producida se usa para fabricar galletas, pan, pastas y otros productos. En su estado natural, el trigo es una buena fuente de vitaminas B1, B2, niacina, E, hierro y zinc. Debido a que la mayoría de estos nutrientes se concentran en las capas externas del grano de trigo, se pierde una porción significativa durante la molienda (Figura # 4) (OMNI, 1997).

**Gráfica # 4. Cambios en el contenido de micronutrientes del grano de trigo con la molienda**



Adaptado de FAO. 1970. *Wheat in Human Nutrition* y Thomas B. 1968. *Nutritional - physiological views in processing cereal products*. *Vegetables*. 15:360.

(OMNI, 1997)

Las vitaminas son estables en la harina como tal, aún cuando la humedad y la temperatura alta, afectan adversamente a las vitaminas. La mayor pérdida de vitaminas se pierde durante el horneado. A pesar que la temperatura de horneado puede alcanzar hasta 200 °C, la temperatura en el interior del producto es significativamente más baja y más del 70% de las vitaminas permanecen inalterables, en el caso del Ácido Fólico se pierde entre 20-30% durante este proceso. Durante el almacenamiento, se ha comprobado que hay una pérdida mínima de vitaminas. Para harina almacenada a temperatura ambiente con 9% de humedad con 0.66 mg/Kg reportados en la etiqueta, el valor inicial es de 0.82 mg/Kg, después de dos meses se tiene 0.66 mg/kg, después de 4 meses se tienen 0.77 mg/Kg y después de seis meses, 0.66

mg/Kg. Cuando se almacena con el mismo porcentaje de humedad pero a 45 °C se da un cambio a 0.66 mg/Kg después de un mes, 0.57 mg/Kg después de 2 meses y 0.75 mg/Kg después de tres meses (OMNI, 1997).

Varias condiciones de procesamiento termal tienen diferentes efectos en la estabilidad de Folatos en harina (Tabla # 6) (Ranhotra & Ranum, 1994).

**Tabla # 6. Estabilidad de folato en trigo y harina**

Procesamiento	Folato libre (ug/100 g)	Folato total (ug/100 g)
<b>Grano entero</b>		
<b>Crudo</b>	38	46
<b>Autoclaveado</b>	28	28
<b>Explotado</b>	11	13
<b>En hojuelas</b>	24	29
<b>Harina blanca</b>		
<b>Cruda</b>	21	27
<b>Extraída</b>	17	21
<b>Secada</b>	16	20

(Ranhotra & Ranum, 1994)

b. **Productos de panificación.** Los valores de Folatos en pan fabricado con harina blanca es de 25-30 ug por 100 g. la mayoría de Folatos provienen de la harina y la levadura. En un estudio realizado en Estado Unidos, el contenido de Folatos en pan se encontraba en el rango de 20-54 ug por 100 g. Algunos estudios han mostrado buena estabilidad de Folatos en productos de panificación preparados por tres métodos distintos y con varios aditivos añadidos a lo largo del proceso. Se encontró una pérdida de folacina del 8% durante el proceso estándar de panificación. No se observaron diferencias significativas debido a los aditivos, y no se notó un aumento en los Folatos debido a la levadura, posiblemente porque no se realizó una extracción enzimática. En el pan realizado por otros métodos se cuantificó una pérdida de entre 12 y14%. Las harinas analizadas contenían 12 ug/100g de Folatos naturales y 500 ug de Ácido Fólico añadido (Ranhotra & Ranum, 1994).

En otro estudio de productos de panificación realizados con harina fortificada con 42 ug de Ácido Fólico por 100g, la mayoría del Ácido Fólico se retuvo durante el tratamiento. Después del horneado se retuvo entre el 94-105% y después de 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente se retuvo entre 80-102% (Ranhotra & Ranum, 1994).

En galletas se predijo la retención por medio de una regresión lineal usando el tiempo de horneado (7.6-12.7 min.), la temperatura de cocción (334-432 °F), polvo de hornear utilizado (0.3-35 mmol por 100g de harina) y el grosor de la masa (5-10.5 mm) como variables

independientes. Los resultados indican que, en promedio, se retuvo el 85% del Folato de la masa para las galletas control (horneado 9.8 min., a 385 °F, 3.3 mmol de polvo de hornear y grosor de la masa de 7 mm (Ranhotra & Ranum, 1994).

Por otro lado, se ha demostrado una buena retención de Ácido Fólico en galletas saladas, con pérdidas en promedio de 7.2%, con un máximo de 15.3%. En un estudio de micronutrientes en cereales para desayuno no se reportó pérdida de Ácido Fólico durante la vida de anaquel normal (NHMR, 1994).

c. **Ácido Fólico en pastas** . Un análisis en productos de pasta: espagueti, macarrones y fideos, determinó un contenido de Ácido Fólico entre 19-26 ug por 100 g de producto de pasta seca. En cuanto a su estabilidad, un estudio reportó una pérdida de 23% de folacina en pastas no fortificadas: para espaguetis se tuvo una retención del 79%, para fideos del 79% y para macarrones, del 77%. En éste, las pastas se prepararon siguiendo las indicaciones de la etiqueta, sin añadir sal o alguna grasa, llegando a un tiempo de cocción de hasta 14 min. ya que ahí se especificaba que se debía hervir hasta lograr la consistencia deseada. No se analizaron pastas fortificadas, pero se puede suponer una pérdida similar (Ranhotra & Ranum, 1994).

Se necesitan estudios del efecto de la cocción de pastas y fideos fortificados con Ácido Fólico y así ajustar los niveles recomendados para tomar en cuenta las pérdidas de esta vitamina o hacer recomendaciones para evitar su pérdida durante la cocción (NHMR, 1994).

#### D. **Métodos de análisis de Ácido Fólico**

Las principales técnicas para medir Folatos incluyen procedimientos de desarrollo microbiano, métodos de unión proteína – ligando y métodos cromatográficos. Los análisis microbiológicos que emplean *Lactobacillus casei* miden Folatos totales. Los de unión de ligando no pueden aplicarse para muestras que contienen múltiples formas de Folatos, pero son muy comúnmente empleados en clínica. Los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permiten medir cada forma de Folatos si las muestras son purificadas adecuadamente. Varios métodos de espectrometría de masas mediante dilución isotópica se han limitado sobre todo a muestras de sangre. Para los alimentos es de suma importancia utilizar un método normalizado y validado (Bailey *et al.*, 2003).

Los elementos clave ya sea en análisis instrumental o microbiológico son la etapa preparatoria como la extracción de la matriz de la muestra ya que puede subestimarse la concentración de Folatos si la extracción es incompleta. Para evitar esto se ha introducido el uso de un tratamiento

trienzimático que mejora el análisis de Folatos, aunque los resultados son variables (Bailey *et al.*, 2003).

La selección del método de análisis de la vitamina en alimentos depende de los propósitos del análisis. Los Folatos son difíciles de medir en alimentos donde se encuentra naturalmente debido a su variedad de formas químicas y su bajo contenido (Greenfield, 1994).

**1. Métodos microbiológicos de análisis.** Los métodos microbiológicos utilizan la bacteria *Lactobacillus casei* (L. rhamnosus) ATCC 7469, la cual mide todos los Folatos con tres o menos residuos glutámicos o *Enterococcus hirae* ATCC 8043, la cual no responde a derivados metilados. *Pediococcus cerevisiae* es también usada para el análisis de Folatos pero no responde a derivados metilados o PGA puro (Greenfield, 1994). Este método se basa en los requerimientos de nutrientes de estos microorganismos, es decir, que se desarrollan de forma proporcional a la cantidad de Ácido Fólico presente en el medio ya que estos microorganismos son dependientes de esta vitamina, pero no son capaces de fabricarla (Flacklam, 1995).

El género *Lactobacillus* pertenece al grupo de los bacilos Gram positivos, anaerobios no esporoformadores y pueden ser móviles o no, son quimiorganotróficos y sacarolíticos o no. La mayoría son anaeróbicos facultativos aunque alrededor del 20% son anaerobios. Pueden transformarse a Gram negativos bajo condiciones de envejecimiento y altas concentraciones de ácido. Se puede identificar por medio de tinción de Gram, por ser negativo a la prueba de la catalasa y por la obtención de un pico característico de ácido láctico en cromatografía de gases, como producto de metabolismo de la glucosa (Flacklam, 1995).

Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos, que pueden presentarse solos, en pares o en cadenas cortas. Pueden presentar apariencia de coco bacilos, cuando las tinciones se preparan de un medio sólido o forma ovalada cuando se hacen las preparaciones a partir de caldo de tioglicolato. Son anaerobios facultativos y presentan un crecimiento óptimo a 37 °C. No hay presencia de enzimas en su citocromo, pero produce pseudo catalasa. Son homofermentativos, no producen gas y producen ácido láctico como producto final de la fermentación de la glucosa. Pueden encontrarse en tierra, alimentos, agua, animales, aves e insectos. Crecen en agar sangre de carnero 5%, agar BHI (infusión de corazón y cerebro) + sangre de carnero 5% (Facklam, 1995).

*Enterococcus hirae* pertenece al grupo III del género *Enterococcus*. Puede diferenciarse ya que no produce ácido en manitol, sorbitol o en caldos de sorbosa, es positivo para una o ambas

pruebas de rafinosa y sacarosa y negativo para la prueba de movilidad y piruvato. No se considera patógeno (Facklam, 1995).

Este método se desarrolla por medio de la dilución de las muestras después de la extracción del Ácido Fólico y la medición de la turbidez en las muestras después de incubarlas con la bacteria. Las muestras, a las que se les añade agua y una base fuerte son autoclaveadas para romper las partículas, gelatinizar el almidón y desnaturalizar las proteínas para aumentar la actividad y mejor la extracción (Weslwy, 2004).

El Ácido Fólico se extrae usando un sistema trienzimático. La proteasa y amilasa digiera la matriz del alimento, liberando el Ácido Fólico. La conjugasa pancreatica es usada para hidrolizar los poliglutamatos. Los Folatos liberados son extraídos y diluidos en un medio basal que contiene todos los nutrientes requeridos por el microorganismo para desarrollarse, excepto Ácido Fólico, y la turbidez provocada por el crecimiento de la bacteria de las muestras es comparada de manera cuantitativa contra soluciones estándar conocidas. Este método es aplicable para cereales y alimentos a base de cereales que han sido fortificados con Ácido Fólico o que presentan Folatos naturales en niveles entre 5 ug/100g hasta 100% Folato (Weslwy, 2004).

El desarrollo de un método semiautomatizado usando micro placas de 96 pozos y un lector de éstas ha simplificado este ensayo. El lector acepta y lee las micro placas incubadas y provee un sistema de computación o "scan reading" con multimedia (análisis de datos, impresión, disquete, etc.). Este método también se ha aplicado a medir Folatos en plasma (Greenfield, 1994).

## **2. Métodos instrumentales**

a. **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).** Los métodos químicos tienen la ventaja de separa y cuantificar diferentes formas de Folatos. En este método se emplea una fase estacionaria reversa, una fase móvil isocrática, un detector fluorométrico altamente sensible y específico y una post columna de unión oxidativa para derivatización (McKillop, 2002). Entre los principales problemas que presenta este método es la baja concentración de Folatos en alimentos, ya que este método es poco sensible (Osseyi, 2001).

3. **Métodos inmunológicos.** Estos métodos se utilizan mayormente para análisis de Folatos en plasma, tienen un poco aplicación para el análisis de Folatos en alimentos fortificados.

a. **Inmunoensayo ligado a una enzima (Enzime Linked Immunoassay, ELISA ).** El ELISA utilizado para la determinación de Ácido Fólico y otros Folatos es el de tipo indirecto. Se

utiliza un kit comercial que cuenta con una placa preparada con Ácido Fólico fijado a los pozos. A éstas se agrega la muestra y patrones, después se agrega el anticuerpo anti Ácido Fólico. Se incuba para permitir la reacción, en donde se da una competencia entre el Ácido Fólico fijado en la placa y el de la muestra y se lava para eliminar los residuos que no se unieron. Para revelar y mostrar los resultados se agrega el anti-anticuerpo IgG unido a una enzima marcada que se enlaza al Ácido Fólico que se unió a la microplaca. Después de un segundo lavado se agrega un sustrato que reacciona con la enzima marcada, produciendo un color proporcional a la concentración de Ácido Fólico. Se determina la densidad óptica en cada pozo y se calcula la concentración en base a una curva patrón (Finglas, 1994).

Este método puede ser poco específico debido a que para producir los anticuerpos se debe de unir las vitaminas con largas moléculas de proteínas inmunogénicas. También se dificulta la cuantificación de Folatos totales. Se han producido antisueros monoclonales para la determinación de Ácido Fólico y 5-metiltetrahydrofolato específicos para vitaminas libres o ácido pteroilglutámico (PGA) + 5-MTHF unido a proteína y libre o 5-MTHF unido a proteína. Por otro lado, se han desarrollado anticuerpos policlonales específicos para vitamina libre o PGA unido a proteína libre y 5-MTHF unido a proteína. Entre las ventajas que presenta este métodos: automatización y uso de reactivos estables (Finglas, 1994).

**b. Radioinmunoensayo (Radio immuno assay, RIA).** Este método tiene como principio la marcación de Folato con radioisótopos. La muestra se añade a un tubo que contiene estos Folatos. Se realiza un periodo de incubación donde los Folatos son reducidos y estabilizados para ser inmovilizados con una proteína de unión específica de Folato. Aquí se da una competencia por los sitios de unión entre el Folato marcado y el agregado. Se centrifuga para obtener el sedimento y se cuantifica su radiactividad y ésta se interpola en una curva patrón para determinar la concentración de Folatos en la muestra (Finglas, 1994).

Entre la principal desventaja de este método está el manejo de desechos radiactivos, sin embargo se ha demostrado que las concentraciones determinadas por este método son más altas en comparación con otros métodos, incluyendo el microbiológico. Esta diferencia puede deberse a factores que afectan la unión de Folatos y la proteína usada (temperatura, tiempo de incubación, pH). Además, el patrón usado debe cumplir con las siguientes características: debe ser estable, afín a la proteína de unión y ser el mismo tipo de Folato de la muestra. La metodología tienen una mayor aplicación en suero, plasma o eritrocitos (Finglas, 1994).

También se ha desarrollado un método de unión de ligando. En este caso el Ácido Fólico se inmoviliza a la superficie de la placa. La placa se incuba con una enzima marcada con la

proteína de unión al Folato (FBI) de leche de vaca junto con el Folato. El resultado es la unión del FBI a la placa en una cantidad proporcional a la cantidad de Folato presente (Greenfield, 1994).

## E. Validación del método

La definición ISO de validación se refiere a la confirmación por medio de análisis, examen y presentación de evidencia objetiva que los requerimientos particulares para un método específico son cumplidos (Eurachem, 1998).

El método de validación se refiere al proceso por medio del cual se establecen las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden cambiar estas características y a qué nivel. Los métodos deben ser validados cuando es necesario verificar su desempeño y establecer si este es adecuado para resolver un problema analítico particular, por ejemplo para el desarrollo de nuevos métodos, establecimiento de métodos mejorados para incorporarles cambios, cuando el método cambia con el tiempo, demostrar la equivalencia de dos métodos (Eurachem, 1998).

La validación parcial se refiere a la validación de modificaciones hechas a un ensayo bioanalítico validado previamente. Dentro de esta categoría se abarca el cambio en la metodología analítica (como cambio en el sistema de detección), cambio en el procesamiento de las muestras, cambio importante en el rango de concentración, cambio de software o instrumentación de análisis (FDA, 2001).

El proceso por el cual un método bioanalítico es desarrollado, validado y aplicado de rutina se puede dividir en: (1) preparación del material de referencia, (2) desarrollo del método y establecimiento del proceso de ensayo y (3) aplicación del método validado al análisis de rutina y determinación de los criterios para la aceptación de la corrida (FDA, 2001).

1. **Estándar de referencia.** Un estándar de referencia analítica certificado de identidad conocida se debe de preparar a una concentración conocida. Si es posible, el estándar de referencia debe ser idéntico al analito. Generalmente, se pueden utilizar tres tipos de material de referencia:

- Materiales de referencia (como grado USP: United States Pharmacopeia)
- Estándares de referencia comerciales de una casa comercial de reputación.
- Otro material de pureza documentada de un laboratorio analítico u otro establecimiento no comercial.

La fuente y número de lote, fecha de expiración, certificado de análisis y evidencia de la identidad y pureza deben establecerse para cada material de referencia (FDA, 2001).

2. **Desarrollo del método.** Los parámetros fundamentales para la validación de un método son precisión, exactitud, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Las mediciones para cada analito deben validarse. El desarrollo de un método de validación para un método bioanalítica incluye de la determinación de selectividad, exactitud, precisión, recuperación, curva de calibración y estabilidad de las muestras (FDA, 2001).

a. **Selectividad.** Es la habilidad de un método analítico de diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la muestras. Para el análisis de selectividad se utilizan muestras blanco de una matriz apropiada. Cada muestra se analiza para interferencia y la selectividad debe de ser cercano al límite de cuantificación bajo (LLQQ, por sus siglas en inglés) (FDA, 2001).

b. **Exactitud, precisión, recuperación.** La exactitud de un método analítico describe la cercanía de la media de los resultados obtenidos por el método al valor real (concentración) del analito. Ésta se determina por medio de análisis de réplicas que contienen concentraciones conocidas del analito. La media de valor debe estar dentro del 15% del valor real excepto al LLQQ, donde no debe desviarse más del 20%. La desviación de la media del valor real sirve como medida de precisión (FDA, 2001).

La precisión de un método analítico describe la cercanía de medidas individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica de manera repetida a múltiples alícuotas de una misma matriz. Se debe realizar por lo menos 5 medidas por matriz. Se recomienda un mínimo de tres mediciones dentro del rango de concentraciones esperadas. La precisión determinada a cada concentración no debe de exceder el 15 del coeficiente de variación (CV), excepto en el LLQQ que se acepta el 20%. Se divide en precisión entre corridas y entre batch (FDA, 2001).

La recuperación de un analito en un ensayo es la respuesta obtenida de una cantidad de analito añadida y extraída de una matriz, comparada a la respuesta del detector obtenida para la concentración real del analito puro. La recuperación no debe ser necesariamente el 100% pero debe ser consistente, preciso y reproducible (FDA, 2001).

c. **Curva de calibración.** Una curva de calibración es la relación entre la respuesta del instrumento y una concentración conocida de analito. Un número suficiente de

estándares deben de utilizarse para establecer esta relación. El número de estándares utilizados en la curva de calibración debe ser en función de un rango anticipado de valores analíticos y la naturaleza de la relación respuesta / analito (FDA, 2001).

1) **Límite de cuantificación (LLQQ).** La respuesta del analito debe ser por lo menos 5 veces la respuesta comparada con el blanco. La respuesta del analito debe ser identificable, discreta y reproducible con una precisión de 20% y exactitud de 80-120% (FDA, 2001).

2) **Curva de calibración, concentración – respuesta.** Selección del peso y el uso de una ecuación de regresión compleja debe de ser justificable. Se debe cumplir con el 20% de desviación del LLQQ para la concentración nominal y el 15% de desviación de los estándares diferentes del LLQQ para la concentración nominal. Por lo menos seis de los estándares deben de cumplir con estos criterios, incluyendo el LLQQ. Al excluir estándares no debe de cambiar el modelo usado (FDA, 2001).

d. **Estabilidad de las muestras.** La estabilidad de un analito en particular debe aplicarse solamente a las condiciones del análisis y almacenamiento, no debe ser extrapolado a otras condiciones. Las condiciones usadas en experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que se van a manejar en el análisis y manipulación de las muestras. El procedimiento también debe incluir el análisis de la estabilidad del analito en la solución stock. Puede usarse la comparación de concentración con muestras preparadas y almacenadas contra muestras frescas o usar métodos estadísticos basados en los límites de confianza (FDA, 2001).

**3. Cuantificación.** Los ensayos microbiológicos son no lineales, por lo que se recomiendan más puntos en la curva de calibración para definir su comportamiento, por lo que se recomienda un mínimo de 6 estándares en duplicado. La relación concentración – respuesta generalmente responde a la relación del modelo logístico de parámetro 4 ó 5. Se recomienda establecer la recuperación y usarla en determinar los resultados (FDA, 2001). Para los criterios de aceptación se recomienda:

- Por lo menos el 67% (4 de 6) de los controles deben de estar dentro del 15% del respectivo valor nominal.
- El 33% de las muestras control (no todas las réplicas a la misma concentración) pueden estar fuera del 15% del valor nominal.
- En cualquier situación donde se acepten parámetros más amplios, se debe de justificar apropiadamente.

(FDA, 2001)

## XII. OBJETIVOS

### A. Generales

1. Realizar la adaptación y validación de un método microbiológico en micro placa de 96 pozos para análisis de Ácido Fólico utilizando la bacteria *Enterococcus hirae* ATCC 8043.
2. Realizar un análisis de la estabilidad de Ácido Fólico en pastas alimenticias comerciales a diferentes tiempos de cocción.

### B. Específicos

1. Adaptar y validar el ensayo microbiológico para la determinación de Ácido Fólico usando muestras de harina, pasta alimenticia y galleta fortificada.
2. Implementar el control de calidad en la metodología desarrollada y validada para la determinación de Ácido Fólico en micro placa de 96 pozos.
3. Determinar la estabilidad del estándar de Ácido Fólico durante el proceso de validación de la metodología de determinación de Ácido Fólico en micro placa de 96 pozos.
4. Determinar la estabilidad de las muestras preparadas para el análisis durante el proceso de validación de la metodología de determinación de Ácido Fólico en micro placa de 96 pozos.
5. Analizar la estabilidad de Ácido Fólico en pastas alimenticias comerciales fortificadas durante el proceso de cocción a tres tiempos diferentes: el tiempo de cocción establecido en la etiqueta, 5 y 10 minutos más.

### **XIII. HIPÓTESIS**

Es posible realizar la cuantificación de Ácido Fólico presente en una muestra de harina de trigo, galleta y pasta alimenticia fortificadas por medio del análisis microbiológico en micro placa de 96 pozos utilizando la bacteria *Enterococcus hirae* ATCC 8043 y además realizar un análisis de la estabilidad de esta vitamina en pastas fortificadas cocidas por medio de este método.

## XIV. DISEÑO EXPERIMENTAL

### A. Materiales y métodos

#### 1. Materiales

a. **Material de referencia.** Se utilizaron materiales de referencia proveídos por la Asociación Americana de Químicos de Cereales (American Association of Cereal Chemists, AACC). En la Tabla # 7 se presenta su descripción.

**Tabla # 7. Descripción del material de referencia utilizado para la validación del método de determinación de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos**

Material	Contenido de Ácido Fólico (mg / 100 g)
Vitamin / Mineral Proficiency (VMP) –1 (2005)	0.734 ± 0.094
Vitamin / Mineral Proficiency (VMP) –5 (2004)	0.680 ± 0.174

El material certificado VMP es utilizado en el programa de control de calidad de la AACC como muestra de chequeo (Check Sample). Es una muestra a base de cereal que se analiza de manera bimensual, numerando cada muestra de 1-6 para cada año. El material de referencia VMA es una muestra fortificada a base de cereales lista para consumir usado como estándar de calidad. El número de éste representa el lote.

b. **Estándar de Ácido Fólico.** Se utilizó un estándar de Ácido Fólico certificado por la United States Pharmacopeia (grado USP). Se secó en un crisol de porcelana aproximadamente 1 g del patrón en un horno a 100°C -110°C por 4 horas.

c. **Muestras analizadas.** Se analizaron tres muestras: harina de trigo (1.8 mg de Ácido Fólico /Kg), pastas alimenticias fortificadas y no fortificadas con Ácido Fólico y galleta fortificada. La harina de trigo no fortificada fue proporcionada por EMCECO. Las galletas preparadas con harina sin Ácido Fólico y las galletas fortificadas fueron proporcionadas por Superpan.

Se analizaron pastas alimenticias comerciales crudas y cocidas, con las siguientes características:

**Tabla # 8. Descripción de la muestra de pasta alimenticia no fortificada**

Marca	Ingredientes	Tipo de pasta	Fabricante	Lugar de Origen
INA	Semolina de trigo durum y agua	Espagueti	Industria Nacional Alimenticia S.A.	Guatemala

**Tabla # 9. Descripción de las muestras de pasta alimenticia fortificada**

Marca	Ingredientes	Tipo de pasta	Fabricante	Contenido de Ácido Fólico (% de IDR)*	Lugar de Origen
La Moderna	Semolina de trigo durum y agua	Espagueti	Productos Alimenticios "La Moderna" S.A. de C.V.	58 % en cada 50 g de pasta	México
Sabemas	Semolina de trigo durum y agua	Espagueti	Roma Prince S. A.	30% por cada 50 g de pasta	Costa Rica

\*Ingesta Diaria Recomendada

## 2. Procedimiento

### a. Preparación del inóculo de trabajo

Se tomaron varias asadas del cultivo de *Enterococcus hirae* ATCC 8043 del cultivo de mantenimiento. Posteriormente se inoculó asépticamente en un tubo con caldo para la preparación de inóculos para el ensayo microbiológico de vitaminas (véase Anexo E) y se incubó 16-18 hrs. a 35-37 °C.

Se centrifugó a 2500 rpm y se resuspendió con 10 mL de solución salina isotónica estéril. Este proceso se repitió dos veces más. Por último, se suspendió en 10 mL de la solución salina isotónica estéril y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Al momento de inocular el medio, éste debe estar a temperatura ambiente.

**b. Análisis de Ácido Fólico en las muestras.** En cada corrida se incluyeron blancos reactivos (medio de cultivo inoculado y medio de cultivo sin inocular), blancos muestra con estándar interno (material de referencia), curva de calibración (7 puntos) y cantidad de muestras que se proyectó se trabajará de rutina. Pueden trabajarse hasta 9 muestras en una corrida.

Con base en la concentración de Ácido Fólico presente en la muestra se determinó la cantidad de ésta que se debe pesar. Para esto se determinó la concentración de Ácido Fólico en la muestra y se convirtió a ng/g.

Se tomó como base el peso de 5 g de muestra y un Volumen 1 ( $V_1$ ) de 200 mL. (volumen de aforo). A partir de ésta se calcularon las diluciones necesarias para llegar a la concentración de trabajo de 30 ng/mL. La Tabla # 10 resume este proceso.



Se agregaron 100 uL de agua destilada tratada con carbón activado estéril a todos los pozos. Posteriormente, se agregaron 100 uL de medio inoculado y medio sin inocular (blancos) en los pozos A1 a F1 para los blancos no inoculados y de G1 a L1 para los blancos inoculados.

Se agregaron 100 uL de solución patrón y muestras en triplicado en los pozos del A2 al L2.

Se realizan diluciones seriadas tomando 100 uL de estos pozos y depositándolos en los pozos del A3 al L3 donde se mezclan y se toman otros 100 uL despostándolos en los pozos siguientes, hasta llegar a A8 – L8 de donde se toman 100 uL y se descartan. Se agregaron 100 uL de medio inoculado a todos los pozos.

Después del tiempo de incubación establecido, se leyeron los resultados en el lector de micro placas a 650 nm y con base a la curva de calibración realizada se determinó la concentración de Ácido Fólico en la muestra.

1) **Cálculo de la concentración de Ácido Fólico en las muestras.** La concentración de las muestras se calculó utilizando la siguiente relación:

$$\text{Ácido Fólico (mg/100 g)} = (\text{CV3} / \text{V2}) \text{ ng/mL} * 1\text{ug}/1000 \text{ ng} * 1 \text{ mg}/1000 \text{ ug} * (\text{V1} / \text{p}) * (100) * (\text{R}/100) \text{ (1)}$$

Donde:

- **C** = concentración de Ácido Fólico calculada por el lector de microplacas a 650 nm
- **V1**= volumen de aforo inicial (volumen 1)
- **V2**= volumen de alícuota (volumen 2)
- **V3**= volumen de aforo final (volumen 3)
- **R** = porcentaje de recuperación
- **P** = cantidad de muestra (g o mL)

### 3. Desarrollo del método

a. **Proceso de extracción.** Para optimizar el proceso de extracción se introdujo una digestión enzimática al proceso oficial. Se probaron diferentes cantidades de una solución de pancreatina a diferentes concentraciones:

**Tabla # 11. Prueba de extracción enzimática con pancreatina introducida al método de análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos**

Concentración de enzima	mL agregados a la muestra	Observaciones
5%	5	Añadido antes de la extracción básica
10%	5	
10%	10	
10%	10 mL	Añadida después de la extracción básica

Además, se probó el uso de amilasa añadida después de la extracción básica. Se utilizó una solución al 15% y se agregaron 10 mL a cada muestra. Para lograr una mejor clarificación de la muestra, se aumentaron de 2500 a 3000 las revoluciones por minuto a las que se centrifugaron las muestras y se aumentó el tiempo a 15 min.

Por otro lado, se probó la extracción utilizando buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.8. Para esto se agregaron 20 mL de buffer de fosfatos a la muestra y se agregaron 30 mL de agua destilada, después de esterilizar en autoclave por 15 min. a 121 °C e incubar con amilasa se agregaron 10 mL más de buffer y se aforó a 100 mL.

b. **Preparación de inóculo por lote y determinación de la dilución del inóculo.** Para preparar el inóculo por lote, se probaron diferentes diluciones, como se muestra en la Tabla # 12:

**Tabla # 12. Diluciones probadas para preparación de inóculo por lote**

mL de suspensión final	mL de glicerol al 15 % en solución salina	mL agregado por cada 25 mL de medio	
2	150	2 5 10	15 20
5	5	0.150 0.300	0.600
5	10	0.225 0.450	0.900
3	5	0.250 0.375	0.500
-	10	0.025 0.075 0.150	0.300 0.600 1.200

Para determinar la dilución óptima de inóculo en el medio de cultivo se probaron varias relaciones, hasta determinar la que se obtuvo el valor del blanco inoculado más bajo. Las diluciones probadas fueron de 6, 3, 1 y 0.5uL de inóculo por cada mL de medio.

c. **Determinación del tiempo de incubación.** Al iniciar el desarrollo del método se determinó este tiempo de la siguiente manera:

Se prepararon 5 placas, una para cada uno de los tiempos de incubación que se va a leer. Se determinó la densidad óptica en las microplacas incubadas a las 16, 18, 20, 22 y 24 hrs. Estas placas se prepararon como se especificó anteriormente. Se analizó en cada placa el estándar de 50 ng/mL.

El tiempo de incubación óptimo se estableció cuando el cambio de densidad óptica entre las lecturas a diferentes tiempos no aumentaba significativamente. Para establecer esto se calculó el promedio de densidad óptica para el estándar para cada dilución y se calculó un promedio con lo que realizó una gráfica de variación de OD en función del tiempo.

#### 4. Validación del método

El procedimiento de validación y análisis estadístico se realizó con base en lo establecido en la guía *"The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory guide to Method Validation and Related Topics"* de Eurachem, complementado con la guía de la FDA *"Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation"*.

**a. Recuperación.** Se analizaron tres muestras de referencia. Se realizaron 10 repeticiones para cada muestra. Para determinar la recuperación del analito se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación \%} = (C1) / (C2 * 100) \quad (2)$$

Donde:

- **C1** es la concentración de Ácido Fólico determinada en la muestra
- **C2** es la concentración conocida de la muestra (valor dado).

Para cada muestra se calculó la media, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) utilizando el programa de análisis de datos "Analysis Toolpack" de la hoja electrónica de Excel. Para determinar el porcentaje de recuperación se realizó un promedio de porcentaje obtenido para cada muestra. Para el cálculo de coeficiente de variación se utilizó la fórmula:

$$\text{Coeficiente de Variación (CV)} = (\text{Desviación Estandar} / \text{media}) * 100 \quad (3)$$

#### b. Parámetros de la curva patrón

**a. Límite de detección.** Se calculó como el valor promedio del blanco + 3 desviaciones estándar. Para esto se promedió el valor de todos los blancos inoculados que se

obtuvieron a lo largo del proceso de validación y se calculo la desviación estándar y coeficiente de variación utilizando la fórmula (3).

**b. Límite de cuantificación.** Se determinó como el valor más bajo de detección de la curva de calibración.

**c. Rango de trabajo.** Se analizaron estándares de Ácido Fólico a varias concentraciones: 1, 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150 y 200 ng/mL y se realizó una gráfica de respuesta en función de la concentración. Se examinó de forma visual para determinar el rango donde se adapta a la curva. El límite alto y bajo del rango de trabajo se determinó con base a la curva de calibración obtenida después de establecer la concentración de trabajo. Además, se obtuvieron los valores de  $R^2$  para determinar si la curva seleccionada se adapta de forma apropiada.

**d. Precisión y exactitud.** Se calculó para cada una de las muestras analizadas. Se realizaron 6 repeticiones en tres días diferentes. Con base en esto se calculó la concentración de analito en la muestra y se comparó con los valores aceptados y reportados para este material. Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación utilizando la fórmula (3). Es aceptado el valor si esta dentro del rango de  $\pm 15\%$  del coeficiente de variación.

**e. Repetibilidad.** Se analizaron estándares, material de referencia y muestras fortificadas dentro del rango de trabajo, con el mismo analista, mismo equipo de laboratorio en un tiempo corto. Se realizaron 6 repeticiones independientes y de éstas se determinó la desviación estándar para cada concentración, esto permite determinar si la diferencia entre los análisis, realizados en duplicado, es significativa.

Además se calculó el valor del límite de repetibilidad utilizando la fórmula:

$$r = (t_{\infty}) * (1.4142) * \sigma_r \quad (4)$$

Donde:

- $t_{\infty}$  = el valor de la t de Student para  $v = \infty$  (para el intervalo de confianza del 95% es de 1.96).
- $\sigma_r$  = la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad.

**f. Estabilidad de los estándares y muestras.** La estabilidad de la solución patrón de Ácido Fólico (100 ug/mL) se midió semanalmente durante el tiempo que duró el análisis, siguiendo el procedimiento:

Se tomaron 10 mL de la solución madre (100 ug/mL) y se aforaron a 100 mL con buffer de fosfato 0.1 M pH 7.0.

Esta solución se midió en un espectrofotómetro a  $Abs_{282}$  y  $Abs_{346}$  en triplicado para cada longitud de onda. El promedio se multiplicó por 160 para  $Abs_{282}$  y por 613.33 para  $Abs_{346}$ . El promedio de estas dos lecturas indica la concentración real de la solución.

Para el análisis de la estabilidad del Ácido Fólico en las muestras preparadas, se midió la concentración de éstas el día de preparación, un día después, dos días después y una semana después. Se almacenaron en refrigeración a 4 °C en un recipiente ámbar. Para determinar si la variación presentada entre las concentraciones calculadas era significativa se realizó un análisis de varianza para muestras apareadas, utilizando el programa de análisis de datos "Analysis Toolpack" de la hoja electrónica de Excel. Se estableció un límite de confianza de 0.95 (95%).

**g. Análisis de concordancia.** Para comparar el método de análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos contra el método oficial de la AOAC se realizó un análisis de concordancia y un análisis de correlación. Para esto se analizaron 20 muestras de harina de trigo fortificada por los dos métodos. Según cada método se obtuvo la concentración de Ácido Fólico en cada una de las muestras.

El coeficiente de correlación y el coeficiente de concordancia se calcularon utilizando el programa de análisis de datos "Analysis Toolpack" de la hoja electrónica de Excel. El análisis de concordancia se realizó graficando la diferencia entre la concentración de Ácido Fólico calculada por el método de referencia y la concentración calculada por el método de microplaca en función del promedio de las dos concentraciones de Ácido Fólico calculadas por los dos métodos. Se establecieron dos umbrales de aceptación: la media  $\pm$  desviación estándar. Con base a la cantidad de muestras que cumplan con este rango se determinó si los métodos son equivalentes.

## **5. Implementación del método**

**a. Determinación de la estabilidad de Ácido Fólico en pastas fortificadas durante su cocción.** La pasta alimenticia a analizar se preparó de la forma en que se establece en la etiqueta. Se utilizó agua destilada. Esto se detalla a continuación:

Para pasta "La Moderna": En 2.5 L de agua hirviendo se agregó el contenido del paquete (200 g). Se agregó sal y se dejó cocer de 12 a 15 minutos, moviendo ocasionalmente.

Pasta "Sabemas": Se hirvieron 3 L de agua, se agregó sal al gusto y se colocó el contenido del paquete (200 g) en el agua hirviendo y se revolvió hasta que el agua hirvió nuevamente. Se cocinaron durante 8 min.

Se dio un tiempo de cocción 1 que es el indicado en las instrucciones de preparación y un tiempo de cocción 2, que son 10 minutos adicionales a este tiempo, tomando muestras cada 5 minutos. Se tomó un tiempo 3, adicionando 5 minutos al tiempo 2.

Después la pasta escurrió y una porción se lavó con agua destilada y otra porción no. Éstas se maceraron en un mortero y se pesaron 5.000 g de cada una. Solamente se corrigió con el porcentaje de humedad para el tiempo #1 para poder comparar la cantidad de Ácido Fólico calculada después del cocimiento contra la cantidad de Ácido Fólico presente en la pasta seca cruda.

Se calculó el porcentaje de recuperación de Ácido Fólico utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de retención} = (\text{CAF calculada} / \text{CAF reportada}) * 100 \quad (5)$$

Donde:

- **CAF calculada** = la concentración de Ácido Fólico obtenida en el análisis.
- **CAF reportada** = la concentración de Ácido Fólico reportada en la etiqueta.

Para obtener el porcentaje de pérdida se restó este valor del 100%. Este análisis se realizó tres veces en días diferentes y se reporta el promedio obtenido.

## XV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a iniciar el proceso de validación se determinó el método de extracción de Ácido Fólico ya que a nivel de microplaca se requiere trabajar con una concentración mayor que la que se usa en el análisis oficial en tubo. Este paso es de gran importancia, ya que determinará la exactitud del método.

Para el análisis de Ácido Fólico por el método oficial de la AOAC se rompe la matriz por medio de aumento de temperatura y presión esterilizando en autoclave y se realiza una extracción básica. Este tipo de extracción presenta un porcentaje de recuperación del 100 % para alimentos a base de cereales para ese método.

Para la adaptación del método a microplaca se siguió este proceso, realizando unas modificaciones, ya que se debía trabajar con una concentración mayor para que hubiera una buena respuesta, pero también era importante tomar en cuenta la turbidez de la muestra ya que se pesa una mayor cantidad y se debe realizar una menor dilución y podía interferir en la lectura de la densidad óptica o el crecimiento de la bacteria.

Para lograr este propósito se introdujo la digestión enzimática para degradar el alimento y eliminar interferencias, así como mejorar la extracción del Ácido Fólico. En la literatura (DeVries, 2005) se reporta el uso de una mezcla de proteasa, conjugasa y amilasa. En este caso se utilizó pancreatina, que contiene actividad proteasa, lipasa y amilasa. No se consideró el uso de conjugasa ya que esta tiene como principal objetivo liberar los folatos naturales unidos a la matriz hidrolizando los folilpoliglutamatos a folildiglutamatos y este método solamente se utiliza para cuantificar la cantidad de Folato sintético (Ácido Fólico) añadida a los alimentos.

Al utilizar la enzima, no se notó ningún cambio en la turbidez de las muestras por lo que se introdujo el uso de una base posterior al tiempo de incubación, hidróxido de amonio (2+3), que es la que se utiliza en el macrométodo. Sin embargo, no se notó ninguna mejoría y al esterilizar en autoclave las soluciones se tornaban de un color rosado. Debido a esto se descartó el uso de pancreatina y se decidió probar solamente una digestión enzimática con amilasa, ya que el principal componente de los alimentos a base de cereales es el almidón. Además, se cambió de base a hidróxido de sodio, sin embargo los resultados no variaron. Para evitar el cambio de color después de esterilizar en autoclave se decidió realizar la extracción enzimática después de la extracción en autoclave.

**Tabla # 13. Densidad óptica a 650 nm para la muestra de harina de trigo tratada con la enzima alfa-amilasa y no tratada con la enzima**

<b>Dilución</b>	<b>Valores de OD a 650 nm para las muestras tratada con amilasa</b>	<b>Valores de OD a 650 nm para las muestras no tratada con amilasa</b>
<b>1/4</b>	0.5270	0.6264
<b>1/8</b>	0.5406	0.6532
<b>1/16</b>	0.4219	0.5157
<b>1/32</b>	0.3340	0.3509
<b>1/64</b>	0.2350	0.2360
<b>1/128</b>	0.1630	0.1558
<b>1/256</b>	0.1176	0.1116

Para la extracción se probó también el uso de buffer de fosfato pH 7.0 para sustituir la extracción básica, sin embargo, no se notó ningún aumento significativo en el valor de Ácido Fólico obtenido en las diferentes muestras analizadas, por lo que se concluyó que la extracción no se veía mejorada por esta variación y se decidió continuar con el uso de la extracción básica, ya que ésta tiene la ventaja de que el reactivo utilizado ( $\text{NH}_4\text{OH}$  2+3) es estable por tiempo indefinido almacenado a temperatura ambiente, mientras que el buffer de fosfatos se debe de preparar en fresco el día de la extracción.

Para la determinación de la longitud de onda a la que se debe realizar las mediciones no se realizó un barrido ya que el lector de microplacas utilizado solamente cuenta con filtros para longitudes de onda específicas. Según DeVries y colaboradores para el uso del sistema de microplacas de 96 pozos se debe de leer en un rango de 570-630 nm.

El equipo utilizado contaba con filtros de 405, 450, 490, 650 nm, por lo que se probaron los dos últimos. Se realizaron lecturas en estas longitudes de onda para varias muestras y para el blanco inoculado y sin inocular. Para la lectura a 490 nm los blancos llegaban a un valor de hasta 0.550, mientras que las lecturas obtenidas para 650 nm eran alrededor de 0.065 por lo que se escogió esta última ya que los altos valores de los blancos, sobre todo del blanco no inoculado en la longitud de onda de 490 nm indicaba que el medio tiene una alta absorción de luz UV en este punto lo que interfiere con las lecturas de las muestras, ya que el rango de menor absorción del medio está en el rango de 550 – 650 nm.

Para la determinación de la concentración de inóculo utilizada para agregar al medio, se realizaron varias pruebas para disminuir al máximo el valor de los blancos inoculados y obtener los valores más cercanos al blanco sin inocular. Primero, se debe mencionar que, a diferencia del método en tubo, para preparar el inóculo no se realiza ninguna dilución. Se probaron 4 concentraciones distintas, como se indica en la Tabla # 14. Ahí podemos observar que se disminuyó la concentración al mínimo donde la variación de la lectura de los blancos era mínima y se obtenía una respuesta aceptable al leer las muestras ya que si se hubiera reducido más la concentración del inóculo o realizado alguna dilución, al analizar las muestras ya no se hubiera observado un crecimiento adecuado.

**Tabla # 14. Densidad óptica medida a 650 nm para las diferentes diluciones de inóculo**

<b>Dilución de inóculo (<math>\mu</math>L de inóculo / mL de medio)</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>
<b>Densidad óptica promedio a 650 nm</b>	0.2005	0.1418	0.0832	0.0750

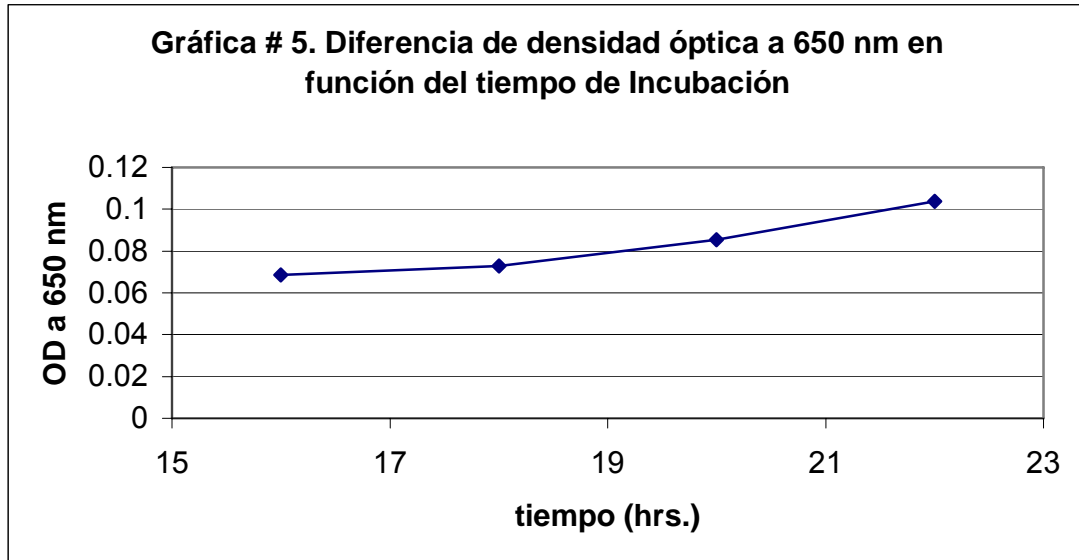
Posteriormente, para obtener resultados reproducibles durante el proceso de validación se preparó un inóculo por lote utilizando glicerol al 15% en solución salina 0.085%, ya que de esta manera se conserva la bacteria por un periodo de hasta 6 meses en refrigeración a 4 °C (según la experiencia del análisis en tubo) con lo que se podría completar el análisis y así poder tener resultados reproducibles y hacer una mejor comparación.

Sin embargo, al preparar el inóculo en esta solución se inhibía el crecimiento. Se probaron 5 diferentes diluciones, pero ninguna produjo crecimiento, incluso después de incubar por más de 24 horas, además de agregar diferentes cantidades de inóculo al medio de hasta 600  $\mu$ L por cada 25 mL de medio por lo que con base en estos resultados se concluyó que el glicerol podría interferir o inhibir el crecimiento bacteriano dada los bajos volúmenes que se agregan, por lo que para la determinación de Ácido Fólico en microplaca no es posible almacenar el inóculo por lote.

Dada esta situación, se trabajó con el inóculo preparado en solución salina estéril y se determinó que éste permanece viable por lo menos un mes, almacenado en refrigeración a 4 °C en un tubo sellado con parafilm ya que durante este tiempo se utilizó obteniendo buenos resultados. De igual manera, se recomienda dispensar en varios viales el inóculo preparado para evitar que el uso continuo lo contamine y afecte los resultados.

Al establecerse la concentración de inóculo y descartar el uso de inóculo por lote se estableció el tiempo de incubación óptimo para las microplacas. Para la bacteria *Enterococcus hirae* ATCC 8043 utilizada para el análisis macrométrico de Ácido Fólico se determinó un tiempo de incubación de 16 hrs. Sin embargo, fue necesario realizar este análisis para ajustarlo a la

microplaca, ya que al reducirse los volúmenes se puede ver afectado el crecimiento de la bacteria, además el rango de concentración utilizado es mayor por lo que se podría dar un crecimiento más rápido.



Se ha establecido que se tiene el tiempo de incubación óptimo cuando al leer de un tiempo a otro no se registra una variación mayor o igual a 3 unidades entre las lecturas. Sin embargo, a pesar que la diferencia entre OD a diferentes tiempos no es superior a 0.12, se notó un incremento conforme se aumentó el tiempo de incubación. Como se puede notar en la Gráfica # 5, la densidad óptica medida cada 2 horas entre 16 y 24 hrs. de incubación no varió de manera significativa, pero fue aumentando por lo que se estableció que el tiempo de incubación es de 22 hrs.

Por otro lado, se notó que después de este periodo de tiempo los valores de los blancos inoculados aumentaron; pasando de 0.078 para la lectura a 16 hrs. de incubación, 0.083 para 18 hrs., 0.086 para 20 hrs., 0.088 para 22 hrs., 0.090 hasta para 24 hrs. Aunque estas diferencias no son significativas, cabe mencionar que no debe superarse el tiempo de incubación sugerido ya que la bacteria puede empezar a crecer de forma no específica en relación a la concentración de Ácido Fólico y presentar una sobreestimación.

Ahora, ya establecidos estos parámetros se procedió con la validación del método. La concentración de la solución de trabajo Ácido Fólico, se determinó con base en los parámetros de la curva patrón, límite de detección y límite de cuantificación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla # 15. Se debe notar que no se tomó en cuenta el valor de los blancos sin

inocular debido a que el valor de los blancos inoculados toma en cuenta este valor y así no se subestima el promedio de los blancos afectando el cálculo de las concentraciones de las muestras.

**Tabla # 15. Determinación de límite de detección, límite de cuantificación y rango de trabajo para el método adaptado a microplaca de 96 pozos**

<b>Densidad óptica (OD) promedio del blanco</b>	0.08221
<b>Desviación estándar (DS)</b>	0.01660
<b>Coefficiente de variación (CV)</b>	20.20
<b>Límite de detección (OD)</b>	0.1320
<b>Concentración de la solución de trabajo (ng/mL)</b>	50
<b>Límite de cuantificación (ng/mL)</b>	0.1953
<b>Rango de trabajo (ng/mL)</b>	12.5 – 0.1953

El límite de detección es de 0.1320. Esto indica que el valor de la señal arriba de 3s sobre el valor del blanco puede deberse al blanco solamente el 1% de las veces, por lo que tiene una alta probabilidad de que se debe a otra cosa, como el analito. Este valor representa la medida más pequeña que puede ser detectada con una incertidumbre aceptable para este procedimiento analítico. En este caso se reporta con una cantidad (densidad óptica) ya que no es posible calcular la concentración por estar este valor fuera del rango de la curva de calibración utilizada.

Para la determinación del límite cuantificación, se aplicó el criterio del manual de la FDA, sin embargo no se cumplió del todo, ya que en esta guía se define que el límite menor de cuantificación debe de ser 5 veces el valor del blanco.

Sin embargo, este valor superaría los 0.400 OD y en este método no se pudo aplicar ya que para obtener este valor como último punto en la curva de calibración se debe de utilizar un estándar de alrededor de 100 ng /mL, lo que implicaría preparar las muestras con una concentración similar a ésta, siendo esto muy complicado debido a la turbidez que presentaba una dilución final muy concentrada. Por lo que se estableció que la concentración de la solución de trabajo sería de 50 ng/mL, ya que de esta forma se obtenía una buena lectura del último punto de la curva de calibración (con un promedio de 0.250). En este parámetro de validación se cumplió con el lineamiento de la guía de Eurchem ya que ahí se establecía que el límite de detección era del blanco + 10s, dando un valor de 0.2482 OD.

Para determinar el límite de cuantificación se utilizó el ultimo punto de la curva de calibración, 0.1953 ng/mL. Las muestras se prepararon con una concentración de 30 ng/mL para evitar la turbidez ya que se probaron diferentes métodos de clarificación como filtración y tratamiento enzimático para lograr llevar la muestra a un concentración igual al estándar, pero no fue posible

ya que en este punto la turbidez interfería con el crecimiento bacteriano y la lectura de la densidad óptica.

La curva de calibración fue determinada con base en los parámetros anteriores, como ya se mencionó, por lo que el rango de trabajo establecido es de 12.5 – 0.1953 ng/mL. Estos valores representan el límite mayor de cuantificación y el límite menor de cuantificación respectivamente. Se trabajó con 7 puntos en la curva, ya que éste es el número de diluciones que permite hacer la microplaca.

Es importante mencionar que el comportamiento de la curva presentó una tendencia no lineal ya que las curvas microbiológicas son inherentemente no lineales, la relación de concentración – respuesta se adapta generalmente a un modelo de parámetro 4 ó 5 (FDA, 2001) y se estableció con base en el coeficiente de correlación dado que la mejor curva que describe esta relación es el análisis de parámetro 4.

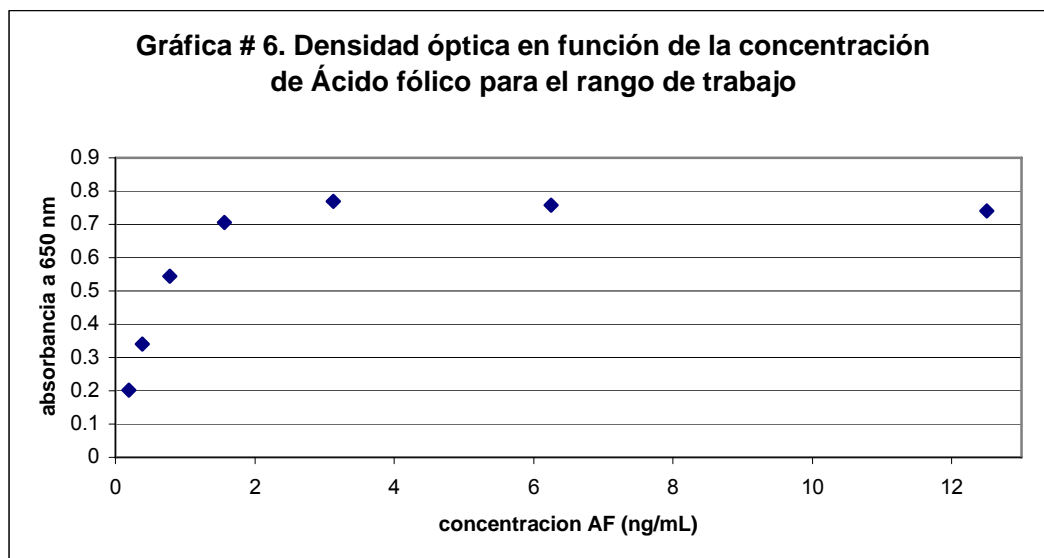
Este tiene una ecuación general:

$$Y = (A - D) / (1+(X/C)^B) + D \quad (6)$$

Donde:

- **X**= ng/mL de Ácido Fólico en la muestra
- **Y**= valor de la densidad óptica obtenida a 650 nm
- **A**= valor de la asíntota superior
- **B**= grado de curvatura (inclinación relativa de la región media)
- **C**= valor de X al 50% de la curva
- **D**= valor en Y de la asíntota inferior

Al establecer esta relación entre la concentración y la respuesta del aparato se demostró que ésta es reproducible ya que durante el tiempo de validación se obtuvo un valor promedio de  $R^2$  de 0.9997, lo que también permite afirmar que el método de análisis escogido es el adecuado. Este valor de  $R^2$  indica que esta curva explica el 99.7% de la variación total en los datos respecto de la media, es decir que explica el 99.7% del fenómeno, mientras que un 0.03% queda fuera. En la Gráfica # 6 se muestra el comportamiento del rango de trabajo escogido. A diferencia del método en tubo en donde se realiza un análisis cuadrático, la adaptación a microplaca no cumple esta característica ya que los valores de  $R^2$  no superaban 0.993 y no era posible realizar los cálculos de la concentración utilizando esta ecuación, porque no se obtenían resultados lógicos.



Para determinar la recuperación del método, se analizó en cada corrida una muestra de referencia a lo largo del proceso de validación. Dependiendo de cómo este material haya sido producido y caracterizado se puede obtener arriba de 100% de recuperación. En este caso se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 102.95% (véase Tabla # 16), sin embargo para propósitos de cálculos se reporta como 100% de recuperación.

**Tabla # 16. Determinación del porcentaje de recuperación de Ácido Fólico en el material de referencia VMP-1**

No. corrida	Concentración de Ácido Fólico (mg/100 g)	% de recuperación
1	0.7582	103.30
2	0.8453	115.16
3	0.7897	107.59
4	0.8224	112.04
5	0.7437	101.32
6	0.6554	89.29
7	0.7102	96.76
8	0.6813	92.82
9	0.8422	114.74
10	0.6718	91.53
<b>Promedio</b>	0.7520	102.45
<b>DS*</b>	0.0677	9.223
<b>CV (%)*</b>	9.0026	9.00 X 10 <sup>-4</sup>

Además, el FDA establece que el valor de la media debe de estar en un rango de  $\pm 15\%$  del valor teórico. Según los valores reportados en la Tabla # 16, el valor promedio de la recuperación cumple con este aspecto. Todo esto indica que el proceso de extracción es adecuado.

\* DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Por otro lado, bajo estas condiciones de reproducibilidad se calculó el valor del límite de reproducibilidad “r”. En este caso para el VMP-1 es de 0.1877.

**Tabla # 17. Variaciones del valor teórico aceptada para la muestra de referencia VMP-1 al evaluar la recuperación del método**

Valor teórico	15% del valor teórico	Valor de la media + 15% del valor teórico	Valor de la media - 15% del valor teórico
mg de Ácido Fólico / 100g			
0.734 ± 0.094	0.1101	0.8441	0.6239

Esta determinación permite un análisis de la precisión y exactitud. La precisión alrededor de la media no debe de exceder el 15% del valor del coeficiente de variación. En este caso el coeficiente de variación es de 9.0026, siendo 1.35039 el 15%, por lo que este aspecto también se cumple ya que el valor de la desviación estándar es de 0.0677.

También se trabajó con el material de referencia VMP-5, teniendo un promedio de concentración de Ácido Fólico de 0.07036 mg por 100g de muestra, con un porcentaje de recuperación de 103.43%, un coeficiente de variación de 9.3257% y una desviación estándar de 0.0656. Este análisis se realizó 6 veces.

Para determinar la selectividad y especificidad del método se hizo un análisis de muestras fortificadas y sin fortificar para la harina de trigo, pastas alimenticias y galletas. Como se muestra en la tabla # 18, al analizar estas muestras fue posible calcular la concentración, esto es, la respuesta obtenida estaba dentro del rango de trabajo. Esto puede deberse a la capacidad de la bacteria para reconocer otros folatos naturales presentes sobre todo en la harina de trigo, los cuales, al tener una estructura similar al Ácido Fólico pueden ser utilizados por la bacteria para desarrollarse. Entre estos folatos se pueden mencionar el ácido tetrahidrofólico, el ácido 5-metiltetrahidrofólico y el ácido 5-formiltetrahidrofólico (Konings, 1999).

**Tabla # 18. Concentración de Ácido Fólico obtenida en el análisis de muestras de alimentos no fortificados**

Alimento analizado	Concentración de Ácido Fólico (mg/Kg)
Harina de trigo	0.740
Pasta alimenticia	0.203
Galleta fortificada	0.157

En las pastas alimenticias y la galleta no fortificadas se observó una concentración menor de Ácido Fólico (folatos). Esto puede deberse a que los folatos naturales son más sensibles a los procesos de fabricación de alimentos por lo que durante la producción de pastas y cocción de las galletas se ven disminuidos.

Sin embargo, estos valores se consideran dentro del rango aceptable de detección para una muestra no fortificada ya que se pueden incluir dentro del rango de variación de las muestras al ser fortificadas; por ejemplo el VMP-1 presenta variación de 0.094 mg de Ácido Fólico / 100 g, valor que es superior a la concentración de folatos determinada en estas muestras.

Ahora, para el análisis de las tres muestras elegidas: harina de trigo, pasta alimenticia y galleta fortificada se determinaron los parámetros de repetibilidad y precisión. Para la precisión y repetibilidad se analizó la concentración de Ácido Fólico en harina de trigo, galleta y pasta en tres días y corridas diferentes para cada matriz y curva de calibración nueva para cada vez. Esto se hizo analizando 6 veces cada muestra.

La repetibilidad da la idea de la variación que se debe esperar cuando el método se lleva a cabo por un solo analista, utilizando el mismo equipo en un tiempo corto. Ésta es generalmente reportada en términos de desviación estándar. La precisión determinada no debe de exceder el 15% del valor del coeficiente variación (FDA, 2001). Los resultados se muestran en las Tablas 19, 20 y 21. En la Tabla # 22 se muestra un resumen de cada alimento. Para los tres alimentos se cumple esta norma. Además se muestra el valor del límite de repetibilidad “r”.

Con base a esto, al repetirse el experimento el resultado no debe de variar más de 0.01361 en relación a la media, mientras que para pastas alimenticias fortificadas la cantidad es de 0.02486 y para galleta fortificada es de 0.10699. Esto indica que el mayor rango de variación lo tiene la galleta fortificada.

**Tabla # 19. Determinación de la concentración de Ácido Fólico en harina de trigo fortificada**

Numero de corrida	1	2	3
<b>Muestra</b>	Concentración de Ácido Fólico (mg / Kg)		
<b>1</b>	1.788	1.856	1.799
<b>2</b>	1.789	1.816	1.735
<b>3</b>	1.745	1.778	1.776
<b>4</b>	1.743	1.819	1.728
<b>5</b>	1.777	1.807	1.784
<b>6</b>	1.75	1.763	1.721
<b>Promedio</b>	1.765	1.865	1.757
<b>DS*</b>	0.0198	0.0300	0.0302
<b>CV*</b>	1.122	1.609	1.719
<b>15% de CV*</b>	0.168	0.241	0.258

\* DV: Desviación estándar; CV: coeficiente de variación

**Tabla #20. Determinación de la concentración de Ácido Fólico en pasta alimenticia fortificada**

Número de corrida	1	2	3
<b>Muestra</b>	Concentración de Ácido Fólico (mg/Kg)		
1	2.299	1.953	2.254
2	2.279	2.29	2.271
3	2.162	2.235	2.238
4	2.335	2.125	2.2
5	2.25	2.208	2.189
6	2.108	2.277	2.175
<b>Promedio</b>	2.388	2.181	2.221
<b>DS*</b>	0.0792	0.115	0.0352
<b>CV*</b>	3.317	5.287	1.285
<b>15% de CV*</b>	0.497	0.793	0.193

**Tabla #21. Determinación de la concentración de Ácido Fólico en galleta fortificada**

Número de Corrida	1	2	3
<b>Muestra</b>	Concentración de Ácido Fólico (mg/ Kg)		
1	3.360	2.760	3.160
2	3.420	2.500	3.260
3	3.670	2.940	2.630
4	3.900	2.730	2.940
5	3.171	2.000	3.050
6	3.870	2.850	2.780
<b>Promedio</b>	3.565	2.630	2.970
<b>DS</b>	0.295	0.342	0.236
<b>CV*</b>	1.983	2.470	1.658
<b>15% de CV*</b>	0.298	0.371	0.249

**Tabla # 22. Promedio de la concentración de Ácido Fólico calculada para los diferentes alimentos fortificados**

	Harina de trigo fortificada	Pasta alimenticia fortificada	Galleta Fortificada
<b>Concentración promedio de Ácido Fólico (mg/Kg)</b>	1.796	2.263	2.80
<b>DS*</b>	0.0491	0.0897	0.2404
<b>CV*</b>	2.734	3.964	7.936
<b>15% CV*</b>	0.411	0.595	0.444
<b>"r"</b>	0.0136	0.0249	0.107

Para el análisis en tubo se estableció que la variación para harina de trigo era del 9.5% y para galleta nutricionalmente mejorada era de 5.2%, mientras que las pastas alimenticias no fueron determinadas. En este caso el porcentaje de variación fue menor, siendo de 2.73 % para harina de trigo, 3.96 % para pasta alimenticia y mayor para galleta fortificada, 7.93%.

Esta variación es mucho menor, contrario a lo que se esperaba, ya que al trabajar con cantidades micrométricas se podía pensar que se aumentaría la variación, sin embargo, pudo haberse reducido debido a que se trabaja con concentraciones mayores, lo que disminuye el

\* DV: Desviación estándar; CV: coeficiente de variación; r: limite de repetibilidad

error sistemático. Mientras que para la galleta estos valores no pueden compararse, ya que se trata de galletas producidas de forma diferente con diferente contenido de Ácido Fólico.

Adicionalmente, dentro del proceso de validación se midió la variación de la concentración de la solución madre de Ácido Fólico (100 µg de AF/mL). Esto se considera importante ya que la concentración del estándar debe ser lo más exacta posible para evitar subestimaciones o sobreestimaciones de la concentración de Ácido Fólico en las muestras.

Según se reportó para el método en tubo, el estándar es estable hasta por 2 meses después de la fecha de preparación, sin embargo durante este tiempo su concentración puede verse afectada, primero, debido al error en el pesado del estándar en polvo, la concentración puede no ser exacta y con el paso del tiempo la exposición a la luz y oxígeno degrada el Ácido Fólico, además de la manipulación durante el análisis.

La Tabla # 23 muestra las concentraciones medidas para los diferentes estándares utilizados a lo largo del proceso. Se debe notar que la última concentración del estándar 1 se midió aproximadamente 3 meses después de su preparación. Fuera de eso, la variación en la concentración del estándar es mínima, siendo más notoria cuando el estándar tiene una concentración inicial mayor, esto debido a que el Ácido Fólico es degradado más rápidamente en mayor cantidad.

Aunque el cambio parezca pequeño, este puede afectar la concentración de Ácido Fólico calculada en la muestra, por lo que es importante monitorear la concentración de la solución madre por lo menos una vez a la semana o cuando se vaya a realizar una corrida y descartarlo después de la fecha de caducidad y así realizar la corrección correspondiente a los resultados reportados y descartar la preparación cuando la concentración de Ácido Fólico ya no sea la adecuada.

**Tabla # 23. Variación de la concentración de la solución madre de Ácido Fólico durante almacenamiento a 4 °C**

<b>Estándar<sup>1</sup></b>	<b>Concentración en µg/mL</b>					
<b>1</b>	100.64	99.06	99.36	98.77	97.48	59.62
<b>2</b>	96.63	96.39	97.64	-	-	-
<b>3</b>	123.85	120.46	116.52	113.47	104.64	-

<sup>1</sup> La determinación de la concentración del estándar se realizó de manera semanal mientras se trabajó con éste, a excepción de la última medición realizada al primer el estándar, la cual se hizo cuando este ya había expirado.

En cuanto a la variación presentada por las muestras preparadas (Tabla # 24), no se notó un cambio significativo en relación a la cuantificación después de un día de almacenamiento en frío, sin embargo, dos días después la concentración ya presenta una variación menor, mientras que una semana después de ser preparada, el Ácido Fólico en la muestra ha sido degradado.

Cabe notar que para la muestra de VMP-1 la concentración mostró una variación mayor, esto puede deberse a que su concentración inicial de Ácido Fólico es mayor y, aunque al final la concentración es igual para todas las muestras, el agregar un volumen menor puede exponer más al analito a la degradación ya que la turbidez es menor, mientras que las otras muestras aún presentaban un color oscuro que protegía al Ácido Fólico de degradación por luz.

Con base en esto se puede afirmar que es posible medir la concentración de Ácido Fólico en una muestra, hasta un día después de su preparación, dependiendo de su concentración inicial, sin embargo, después de este tiempo se recomienda descartarla y realizar la extracción nuevamente.

**Tabla # 24. Variación de la concentración de Ácido Fólico en los alimentos analizados durante el almacenamiento a 4 °C**

	Determinación Día 1	Determinación Día 2	Determinación Día 3
	mg AF / Kg		
<b>Harina de trigo</b>	1.639	1.621	0.452
<b>Pasta alimenticia</b>	2.522	2.460	1.580
<b>Galleta fortificada</b>	3.870	1.369	0.264
<b>VMP-1</b>	7.120	6.580	3.250

Además, se establecieron los parámetros de control de calidad para el método. Primero, la bacteria se debe traspasar semanalmente a un nuevo tubo con medio adecuado, esto para evitar mutaciones que alteren la respuesta de ésta a la concentración de Ácido Fólico. También se debe determinar si la corrida realizada es válida antes de efectuar el análisis, esto por medio de la lectura de los blancos inoculados y blancos sin inocular los cuales son el indicativo que el proceso de esterilización fue exitoso y que durante el proceso no se tuvo contaminación cruzada.

Después del tiempo de incubación, el blanco no inoculado no debe presentar ningún crecimiento, esto es indicativo que el proceso de esterilización fue satisfactorio y no había ningún otro microorganismo interviniendo con el crecimiento de la bacteria.

El blanco inoculado siempre presentó un leve crecimiento dando lectura mayores que el blanco sin inocular, sin embargo la diferencia entre estas no es significativa, por lo que no debe

presentar un crecimiento notorio en estos pozos. Si este blanco tiene una lectura aceptable es indicativo de que no hubo contaminación cruzada con Ácido Fólico.

Para el método en tubo se reporta un máximo de 70% de transmitancia en los blancos inoculados para aceptar la corrida, sin embargo, para el método en microplaca no se reporta ninguna información al respecto por lo que este límite se estableció con base a la experiencia a lo largo del proceso de validación.

El promedio del blanco no inoculado es de 0.075, por lo que si se reporta un valor mayor se debe de descartar la microplaca, mientras que el promedio del blanco inoculado es 0.08221, por lo que la corrida se debe de rechazar cuando el promedio del blanco sea mayor al límite de detección establecido (Tabla # 15).

Por otro lado, la corrida debe ser descartada cuando la curva de calibración no presente el patrón establecido con un  $R^2$  menor a 0.995 ya que esto indica una pobre correlación, dando valores de concentración poco confiables.

También se estableció que puede mejorarse el valor  $R^2$  de la curva suprimiendo hasta el valor de un estándar, ya que no es permitido trabajar con menos de 6 estándares para la curva de calibración dado que se reduce la precisión de los resultados.

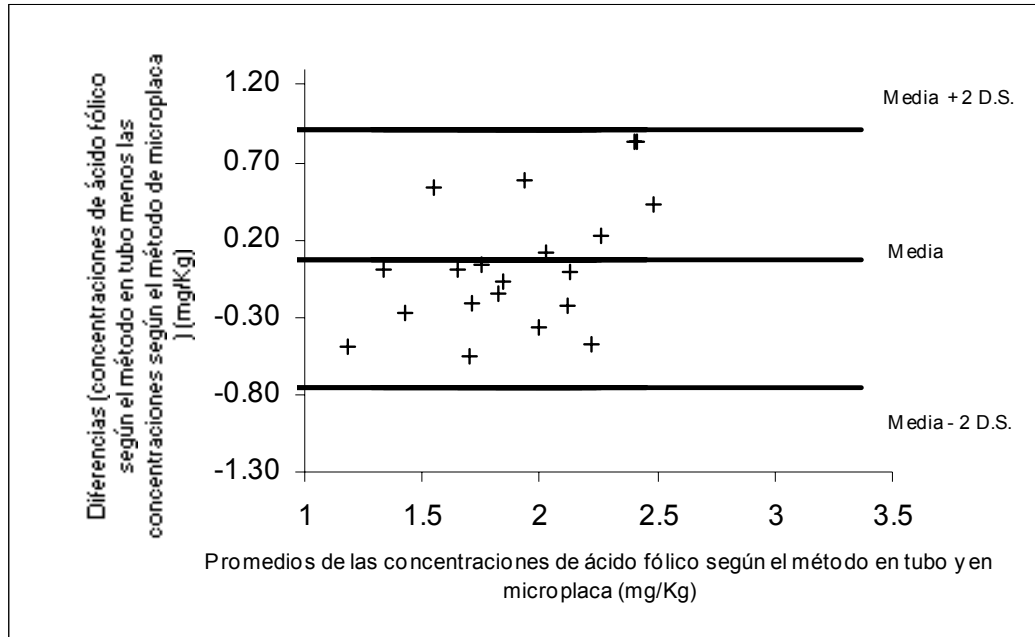
Además, debe notarse que por lo menos las dos últimas diluciones de las muestras no pueden ser analizadas ya que no entran dentro del rango de la curva de calibración debido a que las muestras se preparan con una concentración final de 30 ng/mL a diferencia del estándar que tiene una concentración de 50 ng/mL..

Para terminar con la validación del método se realizó una comparación entre el método de referencia y el método en microplaca recién establecido. Para esto se obtuvo un valor de índice de correlación de 0.98 y un índice de concordancia de 0.97 esto indica que los resultados obtenidos en ambos métodos son comparables ya que el valor obtenido está muy cercano a 1.00 que es el valor ideal.

Además se realizó un análisis gráfico de concordancia (Gráfica # 7), el cual se basa en una tolerancia de  $\pm 2$  desviaciones estándar de variabilidad entre los resultados de concentración de Ácido Fólico en las muestras al comparar un método y otro. Para poder asegurar que son equivalentes todos los resultados deben estar dentro del rango.

En la Gráfica # 7 se puede notar que todos los resultados analizados están dentro del rango de aceptabilidad, por lo que pueden usarse indistintamente uno u otro método para el análisis de Ácido Fólico.

**Gráfica # 7. Análisis de concordancia comparando el método microbiológico de determinación de Ácido Fólico en tubo contra el método microbiológico en microplaca de 96 pozos**



Por último, se determinó la estabilidad de dos pastas alimenticias comerciales a diferentes tiempos de cocción, esto con el fin de calcular la cantidad de Ácido Fólico que es retenida y de esta forma poder sugerir un nivel apropiado de fortificación para este alimento.

Para empezar, se realizó una comparación de la cantidad de Ácido Fólico reportado en la etiqueta de cada pasta analizada contra la cantidad encontrada en el análisis. Además, se calculó el peso seco de la pasta cocida en el primer tiempo de cocción para poder comparar retención durante cocción contra el valor de la pasta cruda.

Estos resultados se muestran en la Tabla # 25. En ella puede verse que el valor reportado en la etiqueta para la pasta alimenticia “La Moderna” no coinciden con el valor promedio calculado en el análisis por lo que debe hacerse un estudio más profundo para determinar la causa y reportar en la etiqueta el valor real de Ácido Fólico.

**Tabla # 25. Comparación de las concentraciones de Ácido Fólico presente en las diferentes pastas comerciales analizadas**

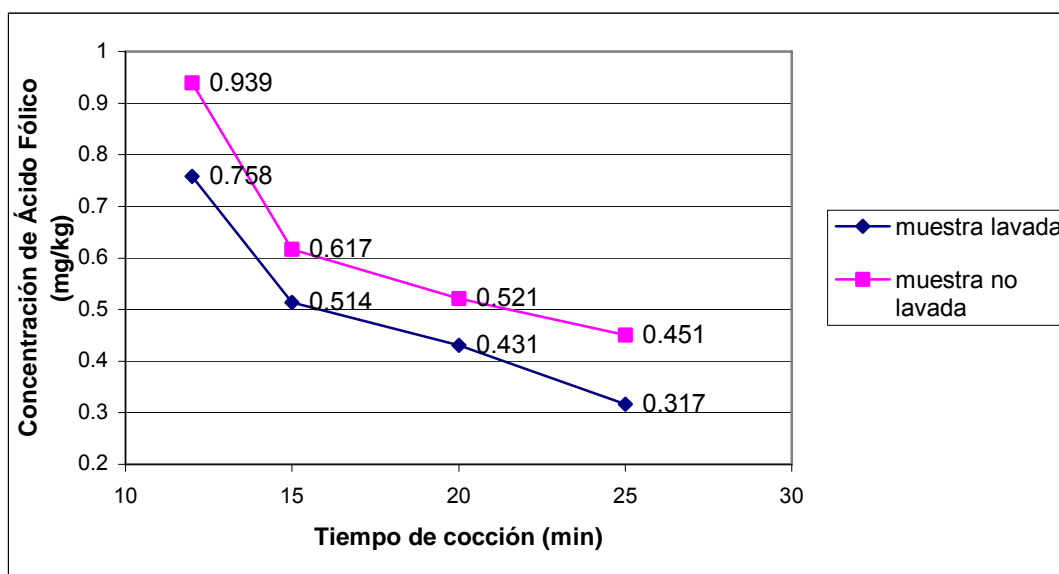
	Concentración de Ácido Fólico (mg/Kg)	
	SABEMAS	LA MODERNA
Reportada en la etiqueta	2.40	4.64
Promedio en pasta cruda	2.79	2.23
Promedio en pasta cocida tiempo 1 lavada / no lavada	0.5871 / 0.7235	0.5403 / 0.7056
Porcentaje de Ácido Fólico perdido lavada / no lavada	78.96 / 74.07	75.77 / 68.36

Como era de esperarse, el Ácido Fólico se fue degradando conforme aumentó el tiempo de cocción. En el caso de las pastas lavadas se detectó una concentración menor de Ácido Fólico, esto también cumple con lo esperado, ya que por ser una vitamina hidrosoluble se disuelve en el agua de cocción y también se elimina al ser lavada.

Estos resultados se muestran en las Gráficas # 7 y 8. Se debe notar que se utilizaron otros tiempos de cocción distintos a los establecidos en la etiqueta ya que las técnicas de cocción pueden variar.

Para la pasta “La Moderna” se nota una variación más pronunciada para la pasta no lavada, mientras que para la pasta lavada los cambios fueron menos marcados. La diferencia entre la pasta lavada y la no lavada es considerable, especialmente en el primer tiempo de cocción.

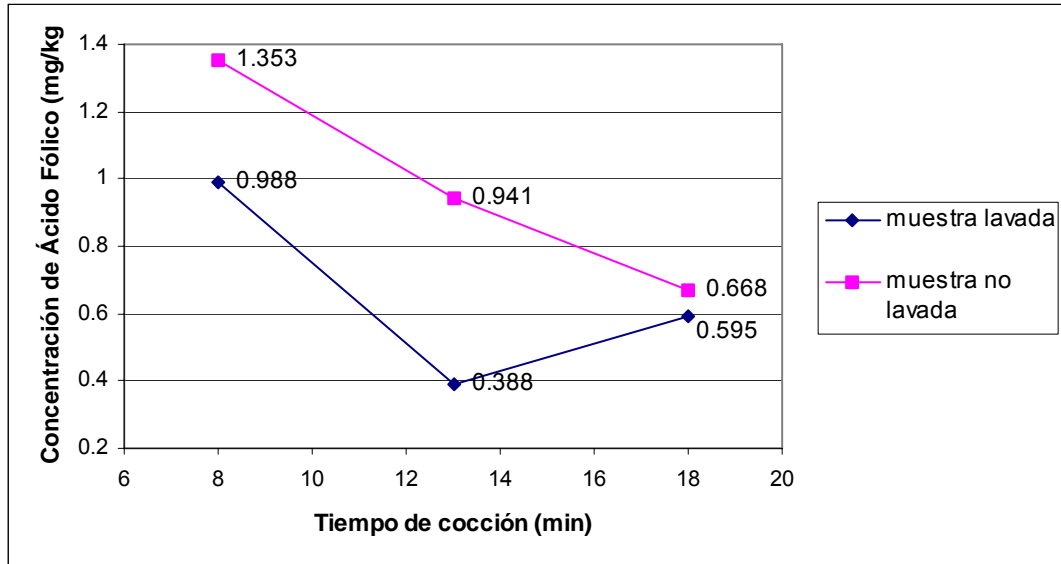
**Gráfica # 8. Concentración de Ácido Fólico en función del tiempo de cocción para la pasta “La Moderna”**



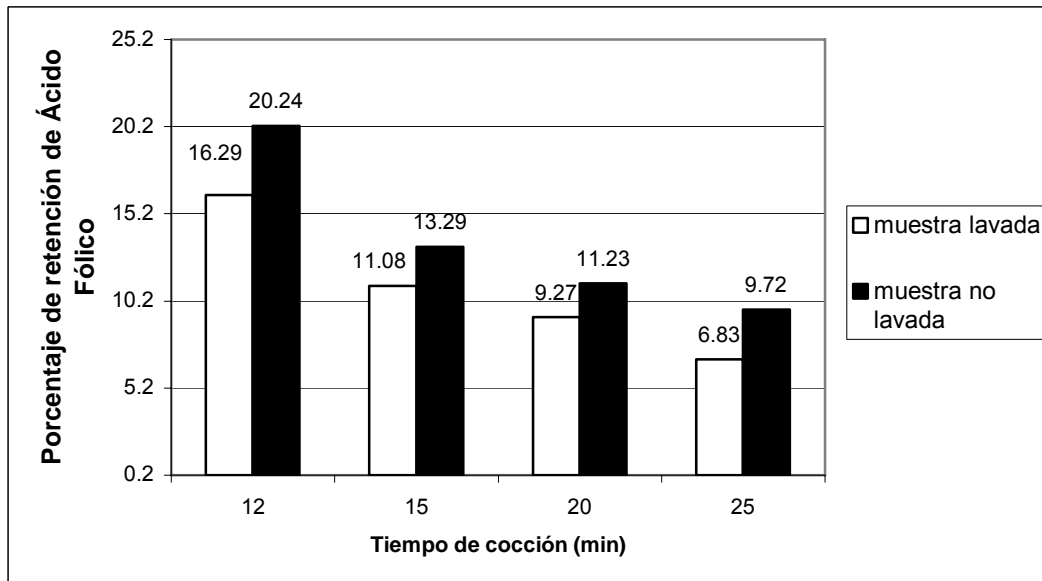
En relación a la pasta lavada y no lavada, se notan cambios similares a los de la pasta anterior. Del tiempo 2 al tiempo 3 para la pasta lavada se nota un leve aumento, esto puede

deberse a que se lavó por más tiempo una que otra, por eso cabe mencionar que el lavado se trató de hacer igual para todas las muestras, pero es una variable que puede afectar los resultados, porque para posteriores experimentos se recomienda buscar un proceso estándar.

**Gráfica # 9. Concentración de Ácido Fólico en función del tiempo de cocción para la pasta "Sabemas"**



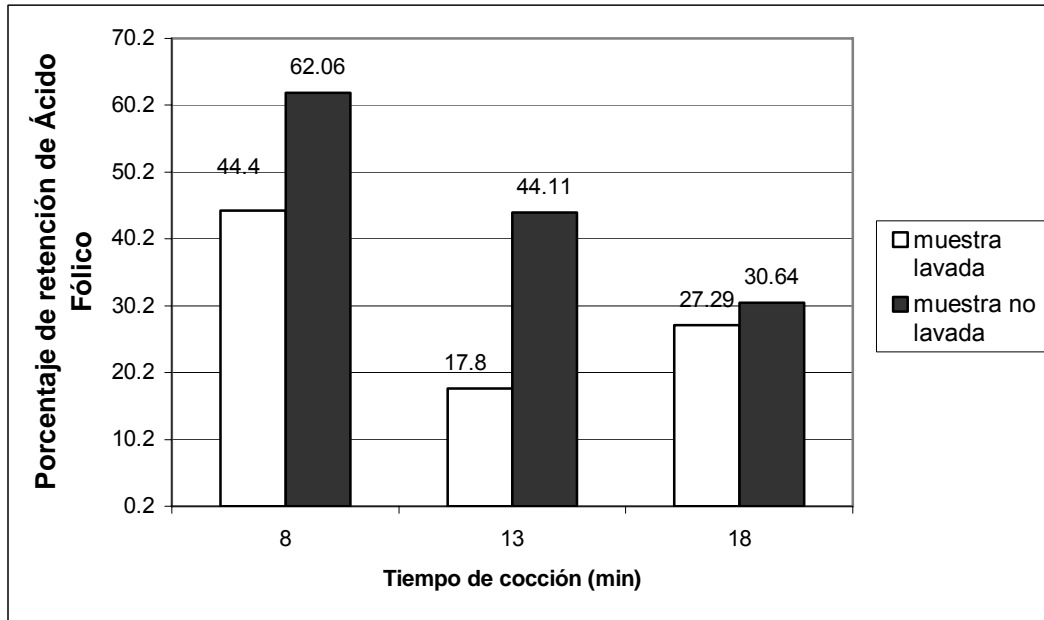
**Gráfica # 10. Porcentaje de retención de Ácido Fólico en función del tiempo de cocción para pasta "La Moderna"**



Por otro lado, se calculó el porcentaje de retención de Ácido Fólico que tuvieron las diferentes pastas a los diferentes tiempos. Estos resultados se presentan en las Gráficas # 10 y 11. Aquí puede verse los porcentajes de pérdida, más en la pasta La Moderna en relación a Sabemas y

son más altos a mayor tiempo de cocción. Esto indica que el Ácido Fólico es degradado durante este proceso y que es necesario ajustar la cantidad añadida de éste a estos alimentos para que se cumpla con la ingesta diaria recomendada.

**Gráfica # 11. Porcentaje de retención de Ácido Fólico en función del tiempo de cocción para pasta "Sabemas"**



Cabe mencionar que las determinaciones se realizaron sin secar las muestras ya que no se contaba con un método, como el secado en frío, que evitara la degradación del Ácido Fólico. No se determinó el porcentaje de humedad después del análisis ya que los datos de concentración de Ácido Fólico son reportados en la forma del alimento en el que se analiza.

## XVI. CONCLUSIONES

1. Se estableció que la concentración de inóculo de *Enterococcus hirae* ATCC 8040 adecuada para el método de análisis microbiológico de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos es de 0.5  $\mu$ L por cada mL de medio. No es posible preparar el inóculo por lote utilizando glicerina al 15% en solución salina al 0.85%.
2. El periodo de incubación ideal para el método de análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos es de 22 hrs. a 37 °C.
3. Para el método de análisis microbiológico de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos se estableció un límite de detección de 0.1320 OD, un límite de cuantificación de 0.1953 ng/mL y un rango de trabajo de 12.5-0.1953 ng/mL. Esto es aplicable para harina de trigo fortificada, galletas y pastas alimenticias fortificadas.
4. La curva de calibración que más se adapta al método de análisis de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos es el parámetro 4.
5. Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 102.45% para alimentos a base de cereales. Esto se reporta como 100% de recuperación.
6. Para el método de análisis microbiológico de Ácido Fólico en microplaca de 96 pozos se obtuvo una variación del 2.73% para harina de trigo fortificada, 3.96% para pasta alimenticia y de 7.94% para galleta fortificada.
7. La densidad óptica promedio de los blancos debe ser igual o menor a 0.1320 para aceptar la corrida.
8. Con base en el análisis de harinas fortificadas, el coeficiente de concordancia entre el análisis de Ácido Fólico por el método microbiológico en tubo comparado con el análisis en microplaca es de 0.97 y el coeficiente de correlación entre estos dos métodos es de 0.98 por lo que los resultados obtenidos en cada uno se consideran equivalentes.
9. En relación a la pasta cruda, la pasta cocida en tiempo 1 (12 min.) tuvo una pérdida de Ácido Fólico de 75.77% y 68.36% para las muestras lavadas y no lavadas respectivamente para la pasta "La Moderna".

10. En relación a la pasta cruda, la pasta cocida en tiempo 1 (8 min.) tuvo una pérdida de Ácido Fólico de 78.96% y 74.96% para las muestras lavadas y no lavadas respectivamente para la pasta "La Moderna".
11. En las pastas alimenticias comerciales fortificados "La Moderna" y "Sabemas", la concentración de Ácido Fólico se degrada de forma directamente proporcional al tiempo de cocción.
12. Para la pasta alimenticia "La Moderna", el porcentaje de pérdida de Ácido Fólico fue de 83.71% después de 12 minutos de cocción, 88.92% después de 15 min. de cocción, 90.73% después de 20 min. de cocción y de 93.17% después de 25 min. de cocción para las muestras lavadas.
13. Para la pasta alimenticia "La Moderna", el porcentaje de pérdida de Ácido Fólico fue de 79.76% después de 12 minutos de cocción, 86.7% después de 15 min. de cocción, 90.28% después de 20 min. de cocción y de 93.17% después de 25 min. de cocción para las muestras no lavadas.
14. Para la pasta alimenticia "Sabemas", el porcentaje de pérdida de Ácido Fólico fue de 55.60% después de 8 minutos de cocción, 82.20% después de 13 min. de cocción, 72.71% después de 18 min. de cocción para las muestras lavadas y de 37.58% , 56.88% y 69.36% para las muestras no lavadas en el mismo tiempo de cocción.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el cambio de inóculo de trabajo después de un mes de uso.
2. Se recomienda el uso de agua destilada tratada con carbón activado para mejorar la calidad del agua destilada ha utilizar y disminuir las interferencias.
3. Se recomienda la verificación de la concentración de la solución madre de Ácido Fólico (100  $\mu\text{g}$  / mL) después de su preparación y cada vez que vaya a utilizarse en un análisis. Éste tiene una vida útil de 2 meses, después de ese tiempo se debe de descartar y prepararlo en fresco.
4. Se recomienda analizar la concentración de Ácido Fólico en las muestras hasta 1 día después de la extracción. Los resultados óptimos se obtienen si el análisis se realiza durante este periodo.
5. Se recomienda analizar y ajustar la cantidad de Ácido Fólico agregado a las pastas comerciales “La Moderna” y “Sabemas” para que después de cocción cumplan con el valor reportado en el etiquetado.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, J., P. Yoon & Erickson, J. *The Prevention of Neural Tube Defects with Folic Acid*. OMS/OPS/CDC. 15 pp. [http://www.paho.org/English/HPP/HPN/MNN/folic\\_acid.pdf](http://www.paho.org/English/HPP/HPN/MNN/folic_acid.pdf)
2. Allen, L. 2003. *B Vitamins: Proposed fortification Levels for Complementary Foods for Young Children*. En *Journal of Nutrition*. Vol 133. 3000s-30007 pp.
3. Allen, L. 2004. *Folate and Vitamin B12: Status in the Americas*. En *Nutrition Reviews*. Vol. 62. No. 6 (II). S29-S33 pp.
4. Bailey, L. & J. Gregory III. 1999. *Folate Metabolism and Requirements*. En *Journal of Nutrition*. Vol. 129. 779-782 pp.
5. Balley, L., S. Moyers & J. Gregory III. 2003. *Folatos*. En *Conocimientos Actuales sobre Nutrición*. 8va. Edición. OPS-ILSI. ILSI Press. 235-247 pp.
6. Betterworth, J. & T. Tamura. 1989. *Folic Acid Safety and Toxicity: A brief Review*. En *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 50. 353-358 pp.
7. Bower, C. 1995. *Folate and Neural Tube Defects*. En *Nutrition Reviews*. Vol. 53. No.9 (II) S33-S38.
8. Brody, T. 1999. *Nutritional Biochemistry*. 2da. Edición. Academic Press. EUA. 1006 pp.
9. DeVries, J., P. Keagy, C. Hudson & J. Rader. 2005. *Microbiological assay-trienzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: collaborative study*. En *Journal of Association of Analytical Chemistry*. 88(1):5-15.
10. Chen, L. & M. Ascencio. 2004. *The Costa Rican Experience: Reduction of Neural Tube Defects Following Food Fortification Programs*. En *Nutrition Reviews*. Vol. 62. No. 6 (II). S40-S43 pp.
11. Choumenkovithc, S., J. Selhub, P. Wilson, j. Rader, J. Rosenberg & P. Jaques. 2002. *Folic Acid Intake for Fortification in the United States Exceeds Predictions*. En *Journal of Nutrition*. Vol. 132. 2792-2798 pp.

12. Cifuentes, G. 2002. *Perfil Epidemiológico de las Anomalías del Tubo Neural en Guatemala, Enero – Diciembre 2000*. USAC. Guatemala.
13. Dakley, G., M.Admas & C. Dickinson. 1996. *More Folic Acid for Everyone, Now*. En Journal of Nutrition. 126.7515-7555 pp.
14. Dary, O. 1998. *Importancia de la Fortificación de Alimentos en el Mundo*. Seminario Internacional de Fortificación de Alimentos. Colombia.
15. Dary, O. 1999. *Fortificación de Alimentos: Factor Esencial para Prevenir la Deficiencia de Micronutrientes en el Mundo Civilizado*. Taller sobre Ciencia, Tecnología y Políticas de Fortificación de Alimentos con Micronutrientes. Colombia.
16. Eigen, E. & G. Shockman. 1963. *The Folic Acid Group*. En Analytical Microbiology. EUA. Academic Press. Kavanagh ed. 431-488 pp.
17. Eurachem. 1998. *The Fitness Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Eurachem Group. Reino Unido. 41 pp. <http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>
18. Facklam, R. & D. Sahm. 1995. *Enterococcus*. En Manual of clinical Microbiology. 6 ed. EUA. AMS Press. 308-314 pp.
19. Facklam, R. 1995. *Nonsporeforming Anaerobic Gram – Positive Bacteria*. En Manual of clinical Microbiology. 6 ed. EUA. AMS Press. 1482 pp.
20. Fleming, A. 2001. *The Role of Folate in the Prevention of Neural Tube Defects: Human and Animal Studies*. En Nutrition Reviews. Vol. 59. No.8. 513-523 pp.
21. Food and Drug Administration (FDA), U.S Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) & Center for Veterinary Medicine. 2001. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. 22 pp. <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>

22. Freire, W., Howson, C. & J. Cordero. 2004. *Recommended Levels of Folic Acid and Vitamin B12 Fortification: A PAHO/MOD/CDC Technical Consultation*. En *Nutrition Reviews*. Vol. 62. No. 6 (II). S44-S48.
23. Greenfield, H. 1995. *Methods of Analysis of Folate in Food*. En *Folate Report of the Expert Panel on Fortification*. National Health and Medical Research Council (NHMRC) Sydney. <http://embryology.med.unsw.edu.au/pdf/NHMRCfolate.pdf>
24. Gregory, F. 2001. *Case Study: Folate Bioavailability*. En *Journal of Nutrition*. 131. 1376S-138S.
25. Guamuch, M. 2003. *Programas de Salud Pública de Fortificación de Alimentos en Centro América*. Notas Técnicas. INCAP. Guatemala. 2 pp
26. Hazra, A. y S. Kumar. 2001. *Folic Acid Revisited*. En *Indian Journal of Pharmacology*. Vol. 33. 322-342 pp.
27. Herbert, V. 1999. *Folic Acid*. En *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9 edición. Lippincot Willian & Wilkinsks. EUA. 1951 pp.
28. Herptrmpf, E. & F. Cortés. 2004. *Folic Acid Fortification of Wheat Flour: Chile*. En *Nutrition Reviews*. Vol. 62. No. 6 (II). S44-S48.
29. Kavanagh, F. 1963. *Vitamins*. En *Analytical Microbiology*. EUA. Academic Press. 411-413 pp.
30. Konings, E. 1999. *A Validated liquid Chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour*. En *Journal of Association of Analytical Chemists*. 82(1):119-27.
31. Krishnaswamy, K. & K. Madhavan. 2001. *Importance of Folate in Human Nutrition* en *British Journal of Nutrition*. Vol 85. suppl. 2. S115-S124 pp.
32. Krumdieck, C. 1991. *Ácido Fólico*. En *Conocimientos Actuales sobre Nutrición*. 6ta. Edición. OPS-ILSI. ILSI Press. 614 pp.

33. Lawrence, J., D. Petitti, M. Watkins, A. Umekubo. 1999. *Trends in Serum folate after Food fortification*. En *The Lancet*. Vol. 354. 915 pp.
34. Liu, S., R. west, E. Randell, L. Longerich, K. O'Connor, H. Scott, M. Crowley, A. Lam, V. Prabhakaran & C. McCourt. 2004. *A Comprehensive Evaluation of Food Fortification with Folic Acid for the Primary Prevention of Neural Tube Defects*. En *BMC Pregnancy and ChildBirth*. BioMed Central. 1-10 pp.  
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2393-4-20.pdf>
35. McKillop, D., K. Pentieva, D. Daly, J. Maprtlin, J. Hughes, J. Strain, J. Scott & H. McNulty. 2002. *The Effect of Different Cooking Methods on Folate Retention in Various Foods that are among the Major Contributors to Folate Intake in the UK diet*. En *British Journal of Nutrition*. Vol. 88, 681-688 pp.
36. Mills, J.: I. Von Kohorn, M. Contey, J. Zeller, C. Cox, R. Williamson & D. Dufor. 2003. *Low Vitamin B-12 Concentration in Patients Without anemia: The Effect of Folic Acid Fortification of the Grain*. En *American Journal of clinical Nutrition* vol. 77. 1474-1477 pp.
37. National Health and Medical Research Council. 1995. *Folate Report of the Expert Panel on Fortification*. Sydney. <http://embryology.med.unsw.edu.au/pdf/NHMRCfolate.pdf>
38. Navarro, D. & J. Myung. 2004. *Model Evaluation and Selection*. Department of Psychology, Ohio State University. EUA.  
<http://www.psychology.adelaide.edu.au/members/staff/danielnavarro/ebs.pdf>
39. OMNI, Roche, USAID. 1997. *Fortification Basics: Harina de Trigo*.  
<http://www.sightandlife.org/ffbasics/TRIGO.PDF>
40. OMNI, Roche, USAID. 1997. *Fortification Basics: Stability*.  
<http://www.micronutrient.org/idpas/pdf/1154FortBasicStability.pdf>
41. OPS, OMS, CDC, MOD, UNICEF, INTA. 2003. *Fortificación de Harinas con Hierro, ácido fólico y vitamina B12*. Informe de la Reunión Regional. Chile.  
[http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/NU/CHI03\\_InformeFinal.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/NU/CHI03_InformeFinal.pdf)

42. Osseyi, E., R. Wehling & J. Albrecht. 2001. *HPLC Determination of Stability and Distribution of Added Folic Acid and Some Endogenous Food during Breadmaking*. En *Cereal Chemist*. Vol. 78. No. 4. 375-378 pp.
43. Ranhotra, G. & P. Ranum. 1994. *Adding Folic Acid to Cereal Grain products*. En *GIB Technical Bulletin*. Vol. XVI, 8. 1-8 pp.
44. Ray, J. 2004. *Folic Acid Fortification in Canada*. En *Nutrition Reviews*. Vol. 62. No. 6 (II). S35-S43 pp.
45. Refsum, H. 2001. *Folate, vitamin B-12 and Homocysteine in relation to /birth Defects and pregnancy Outcome*. En *British Journal of Nutrition*. Vol 85. S109-S113 pp.
46. Román, A. 2003. *Programa de Fortificación de Harina de Trigo en Centroamérica*. INCAP/OPS. [http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/NU/CHI03\\_ARoman.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/NU/CHI03_ARoman.pdf)
47. Stokstad, E. & S. Thenen. 1963. *Chemical and Biochemical reactions of Folic Acid*. En *Analytical Microbiology*. EUA. Academic Press. Kavanagh ed. 387-405 pp.
48. Stover, P. 2004. *Physiology of Folate and Vitamin B-12 in Health and Disease*. En *Nutrition Reviews*. Vol. 62. No. 6 (II). S3-S33 pp.
49. Wesley, A. & P. Ranum, eds. 2004. *Fortification Handbook; Vitamins and Mineral Fortification of Wheat Flour and Maize Meal*. The Micronutrient Initiative. [http://www.micronutrient.org/resources/publications/Fort\\_handbook.pdf](http://www.micronutrient.org/resources/publications/Fort_handbook.pdf)
50. Valdéz, S. 2005. *Males Congénitos: 67% es de Tubo Neural*. En *Siglo Veintiuno*. Pág. 6.

## X. APÉNDICE

### **Anexo A. Ruta metabólica de los Folatos**

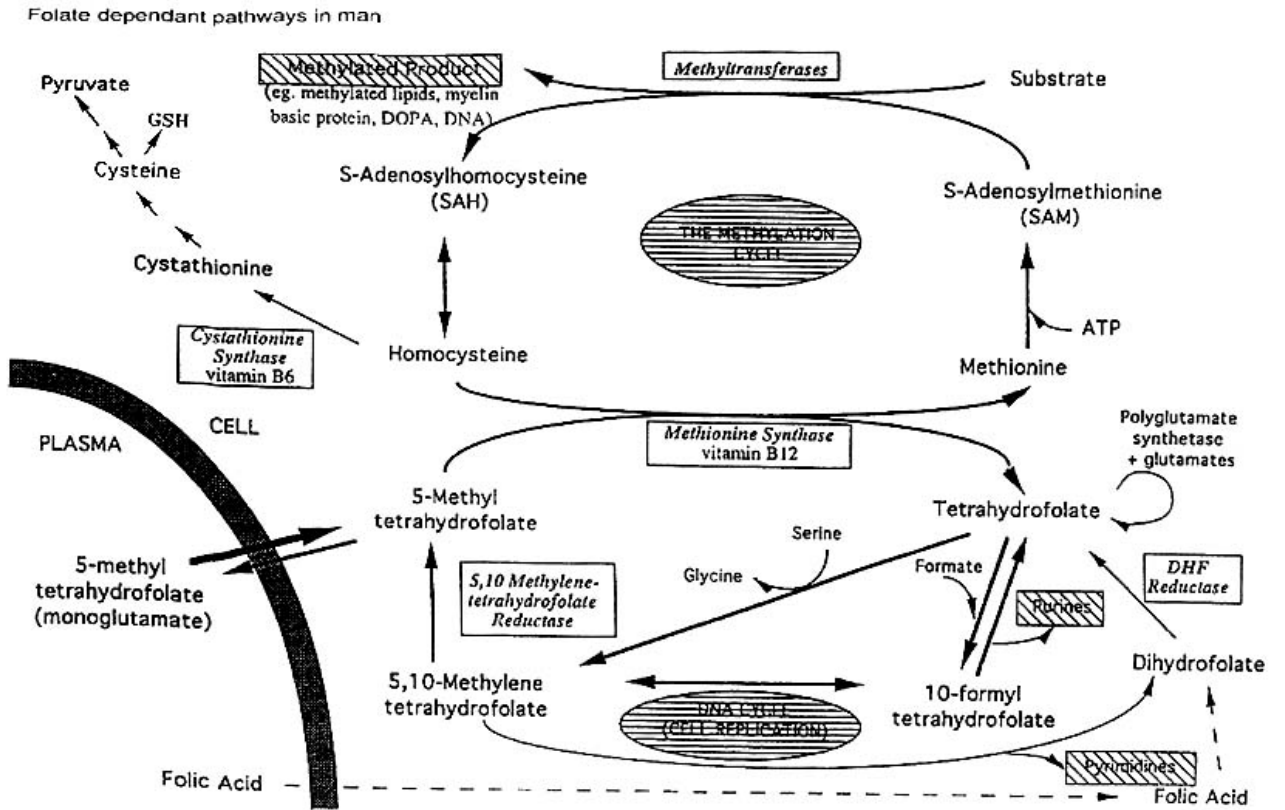
El término de metabolismo de 1 carbono mediado por folatos se refiere al sistema metabólico que comprende varias vías metabólicas interdependientes que usan el tetrahidrofolato (THF) como cofactor para activar químicamente carbonos solos (unidades de 1 carbono) (Stover, 2004).

El metabolismo de los folatos se lleva a cabo en la mitocondria y el citoplasma. En el citoplasma, THF lleva a cabo la síntesis de tres productos: 10-formilTHF, que es requerido para la síntesis del anillo de purina; metilTHF, que es requerido para la conversión de deoxiuridina monofosfato a deoxitimidina monofosfato (dTMP) y 5-metilTHF, requerido para la remetilación de homocisteína a metionina (Stover, 2004).

La metionina puede ser convertida a S-adenosilmetionina (SAM), que sirve como cofactor de varias reacciones de metilación incluyendo la metilación del ADN, proteínas de ARN, neurotransmisores, entre otros. La mayoría de las unidades de carbono en forma de formatos vienen de la mitocondria. El metabolismo 1-C en la mitocondria es requerido para la síntesis de formato, glicina y f-met-tARN (Stover, 2004).

El catabolismo de la serina es la fuente principal de los formatos derivados de la mitocondria en la mayoría de las células, pero la dimetilglicina, sarcosina y glicina pueden ser catabolizadas a formato en el hígado, riñon y astrositos. Las unidades 1-C son también generadas en el citoplasma para el catabolismo de serina, histidina y purina en algunas células (Stover, 2004).

Figura # 2. Diagrama de flujo del metabolismo del folato en el hombre



(Herbert, 1999)

**Anexo B.**  
**Contenido de Folatos en diferentes alimentos**

	µg/100g		µg/100g
<b>Cereales</b>		<b>Vegetales</b>	
Grano de trigo	331	Papas	20-40
Cáscara de trigo	260	Papas fritas	41
Pan completo	57	Frijoles cocidos	22
Harina de trigo completa	39	Lentejas y arvejas	210
Pan de todo el grano	90	Frijoles de soya	54
Pan blanco	30	Ejotes	62
Harina blanca	22	Brócoli crudo	90
Cereales para desayuno (no fortificados)	50	Coles de Bruselas	60
All Bran	190	Repollo crudo	66
Harina de soya	345	Repollo cocido	51
		Coliflor cruda	66
<b>Productos lácteos</b>		Coliflor cocida	51
Queso cambert	102	Lechuga	55
Cheddar	33	Cebolla	17-38
Yogurt bajo en grasa	17	Pimienta	36
Leche de soya	19	Espinaca hervida	90
Leche entera	6	Tomate crudo	110
		Menta fresca	110
<b>Huevos</b>		Apio fresco	170
Huevo completo de gallina	50	Brócoli cocido	64
Yema	130	<b>Nueces</b>	
Omelet	50	Almendras	48
<b>Grupo de cárnicos</b>		Manías	110
Hígado de res frito	320	Pecanas	39
Hígado de pollo frito	500	Pistachos	32
Pateé de hígado	89	Semilla de ajonjolí	97
Riñón cocido	43-89		
<b>Mariscos</b>		<b>Otros</b>	
Salmón enlatado	12	Cerveza	4-9
Cangrejo hervido	20	Cocoa en polvo	38
<b>Frutas</b>			
Blackberries	34		
Uvas	26		
Naranjas	31		
Jugo de naranja	20		
Fresa	20		
Frambuesa	33		
sultanas	27		

(NHMRC, 1995)

## **Anexo C.**

### **Causas de deficiencia de folatos**

- **Ingestión inadecuada**
  - Dieta Pobre (falta de vegetales y frutas y comida fresca, sin procesamiento y poco cocida).
    - Anemia Megaloblástica Nutricional
      - Tropical
      - No tropical
      - Escorbuto
  - Alcoholismo Crónico con o sin cirrosis
  
- **Absorción inadecuada** (afectando la tercera parte superior del intestino, que es el sitio principal de la absorción de Folatos, porque la mayoría se presenta en la forma de polyglutamato).
  - Síndrome de mala absorción
    - Mala absorción específica de folatos
      - Defectos congénitos de falta de conjugasa.
      - Defectos de conjugasa adquiridos.
      - Conjugasas biliares o intestinales inadecuadas.
      - Inhibidores de conjugasa.
    - Síndrome de la vuelta Ciega (Bacterias producen alto nivel de folato elevando su concentración en la sangre)
    - Drogas
      - Anticonvulsivantes
      - Barbitúricos
      - Cicloserina
      - Etanol
      - Metformina
      - Exceso de amino ácidos (glicina o metionina)
      - Colestiramina
      - Salicilazosulfapiridina
    - Enteropatía inducida por el gluten
    - Otro desorden crónico funcional o estructural que afecte al intestino delgado.
      - Esprue tropical
      - Asociado a desórdenes de la piel.

- **Destrucción aumentada**
  - Exceso de suplementos antioxidantes
  
- **Excreción aumentada**
  - Deficiencia de vitamina B12
  - Enfermedad del hígado
  - Diálisis
  - Dermatitis exfoliante crónica
  
- **Requerimiento aumentado**
  - Hematopoyesis aumentada
  - Actividad Metabólica Aumentada
  - Síndrome lesch-Nyhan
  - Drogas (L-Dopa)
  - Infancia
  - Demanda alta
    - Feto
    - Tejidos malignos
    - Leche materna
  
- **Uso inadecuado (bloqueo metabólico)**
  - Antagonistas del Ácido Fólico (inhibidores de dihidrofolato reductasa)
  - Difenilhidantoina y otros anti convulsivantes.
  - Deficiencia de vitamina B12
  - Alcohol
  - Deficiencia de ácido ascórbico
  - Exceso de amino ácido en la dieta (glicina y metionina)
  - Deficiencia enzimática
    - Congénita
      - Forminotrasferasa
      - Dihidrofolato reductasa
      - Metiltetrahidrofolato transmetilasa
      - Otras Enzimas
    - Adquirida
      - Enfermedad del Hígado

(Herbert, 1999)

**Anexo D.****Otras bacterias utilizadas para el análisis de Ácido Fólico****Tabla # 26. Descripción de diferentes bacterias utilizadas en la determinación de Ácido Fólico**

<b>Organismo/folato que utiliza</b>	<b><i>Tetrahymena geleii</i></b>	<b><i>Pediococcus cerevisiae</i></b>
<b>Ácido fólico</b>	0.3 ng	30 mg
<b>Ácido pteroilglutámico</b>	Igual que ácido fólico en una base molar	Inactivo
<b>Ácido pteroilheptaglutámico</b>	Igual que ácido fólico en una base molar	-
<b>Ácido 10-formil folato</b>	-	inactivo
<b>Ácido pterico</b>	inactivo	inactivo
<b>Ácido 5-formiltetrahydropteroilglutámico</b>	-	0.15 ng

**Anexo E.**  
**Composición y preparación de medios de cultivo**

**Tabla # 27. Composición de los medios de cultivo utilizados en el análisis<sup>2</sup>**

Medio de cultivo	marca		Componente	g/L
<b>Caldo para la preparación de inóculos para ensayos microbiológicos de vitaminas</b>	Hi media	M 133	Extracto de levadura	20.00
			Peptona proteasa	5.00
			Sacarosa	10.00
			Fosfato monopotásico	2.00
			Polisorbato-80	0.10
<b>Medio para el mantenimiento de cepas utilizadas en ensayos microbiológicos de vitaminas</b>	Hi - media	M 132	Extracto de levadura	20.00
			Tejido peptídico animal digerido	5.00
			Sacarosa	10.00
			Fosfato monopotásico	2.00
			Polisorbato-80	0.10
			Agar	15.00
<b>Medio de cultivo AOAC para la determinación de ácido fólico</b>	Hi-media	M 126	Un medio completo falto de ácido fólico, conteniendo todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043 preparado de acuerdo a la fórmula AOAC.	

**Medio para el mantenimiento de cepas utilizadas en ensayos microbiológicos de vitaminas.** Pesar 52.1 g de agar y se suspender en 1 L de agua destilada. Hervir de 2-3 minutos. Cuando el medio esté a temperatura ambiente, ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  (25 °C) utilizando NaOH 0.1N. Dispensar 10 mL de medio en tubos de 16-20 mm de diámetro y esterilizar en autoclave a 121-124 °C durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente sobre una superficie adecuada para dejar el medio inclinado. Incubar 24 hrs. a 35-37 °C como control de esterilidad.

**Caldo para la preparación de inóculos utilizadas en ensayos microbiológicos de vitaminas.** Pesar 37.1 g de agar y se suspender en 1 L de agua destilada. Cuando el medio esté a temperatura ambiente, ajustar el pH a  $6.7 \pm 0.2$  (25 °C) utilizando NaOH 0.1N. Dispensar 10 mL de medio en tubos de 16-20 mm de diámetro y esterilizar en autoclave a 121-124 °C durante 15 min. Incubar 24 hrs. A 35-37 °C como control de esterilidad.

**Medio para análisis de Ácido Fólico.** Pesar 11.1 g de agar y se suspender en 100 mL de agua destilada. Hervir de 2-3 minutos. Cuando el medio esté a temperatura ambiente, ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  (25 °C) utilizando NaOH 0.1N. Dispensar 10 mL de medio en tubos de 16-20 mm de diámetro y esterilizar en autoclave a 121-124 °C durante 5 min. Prepara solamente la cantidad necesaria para la corrida.

<sup>2</sup> La descripción de preparación de medio corresponde a las indicaciones de la casa Himedia.

## **Anexo F**

### **Preparación de reactivos**

**Agua destilada tratada con carbón activado.** Agregar 10 mg de carbón activado por litro de agua destilada. Agitar y dejar reposar por un día. Filtrar la solución a través de papel filtro Whatman No. 1.

**Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.** Pesar 13.61 g de fosfato de potasio monobásico y disolver en agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH. Transferir a un balón volumétrico de 1L y aforar con agua destilada. La solución se preparó cada vez que se va a utilizar.

**Hidróxido de amonio (2+3).** En un balón volumétrico de 100 mL que contenga aproximadamente 30 mL de agua destilada agregar 40 mL de amoníaco concentrado y aforar con agua destilada. Almacenar en un recipiente de polietileno. La solución es estable de forma indefinida.

**Hidróxido de amonio 0.1 M.** En un balón volumétrico de 100 mL que contenga aproximadamente 50 mL de agua destilada agregar 1.4 mL de amoníaco concentrado y aforar con agua destilada. Almacenar en un recipiente de polietileno. La solución es estable de forma indefinida.

**Solución de pancreatina 5%.** En un beaker de 250 mL pesar 5 g de Pancreatina y diluir con 100 mL de agua destilada. Preparar en fresco.

**Solución de alfa-amilasa 15%.** En un beaker de 250 mL pesar 15 g. de alfa-amilasa y diluir con 100 mL de agua destilada. Preparar en fresco.

**Hidróxido de sodio 0.1 N.** Pesar 4 g de hidróxido de sodio. Disolver en un beaker de 500 mL que contenga 300 mL de agua destilada. Enfriar la solución en un baño de agua fría. Transferir la solución a un balón volumétrico de 1 L. Lavar el beaker con agua destilada y transferir los lavados al balón. Aforar con agua destilada.

**Hidróxido de sodio- 0.01 N.** Agregar 100 mL de la solución de hidróxido de sodio 0.1 N a un balón volumétrico de 1 L y aforar con agua destilada.

**Solución salina isotónica estéril 0.85%.** Pesar 8.5 g de cloruro de sodio en un beakes de 250 mL, disolver con 100 mL de agua destilada. Transferir la solución a un balón volumétrico de 1 L.

lavar el beaker y transferir los lavados al balón. Aforar con agua destilada. Transferir la solución a una botella y esterilizar en autoclave a 121-124 °C durante 30 minutos.

### **Soluciones patrón de Ácido Fólico**

**Solución madre 100 µg/mL.** En un crisol de porcelana, colocar aproximadamente 1g de patrón de ácido fólico grado USP. Secar en un horno a 100-110 °C hasta peso constante. En un beaker de 600 mL, pesar 50 mg de patrón. Disolver y aforar a 500 mL con buffer de fosfatos 0.01 pH 7. Guardar en un recipiente ámbar, con una capa de tolueno y refrigerar. Es estable por 2 meses.

**Solución intermedia 1 µg/mL.** En un balón volumétrico de 100 mL que contenga aproximadamente 50 mL de agua destilada agregar 1 mL de la solución madre y aforar con agua destilada.

**Solución de trabajo 50 ng/mL.** En un balón volumétrico de 100 mL que contenga aproximadamente 50 mL de agua destilada agregar 5 mL de la solución intermedia y aforar con agua destilada.

**Anexo G**  
**Protocolo de análisis microbiológico de Ácido Fólico en alimentos fortificados.**  
**Método oficial AOAC**

**Preparación de la muestra**

- Pulverice (de ser necesario) y homogenice la muestra.
- Pese en un erlenmeyer de 250 mL la cantidad de muestra adecuada, tomando en cuenta la concentración aproximada de ácido fólico en el alimento:

**Tabla # 28. Valores sugeridos de peso y volúmenes de aforo y alícuota a usar en el análisis de ácido fólico, dependiendo de la concentración del mismo en el alimento**

Alimento (Ácido fólico)	Peso (g) o volumen (mL)	Volumen 1 (V <sub>1</sub> )	Volumen 2 (V <sub>2</sub> )	Volumen 3 (V <sub>3</sub> )
Harina de trigo (1.5 mg/Kg)	2g	200 mL	6 mL	100 mL
GNM <sup>3</sup> (1.79 mg/Kg)	2g	200 mL	5 mL	100 mL
Incaparina (1.87 mg/Kg)	2g	200 mL	5 mL	100 mL
Leche fluída (52 µg/250 mL)	25 mL	200 mL	20 mL	100 mL
Leche en polvo (52 µg/250 mL)	2 g	200 mL	20 mL	100 mL

- Adicione 100 mL de agua destilada y mezcle bien.
- Agregue 2 mL de NH<sub>4</sub>OH-40% v/v y agite vigorosamente. Si observa que la muestra se adhiere a las paredes del erlenmeyer, lave con 2 mL de NH<sub>4</sub>OH 0.1M.
- Cubra el erlenmeyer con un beaker de 50 mL y esterilice en autoclave a 121-123°C durante 15 minutos.
- Mezcle bien y sumerja los erlenmeyer en baño frío hasta llevar a temperatura ambiente.
- Afore a un volumen 1 (V<sub>1</sub>) con agua destilada y agite la solución.
- Centrifugue durante 5 minutos a 2500 rpm.

<sup>3</sup> GNM: Galleta Nutricionalmente mejorada

- Transfiera un volumen 2 ( $V_2$ ) de la solución anterior, a un beaker de 50 mL y agregue aproximadamente 20 mL de agua destilada.
- Ajuste el pH a 6.8 con NaOH 0.1 N.
- Afore a un volumen 3 ( $V_3$ ) y agite.
- Si observa que la solución aún está turbia, filtre la solución a través de papel filtro Whatman No. 5 y si la turbidez persiste, filtre a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### **Análisis microbiológico**

- Prepare las siguientes series de tubos con tapón de rosca:
  - 3 tubos vacíos para emplearlos como blancos sin inocular (controles del proceso de esterilización)
  - 3 tubos vacíos para emplearlos como blancos inoculados (controles para descartar la contaminación del medio, agua destilada y pureza del inóculo).
  - 10 tubos que contengan 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la solución patrón de trabajo de 1 ng/mL (VII.B.4.) respectivamente. Cada volumen se trabaja en duplicado.
  - Por muestra: 8 tubos que contengan 1, 2, 3 y 4 mL del extracto final de la muestra obtenida en VIII.B.12, respectivamente. Cada volumen se trabaja en duplicado.
- Adicione agua destilada a los tubos que sea necesario, para que el volumen final de todos los tubos sea de 5 mL, tal y como se indica en la tabla siguiente:

**Tabla # 29. Volúmenes utilizados en el análisis de Ácido Fólico en tubo para realizar las diluciones**

mL de patrón o muestra / tubo	mL de agua destilada a agregar
0 (blancos)	5
1	4
2	3
3	2
4	1
5	0

- Coloque los tapones sin apretarlos.
- Esterilice en autoclave durante 5 minutos a 121-124°C.
- Enfríe rápidamente en un baño de agua fría en condiciones asépticas y agregue con una pipeta automática y tips estériles 50 µL del inóculo a todos los tubos, excepto a los tubos que se van a emplear como blancos sin inocular.
- Incube 22 horas a 35-37 °C. Antes de leer cada tubo, agite durante 15 segundos con la ayuda de un vórtex.
- Ajuste el 100 % de transmitancia del instrumento, colocando en las celdas el contenido de los tubos de los blancos sin inocular. Lea el % de transmitancia de los blancos inoculados.
- Ajuste el 100 % de transmitancia colocando en las celdas el contenido de los tubos de los blancos inoculados y lea el % de transmitancia del resto de los tubos.

### **Cálculos**

- Obtenga el promedio de los porcentajes de transmitancia para cada concentración del patrón.
- En papel milimetrado plotee en el eje “x” el volumen de la solución patrón de 1 ng/mL por tubo (mL) y en el eje “y” el promedio de los porcentajes de transmitancia.
- Por interpolación de cada uno de los porcentajes de transmitancia de la muestra en la curva graficada, obtenga el equivalente de mL de patrón por tubo.
- Divida cada uno de los valores obtenidos dentro de la cantidad de mL de extracto adicionado a cada tubo, y multiplique por la concentración de la solución patrón de ácido fólico que colocó en el tubo (1 ng/mL). Con estos cálculos obtendrá la concentración de ácido fólico (ng/mL) en el extracto final de la muestra.
- Sume todos los valores obtenidos y luego divida por el número de tubos utilizados (8).
- Calcule el siguiente rango: promedio del inciso 5  $\pm$  10.

- Obtenga un segundo promedio descartando los valores de % de transmitancia obtenidos que no estén incluidos en el rango calculado en el inciso 6. No puede descartar más de 2/3 de los valores.
- Con el resultado obtenido calcule la concentración de ácido fólico con la siguiente ecuación:

$$\text{Acido fólico (mg / 100g)} = \frac{\bar{X}}{10000} \times \frac{V_3}{V_2} \times \frac{V_1}{p} \times \frac{1}{R} \quad (6)$$

Donde:

- $\bar{X}$  = Promedio obtenido
- $p$  = cantidad de muestra (g o mL)
- $V_1$  = Volumen de aforo inicial (volumen 1)
- $V_2$  = Volumen de alícuota (volumen 2)
- $V_3$  = Volumen de aforo final (volumen 3)
- $R$  = Factor de recuperación

**Anexo H**  
**Reactivos químicos**

**Tabla # 30. Reactivos químicos utilizados para la validación del método de análisis de ácido fólico en microplaca**

<b>Nombre</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Pureza</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>Densidad (g/mL)</b>	<b>Marca</b>
<b>Ácido Clorhídrico fumante p.a.</b>	HCl	37%	36.46	1.19	Merck art. 317
<b>Ácido Fólico grado USP</b>	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	98%	441.4		Sigma No. V-1 F 7876
<b>Amoniaco p.a.</b>	NH <sub>3</sub>	25%	17.03	0.91	Merck art. 5432
<b>Carbón activado</b>					Cuntin
<b>Cloruro de sodio p.a.</b>	NaCl	99.5%	58.44		Merck Art. 4094
<b>Glicerol</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	87%			Merck
<b>Hidróxido de sodio</b>	NaOH	99.5%			Merck
<b>Tolueno</b>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	99.5%		0.87	Merck
<b>Amilasa</b>					Sigma
<b>Pancreatina</b>					Merck