

Alimentos funcionales

Calidad de los datos del contenido en ácido fólico en vegetales recogidos en varias tablas de composición de alimentos españolas, y nuevos datos sobre su contenido en folatos

A. B. Olivares, M. J. Bernal, G. Ros, C. Martínez y M. J. Periago

Facultad de Veterinaria, Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia. Espinardo, Murcia, España.

Resumen

La relación entre una ingesta adecuada de folatos y por tanto niveles séricos correcto y la disminución del riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares, defectos del cierre del tubo neural, enfermedades neurológicas y algunos tipos de tumores ha sido ampliamente estudiada. De ahí que el consumo de alimentos con un elevado contenido de folatos o de alimentos enriquecidos está aumentando debido a los beneficios de esta vitamina sobre la salud. Es, por tanto, muy importante una ingesta adecuada de folatos para alcanzar unos niveles aceptables de folatos en plasma. De esta manera son necesarios datos fiables de composición de alimentos para evaluar y estimar la ingesta de folatos por la población, formular dietas o desarrollar recomendaciones dietéticas.

Para ello han revisado los datos de ácido fólico en las Tablas de Composición de Alimentos (TCA) Españolas, comprobando la calidad de los mismos y comparándolas con otras que especifican métodos validados así como con un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) validado en nuestro laboratorio. Los datos bibliográficos manejados provenían de las TCA de mayor renombre, consideradas de preferencia. Se evaluaron todos los datos correspondientes a contenido de folatos, así como la información que sobre los mismos especificaban dichas TCA, desde origen del dato, método de análisis, número de muestras, o base de datos de las que se habían obtenido. En el análisis mediante el método validado para HPLC, los alimentos analizados fueron

QUALITY OF DATA ON FOLIC ACID CONTENT IN VEGETABLES INCLUDED IN SEVERAL SPANISH FOOD COMPOSITION TABLES AND NEW DATA ON THEIR FOLATE CONTENT

Abstract

The relationship between adequate folate intake, adequate serum levels, and lowering the risk of suffering from cardiovascular diseases, neural tube defects, neural illness and some kind of cancers have been widely studied. Because of the expected health benefits, the consumption of foods with high folate content or enriched foods is increasing. Therefore, an adequate folate intake is important in order to reach acceptable serum levels. Reliable food composition data are necessary in order to evaluate and estimate the populations folate intake, elaborate diets and formulate recommended dietary intakes.

For this reason, we revised folic acid data in Spanish Food Composition Tables (FCT). The quality of the data was evaluated and compared with other well-known international Food Composition Tables as well as with a high-resolution liquid chromatographic method (HPLC) validated in our laboratory. We evaluated all data about folate content, as well as all the information given like data origin, analytical method, sampling or original database. For the HPLC method, the food samples were incubated with hog kidney conjugase. After that, the samples were purified and concentrated by strong anion exchange (SAX), then the folate content was quantified by HPLC with a combination of two ultraviolet and fluorescence detectors. The evaluation and comparison of data was established according to some parameters, which define the quality of data, giving punctuation depending on the compliance with these parameters.

The study of different sources showed that nutrients were different in definition, analysis method, units and expression of data, and that this fact could have a potential influence on TCA data values. In addition, it has been possible to show a wide variation in food number, na-

Correspondencia: Gaspar Ros Bermejo
Nutrición y Bromatología
Facultad de Veterinaria
Campus de Espinardo
Universidad de Murcia
30071 Murcia
E-mail: gros@um.es

Recibido: 22-VI-2005.
Aceptado: 23-XI-2005.

tratados con conjugasa de riñón de cerdo. La muestra resultante fue purificada y concentrada mediante extracción en fase sólida por intercambio aniónico fuerte (SAX), para posteriormente separarla y cuantificar el contenido de folatos mediante HPLC, con una combinación de detectores de ultravioleta y fluorescencia. La evaluación y comparación de los datos se estableció en función de varios parámetros arbitrarios que definen la calidad de los datos, otorgándose una puntuación dependiendo del grado de cumplimiento de los mismos.

El estudio de las diferentes fuentes consultadas muestra que los nutrientes difieren en definición, métodos de análisis, unidades y modo de expresión, lo cual puede influir potencialmente en los diferentes valores de contenido de folatos entre las Tablas. También se observó una amplia variación respecto al número de alimentos, forma de nombrarlos así como presencia de alimentos crudos o cocinados con muy diferente composición.

Aplicando los criterios de calidad se observó que aquellas que recibían una menor puntuación total, en cuanto a la información referente a los datos de folatos, eran las TCA Españolas. Esto es debido a que dichas TCA no especifican un método validado para la cuantificación de ácido fólico en alimentos (Método directo de elaboración de TCA), sino que para esta vitamina se basan en datos recopilados de la bibliografía (Método indirecto de elaboración de TCA). De forma que estos resultados muestran la importancia de conseguir un consenso en el método de determinación de folatos, en el muestreo y en el protocolo para desarrollar dicho método con el objetivo de obtener una tabla de composición de alimentos con datos más uniformes, contrastados y fiables en lo que respecta a esta vitamina.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:97-108)

Palabras clave: *Folatos. Tabla de Composición de Alimento. Método analítico. Normalización.*

Introducción

El término folato describe al grupo de formas químicas derivadas que presentan idéntica actividad biológica que la molécula original o ácido pteroilmonoglutámico o ácido fólico. En los alimentos, los folatos están presentes como poliglutamatos tetrahidrofolatos reducidos. La forma conocida como ácido fólico es la forma sintética completamente oxidada del ácido pteroilmonoglutámico. Obviamente no está presente de forma natural en los alimentos si no que es la utilizada en suplementos y para enriquecimiento. Las formas reducidas o naturales son menos estables que el ácido fólico y son numerosos los factores que afectan la estabilidad de los folatos tales como luz, temperaturas elevadas, cambios de pH o exposición al aire¹. De esta manera se producen pérdidas durante el procesado de los alimentos ya sea industrial o doméstico sobre todo si es bajo condiciones oxidativas².

Los mamíferos carecen de la capacidad de síntesis *de novo* de esta vitamina, por lo que deben ingerirla

de estos alimentos así como el análisis de alimentos crudos o cocinados con diferente composición. Cuando se probaron las condiciones de calidad, la TCA Española tuvo la menor puntuación en los datos de folatos. Esto se debe a que la TCA Española no utilizó un método validado para cuantificar el ácido fólico en alimentos (Método directo de elaboración de TCA), sino que utilizó datos de folatos de otras TCA (Método indirecto de elaboración de TCA). Estos datos manifiestan la importancia de conseguir un consenso en el método de determinación de folatos en alimentos con el objetivo de obtener una TCA con datos de folatos fiables.

(*Nutr Hosp.* 2006;21:97-108)

Key words: *Folate. Food Composition Data Table. Analytical method. Normalization.*

con la dieta. Las formas poliglutámicas naturales no son absorbidas como tales, ya que a nivel intestinal existe una enzima, α -glutamyl hidrolasa o conjugasa, localizada en el borde apical de las microvellosidades intestinales, que es la encargada de transformarlas en formas monoglutámicas biológicamente activas. El papel biológico de esta vitamina es esencial puesto que actúa como coenzima en la transferencia (tanto como aceptor o donante) de unidades monocarbono en reacciones involucradas en el metabolismo de nucleótidos y aminoácidos³.

La importancia actual de los folatos y el desarrollo creciente de estudios relacionados con ellos se debe a la clara repercusión que tiene un correcto estatus de folatos sobre la salud. La manifestación clínica clásica de deficiencia es la anemia megaloblástica^{4,5}, siendo el ácido fólico el empleado para el tratamiento de dicha anemia. Posteriores investigaciones⁶ permitieron conocer que tomar suplementos de ácido fólico antes de la concepción y durante los primeros meses del embarazo reducía de forma significativa el riesgo de recién

nacidos con defectos de cierre del tubo neural (NTD). Más tarde, las investigaciones se centraron en la relación entre la suplementación con ácido fólico y la disminución de los niveles de homocisteína en plasma⁷, lo que supuso un importante hallazgo, ya que la homocisteína (metabolito intermediario de la síntesis de la metionina) es un factor de riesgo independiente en las enfermedades cardiovasculares⁸. En este sentido diversos ensayos han demostrado que la ingesta de folatos naturales procedente de alimentos también estaba relacionada con la disminución del riesgo de NTD⁹ así como de disminución de los niveles de homocisteína en plasma¹⁰. En estudios epidemiológicos posteriores se ha observado que un bajo nivel de folatos está asociado con cáncer de cervix, de colon y recto, de pulmón, de esófago, cerebro, páncreas y de mama¹¹. De todos ellos destaca, por su relación directa con la dieta, el cáncer colorectal. Incluso, investigaciones más actuales relacionan el bajo estatus de folatos con disfunciones neurocognitivas tales como demencia y Alzheimer^{12,13}.

Es lógico, por tanto, que en la actualidad el consumo de alimentos con un elevado contenido de folatos o de alimentos enriquecidos esté aumentando debido a sus reconocidos beneficios sobre la salud. Es muy importante una adecuada ingesta de folatos para alcanzar unos niveles aceptables en sangre, y por ello es necesario un mayor conocimiento acerca del contenido de folatos en los alimentos.

Las Tablas de Composición de Alimentos (TCA) surgieron ante la necesidad concreta de conocer la composición de alimentos en cuanto a los compuestos que aportaban energía. Más tarde se obtuvieron datos de micronutrientes tales como vitaminas y minerales con estudios más exhaustivos cuya finalidad era establecer la relación entre alimentación y salud¹⁴. El objetivo actual de la Ciencia de la Nutrición no es otro que proporcionar un mejor estado de salud a la población, para lo cual se evalúa la alimentación de los individuos o poblaciones para establecer cuáles son sus necesidades, y una vez conocidas planificar su alimentación. Por todo ello, las TCA son necesarias en el área de la nutrición en muchos aspectos: permiten el cálculo de energía y nutrientes de los alimentos, así como la elaboración de dietas adecuadas a individuos y colectivos. De igual modo son usadas en la valoración de encuestas de consumo, muy útiles desde el punto de vista epidemiológico y clínico, puesto que permite controlar la presencia de grupos de riesgo. De esta manera se facilitan también las intervenciones de políticas alimentarias y nutricionales por parte de los organismos competentes.

Es esencial conocer la calidad de los datos que las TCA facilitan, su fiabilidad y técnicas empleadas para la obtención de los valores que presentan ya que su elaboración es compleja y está influida por numerosos factores que limitan la cantidad y la calidad de los datos que pueden ofrecer. Dicha calidad se basa princi-

palmente en que los datos deben ser representativos de los alimentos del ámbito al que van destinados, deben haber sido obtenidos a través de métodos analíticos apropiados y que hayan sido aplicados correctamente, y deben reflejar con exactitud la composición de los alimentos¹⁵. De esta manera, lo que se debe considerar primordial a la hora de evaluar una TCA es el muestreo, el método analítico y la aplicación de dicho método.

Objetivos

Revisar y evaluar los datos que de ácido fólico o folatos que presentan las TCA españolas elegidas, comprobar la fiabilidad de los mismos y compararlas con otras que especifican métodos validados.

Analizar mediante un método validado de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el contenido de folatos de una serie de alimentos clave y comparar estos con otros datos y métodos de ensayo.

Establecer en un ranking de puntuación la valoración que a las distintas TCA seleccionadas se les otorga en función de diversos criterios tales como muestreo, número de muestras analizadas o método utilizado validado o no. Esto se especifica en el apartado siguiente.

Material y métodos

Material

En lo que respecta a datos revisados, éstos provenían de la bibliografía, escogiéndose aquellas TCA de mayor renombre, o que por el número de reediciones se consideraron de preferencia (tabla II). Se revisaron todos los datos correspondientes a contenido de ácido fólico o folatos, así como la información que sobre los mismos especificaban dichas TCA, desde origen del dato, método de análisis, número de muestras, o base de datos de las que se habían obtenido.

En cuanto a datos originales, se utilizaron los datos obtenidos a partir del análisis mediante el método validado para HPLC¹⁶. Los alimentos analizados fueron obtenidos de empresas colaboradoras así como de supermercados o superficies comerciales locales. Generalmente el origen venía facilitado en el producto o en el punto de venta. Al tratarse de verduras y hortalizas la mayor parte de las muestras procedían de la región de Murcia, como era el caso de los tomates de diversas variedades (“Copo”, “Ronaldo”, “Tina”) todas ellas del Campo de Cartagena. Las coles de Bruselas también procedían de Murcia, así como los pepinos y pimientos, perteneciendo estos a las variedades “Español” y “Lamuyo” respectivamente. Los guisantes procedían de Malpica (Toledo) contando diversas variedades como “Dinos” y “Globo” En el caso de las muestras de cebolla la variedad era “Reca” y procedía de Valencia. Los espárragos fueron cultivados en Granada, de la variedad “Verde Triguero”. Las lechugas

Tabla I
Adaptación de los criterios de Evaluación para la descripción Genérica de los Datos de las Tablas de Composición de Alimentos (Holden et al., 1997)¹⁷

Factor	Clasificación			
	3	2	1	0
A: Método analítico	Documentación publicada de la validación para el análisis de alimentos, incluyendo la utilización de los materiales de referencia adecuados con un rango de recuperación aceptable entre 95-105% en alimentos similares analizados o comparables a los resultados de otros laboratorios; aceptable repetibilidad; con ejemplos del procesado de la muestra; detallada información del análisis.	Alguna documentación; estudios de validación incompletos, incluyendo recuperaciones del 90-110% en alimentos similares o comparables a otros métodos o laboratorios; repetibilidad aceptable; adecuado procesado de la muestra; adecuada identificación del analito.	Alguna documentación; mínima validación; recuperaciones del 80-120% en alimentos similares o comparables a otros métodos o laboratorios; aceptable repetibilidad; procesado de la muestra mínimamente aceptable; identificación limitada del analito.	Método no documentado, no existe referencia o referencia inaccesible; no estudios de validación o fracaso para alcanzar resultados aceptables con los materiales de referencia; pérdida aceptabilidad en: repetibilidad, recuperaciones (<80% o > 120%), o comparación con otros métodos o laboratorios; inadecuado procesado de la muestra, inadecuada identificación del analito.
B: Control de calidad del análisis	Exactitud y precisión óptima indicado y monitorizado por datos explícitos.	Exactitud y precisión aceptable	Exactitud y precisión mínimamente aceptable.	Exactitud o precisión no documentadas o inaceptables.
C: Número de muestras	Extenso.	Adecuado.	Limitado.	—
D: Tratamiento de la muestra	Completa documentación de todos los pasos del procedimiento, incluyendo análisis de porción comestible, validación de los métodos de homogeneización, detalles de la preparación de las muestras, almacenamiento y cambios de humedad registrados.	Documentación del procedimiento pertinente incluyendo el análisis de la porción comestible; los procedimientos son correctos pero algunos detalles no son informados.	Descripción limitada de los procedimientos incluyendo evidencia del análisis de la porción comestible.	Procedimientos totalmente inapropiados o no documentados acerca del criterio pertinente para el análisis de alimentos.
E: Plan de muestreo	Muestreo múltiple geográficamente con descripción de las bases estadísticas para el muestreo; las muestras son representativas de marcas, variedades consumidas o comercialmente utilizadas.	Muestreo significativo, al menos dos regiones muestreadas. La muestra es representativa	Un área geográfica muestreada; la muestra es significativa de algo que se come.	No descrito o no representativo.

eran de la variedad "Romana" y cultivadas en Murcia, al igual que el brocoli de la variedad "Griffin" y la escarola, esta última procedente del Campo de Cartagena. En el caso de las judías verdes su origen era Granada y la variedad "Verde Redonda". En el caso de las acelgas, espinacas y el apio, su procedencia era la Comunidad Valenciana, concretamente de Almanzora en Castellón las dos primeras y de Villena (Alicante) el tercero.

Métodos

Una vez escogidas las TCA a analizar, se procedió al estudio de las mismas a fin de seleccionar los datos correspondientes a contenido de ácido fólico o folatos, así como para recopilar la información que sobre la elaboración de estas TCA se ofrece en la propia publicación.

En el caso de las muestras de vegetales se analizaban al menos por triplicado en dos o más ocasiones. De cada triplicado procesado se obtenían seis muestras para el cromatógrafo, de tal forma que para cada alimento se tenían un mínimo de 12 a 15 valores para trabajar con ellos, presentándose como valor de contenido la media y la desviación estándar calculada a partir de estos valores. Las muestras eran tratadas con tampón de extracción Ches-Hepes (pH 7,85) con la finalidad de extraer los folatos de la matriz del alimento. El extracto de muestra así obtenido fue incubado con conjugasa de riñón de cerdo. La muestra resultante fue purificada y concentrada mediante extracción en fase sólida por intercambio aniónico fuerte (SAX), para posteriormente separarla y cuantificar el contenido de folatos mediante HPLC, con una combinación de detectores de ultravioleta y fluorescencia¹⁶.

Los criterios de evaluación utilizados para la comparación de las diferentes TCA consideradas fueron adaptados de Holden y col., 1997¹⁷ donde se establecen varios parámetros que definen la calidad de los datos en función del método analítico, control de calidad del análisis, número de muestras analizadas, tratamiento de la muestra y plan de muestreo (A, B, C, D y E respectivamente) (Tabla I). A partir de estos criterios se otorgan puntuaciones de 0 a 3 en función del grado de cumplimiento de los mismos (Tabla II).

Los datos de estimación de ingesta por la población española se calcularon a partir de los valores de contenido de folatos obtenidos mediante el método cromatográfico. Los datos de consumo utilizados fueron los publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en su informe anual sobre "La Alimentación en España" (Fig. 2).

Resultados y discusión

Elección de las TCA

Las TCA evaluadas fueron escogidas debido a su relevancia, ya que eran las más frecuentemente referenciadas en los distintos trabajos revisados acerca de

composición nutricional de alimentos. Las clasificadas como TCA nacionales (tabla II, (b), (c) y (d)) se eligieron en función de su reciente publicación en España (años 2003 y 2004) y de su conocido prestigio además de ser las TCA más frecuentemente utilizadas para la realización de distintos trabajos en nuestro Grupo de Investigación. A ellas agregamos la TCA del Ministerio de Sanidad y Consumo que venía avalada por dicho organismo (tabla II, (e)). Las tablas de McCance y Widdowson¹⁸ se escogieron para la comparación como TCA internacional (tabla II (a)) y por ser un trabajo de referencia desde que fue creada.

Datos de las TCA

Los datos que aparecen en las TCA son recopilados por los autores para la elaboración de las mismas mediante tres métodos básicos: directo, indirecto y combinado^{19,20} en función del origen de dichos datos. De esta forma el *método directo* de recopilación de datos consiste en un estudio completo perfectamente diseñado en cuanto al muestreo, la realización de los análisis y la obtención de resultados representativos. La ventaja de este método es que los datos obtenidos serán de alta calidad pero en contrapartida el coste de este procedimiento es excesivo.

En el caso del *método indirecto* la recopilación se realiza mediante la revisión y estudio de tablas de conocido prestigio, publicaciones o datos procedentes de laboratorios, empresas, etc. Los datos no son de tan alta calidad como los obtenidos por el primer método y en este caso la ventaja radica, esencialmente, en que el coste es mucho menor.

En el *método combinado* se trata de unir las ventajas de ambos y tratar de minimizar los inconvenientes. De esta forma se realizan los análisis sobre las muestras para obtener resultados propios para aquellos alimentos considerados más relevantes en la dieta y se usan los datos bibliográficos para los menos importantes. Este es el método más seguido en cuanto a elaboración de las TCA²¹ debido a que asegura una calidad aceptable en los datos al tiempo que optimiza la relación coste/calidad dedicando más recursos a los alimentos más importantes por tener un peso relevante en la dieta de la población. La gran cantidad de alimentos disponibles hoy día en el mercado, sobre todo en el caso de países desarrollados, dificulta la realización de las tablas así como la elección de los alimentos considerados esenciales, elección que está basada bien en el alto consumo del alimento o bien en el hecho de que posea un alto contenido en algún compuesto de interés²².

Nomenclatura de los alimentos en las TCA

En cuanto a la diferente nomenclatura de los alimentos se intenta seguir unas pautas para favorecer cierta homogeneidad en los nombres utilizados y por tanto hacer más fáciles las consultas y búsquedas de

Tabla II
 Datos de contenido de ácido fólico ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ de alimento) en alimentos recogidos de Tablas de Composición de Alimentos (TCA) internacionales y nacionales

Vegetal	Tablas*				
	Internacionales	Nacionales			
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Acelga fresca	ND	140	22	140	ND
Apio	16	14	18	12	ND
Brócoli	90	82	110	90	ND
Cebolla	17	16	14	16	7.0
Col de Bruselas	135	90	132	79	ND
Escarola fresca	66	ND	110	ND	ND
Espárrago fresco	175	ND	128	30	107
Espinaca fresca	150	78	192	140	ND
Guisante					
• fresco	62	0	70	78	ND
• congelado	47	78	47	78	ND
• enlatado	11	ND	40	ND	ND
Judías verdes	80	60	66	60	62.3
Lechuga fresca	55	34	59	34	33.6
Pepino	9	16	13	16	ND
Perejil	170	170	170	170	ND
Pimiento rojo	21	11	23	11	ND
Tomate					
• rojo	17	28	29	28	28.8
• verde	ND	ND	ND	ND	ND
Puntuación según factores tabla II.	A3+B2+C2+D2+E2	A0+B0+C1+D2+E0	A0+B1+C2+D1+E0	A0+B0+C0+D1+E0	A1+B1+C2+D1+E1
TOTAL	11	3	4	1	6

* Origen de las TCA y su referencia bibliográfica indicada entre paréntesis:

(a) McCance and Widdowson (18)

(b) TCA Universidad de Granada (INYTA) (28)

(c) TCA Universidad de Barcelona (CESNID) (21)

(d) TCA Universidad Complutense Madrid (Moreiras y col.) (29)

(e) TCA Ministerio de Sanidad y Consumo (33)

ND = valor de contenido en ácido fólico no recogido en la TCA.

los mismos por parte de los usuarios. Se trata de utilizar un orden en el que aparece primero el nombre genérico del grupo, luego el del alimento propiamente dicho, seguido de descriptores los cuales son adjetivos que otorgan información sobre el alimento. Estos descriptores van a proporcionar información sobre color, parte anatómica, estado físico, maduración, adición o eliminación de algún nutriente, ingrediente, aroma o sustancia enriquecedora o fortificante, así como del tratamiento tecnológico o culinario realizados. Los grupos hacen referencia a alimentos afines, dentro de los cuales se engloba a cada alimento con sus descriptores. Los grupos son: “Cereales y derivados”, “Leches y derivados”, “Carnes y derivados”, “Huevos y derivados”, “Pescados y derivados”, “Mariscos y derivados”, “Aceites y grasas”, “Verduras y hortalizas”, “Legumbres y derivados”, “Tubérculos y derivados”, “Frutas y derivados”, “Frutos secos y semillas oleaginosas”, “Azúcares y derivados”, “Aperitivos”, “Salsas

y condimentos”, “Platos compuestos”, “Bebidas no alcohólicas”, “Bebidas alcohólicas” y “Miscelánea”. Los grupos están claramente definidos, pero los alimentos que incluyen y sus definiciones o descriptores suelen variar por lo que es frecuente encontrar TCA que nombra a los alimentos de forma arbitraria basándose en criterios tales como mismo tipo de alimento (por ejemplo, “hortalizas, verduras y patatas”, “conservas”, etc.), e incluso obviando grupos tan importantes como los frutos secos o las bebidas. Por tanto, es necesario normalizar la nomenclatura utilizada a fin de conseguir unos datos más homogéneos.

En las TCA revisadas, en todos los casos los grupos de alimentos eran nombrados de la misma forma, pero variaba el número de alimentos incluidos en cada grupo e incluso la forma de nombrar a alguno de estos alimentos. En el presente trabajo se ha otorgado una nomenclatura arbitraria atendiendo a los alimentos analizados mediante el método cromatográfico, inten-

tando que al menos uno de los datos que las TCA consultadas ofrecían para alguna variedad de ese alimento coincidiese con la nomenclatura elegida en este trabajo. Esto permitió comprobar que la comparación entre las diferentes fuentes consultadas muestra que los nutrientes difieren en definición, métodos de análisis, unidades y modo de expresión, lo cual puede influir potencialmente en los diferentes valores de contenido de folatos entre las tablas.

Unidades de expresión en las TCA, método analítico y repercusión sobre el significado nutricional

Uno de los primeros pasos ha sido adecuar o intentar adecuar las unidades de expresión de los datos de esta vitamina. Todas las TCA consultadas emplean los valores expresados como μg de ácido fólico/100g de alimento que necesitan ser especificados y son la base de la estimación de la ingesta adecuada o no de este nutriente. Desde 1998 el Institute of Medicine en Estados Unidos (IOM²³) propone en las Ingestas Diarias Recomendadas para el ácido fólico unas nuevas unidades (EFD o Equivalente de Folato Dietético) que permiten cuantificar las diferencias en la absorción de los folatos presentes de forma natural en los alimentos o del más biodisponible ácido fólico sintético. Desde entonces numerosos datos de contenido de folatos en alimentos vienen apareciendo expresados como $\mu\text{g}/\text{EFD}$, a fin de facilitar los datos de ingesta²⁴. Tradicionalmente los datos de contenido se expresaban como $\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso fresco, peso seco o bien de porción comestible. La conversión se realiza en función de los datos obtenidos a partir de numerosos estudios de biodisponibilidad. El más importante es el de Sauerlich y col. en 1987²⁵, el cual indica que la biodisponibilidad de los folatos de alimentos es de aproximadamente del 50%, así el ácido fólico sintético ingerido por una persona en ayunas es dos veces más biodisponible (100/50) que los folatos de la dieta, y el ácido fólico tomado con alimento lo cual incluye el que contienen los alimentos enriquecidos, es 1.7 veces (85/50) más biodisponible que los folatos naturales. De esta manera se puede resumir que:

- $1 \mu\text{g}/\text{EFD} = 1.0 \mu\text{g}$ de folatos de alimentos = $0.6 \mu\text{g}$ de ácido fólico añadido a los alimentos = $0.5 \mu\text{g}$ de ácido fólico tomado sin alimento.
- $1 \mu\text{g}$ de ácido fólico como fortificante = $1.7 \mu\text{g}$ EFD.
- $1 \mu\text{g}$ de ácido fólico como suplemento o en ayunas = $2.0 \mu\text{g}$ EFD.

Los datos son presentados tal y como se hallaron publicados (tabla II), es decir, los que vienen expresados como un valor sin media ni desviación estándar es porque así eran encontrados en la fuente original. Los datos que son presentados con la media y la correspondiente desviación estándar son los obtenidos mediante el método validado para HPLC en nuestro laboratorio. De tal forma que los valores finales plasmados en la tabla III son resultado de procesar los múltiples

resultados hallados tras varias repeticiones de los análisis. Con esta nueva perspectiva sobre el valor nutricional expresado como EFD cobra especial significado la expresión de los datos para esta vitamina. Como hemos indicado todas las TCA manejadas presentaban los datos en las mismas unidades $\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso fresco o $\mu\text{g}/100\text{g}$ de porción comestible, en ningún caso los datos de ácido fólico considerados venían expresados en EFD. Si aplicásemos los criterios del IOM podríamos entender que estamos frente a alimentos fortificados y por lo tanto su valor nutricional sería 1,7 veces el indicado. En realidad esta situación es consecuencia del método analítico empleado que en los casos en los que se pudo identificar bibliográficamente^{26,27} era el método microbiológico.

Como puede observarse los datos presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ cuando se comparan todas las TCA en general. No obstante, comparándolas una a una, se observa que entre los datos facilitados por la TCA de la Universidad de Granada (28) y los de la Complutense de Madrid²⁹ existe una gran similitud, de tal forma que la mayoría de los presentados en la tabla II son idénticos entre ellos. Esto es debido a que probablemente los datos son tomados de revisiones similares en ambos casos, ya que en la introducción de las respectivas publicaciones ambas justifican los datos no obtenidos directamente por ellos (*método indirecto*) como recopilados a partir de "TCA de amplia difusión y utilización por centros internacionales de reconocido prestigio", en esos casos las tablas utilizadas venían referenciadas en el apartado de bibliografía²⁹. También es posible observar que existen datos similares en las TCA (b) y (e) que encuentran su homónimo en la TCA (a) o de McCance and Widdowson¹⁸, la cual es una de las más referenciadas en todos los casos. Sin embargo en esta última viene especificado que el método analítico utilizado es el microbiológico^{26,27}.

Como ya se ha comentado en las TCA españolas (b), (c), y (d), no aparece el método analítico para la obtención de folatos, excepto en la TCA del Ministerio (e) donde sí viene referenciado un método por HPLC³⁰. En las tres primeras, acerca de esta vitamina la única información que aparece es sobre las unidades de expresión utilizadas, así como que en todos los casos se hace referencia a "folatos totales" expresándolos como ácido fólico. Esto puede dar lugar a error conceptual puesto que el ácido fólico como derivado monoglútamico no aparece de forma natural en los alimentos, sino que es la forma utilizada para el enriquecimiento de alimentos y para la elaboración de suplementos.

En cuanto a muestreo, número de muestras analizadas o áreas de procedencia de las muestras, no se ofrece información directa en ninguna de las TCA nacionales, excepto en la TCA del Ministerio donde sí se ofrece información detallada acerca del número de muestras tomadas, pero no del origen de dichas muestras. En todos los casos se relacionan citas bibliográficas

Tabla III
Datos de composición en folatos de alimentos vegetales generados por el grupo de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia y evaluación de los indicadores de calidad

<i>Vegetal</i>	<i>Contenido en folatos (µg/100 g peso fresco)</i>				<i>EFD</i>
	<i>THF</i>	<i>5-MTHF</i>	<i>5-FTHF</i>	<i>Folatos totales</i>	<i>µg de EFD</i>
Acelga fresca	Nd	148,6 ± 0,27	Nd	148,6 ± 0,27	148,6
Apio	1,8 ± 0,59	16,8 ± 1,13	Nd	18,6 ± 1,72	18,6
Brócoli	20,7 ± 0,68	71,4 ± 0,92	Nd	92,1 ± 0,60	92,1
Cebolla	Nd	16,8 ± 0,60	Nd	16,8 ± 0,60	16,8
Col de Bruselas	16,6 ± 2,39	38,8 ± 1,50	Nd	55,6 ± 1,31	55,6
Escarola fresca	Nd	106,9 ± 3,91	Nd	106,9 ± 3,91	106,9
Espárrago fresco	Nd	67,7 ± 2,25	Nd	67,7 ± 2,25	67,7
Espinaca fresca	Nd	183,3 ± 0,38	Nd	183,3 ± 0,38	183,3
Guisante					
• fresco	Nd	58,0 ± 3,56	Nd	58,0 ± 3,56	58,0
• congelado	Nd	59,6 ± 1,91	Nd	59,6 ± 1,91	59,6
• enlatado	Nd	31,0 ± 1,21	Nd	31,0 ± 1,21	31,0
Judías verdes	Nd	25,4 ± 2,14	Nd	25,4 ± 2,14	25,4
Lechuga fresca	4,6 ± 0,20	38,2 ± 6,54	Nd	42,8 ± 6,74	42,8
Pepino	6,9 ± 0,59	4,9 ± 0,49	Nd	11,8 ± 0,87	11,8
Perejil	Nd	182,0 ± 45,37	Nd	182,0 ± 45,37	182,0
Pimiento rojo	4,8 ± 2,16	36,8 ± 3,76	Nd	41,8 ± 5,84	41,8
Tomate rojo	Nd	16,2 ± 1,46	Nd	16,2 ± 1,46	16,2
Tomate verde	Nd	20,2 ± 0,12	Nd	20,2 ± 0,12	20,2

Criterios de evaluación de los datos Holden et al. 1997.	A: Método analítico	B: Control de calidad del análisis	C: Número de muestras	D: Tratamiento de la muestra	E: Plan de muestreo
	HPLC (16)	Ex, 90-100% cv ≤ 20%	6-8 muestras/alim, 3 análisis/muestra	Muestra liofilizada Hum: 88,01%	Origen, variedad (ver sección de Materiales y Métodos)
Valoración	3	2	2	3	1

Media y desviación estándar de 24 determinaciones, Abreviaturas de las formas de folatos: THF: tetrahidrofolato, 5-MTHF: 5 metil tetrahidrofolato, EDF: equivalente dietético de folatos. Ver apartado de Resultados y Discusión, Nd. No detectado o por debajo de los límites de detección.

cas a partir de las cuales se han obtenido los datos. De esta forma los datos debían ser evaluados en función de la información que las TCA consultadas ofrecían, insuficiente en los casos de (b), (c), y (d), no así en (a) y (e) donde toda la información venía especificada bien en la introducción o bien a lo largo de las Tablas. En las TCA españolas (b), (c) y (d) la información necesaria para someterlas a los criterios de Holden y col., no aparecía, o era sesgada o bien remitía al lector a citas bibliográficas. En la TCA (e) se ofrecía suficiente información, pero el número de alimentos evaluados era muy limitado no superando en muchos casos los 10 alimentos por grupo.

De esta manera, una vez seleccionadas y revisadas las TCA fueron sometidas a los criterios de Evaluación de Holden (tabla I), otorgándoseles así una puntuación que permitió observar que aquellas que recibían una menor puntuación total, en cuanto a la información referente a los datos de folatos, eran las TCA españolas (b), (c) y (d). Esto es debido a que, como ya se ha comentado anteriormente dichas TCA no especifican un método validado para la cuantificación de ácido fólico en alimentos (Método directo de elaboración de TCA), sino que para esta vitamina se basan en datos recopilados de la bibliografía (Método indirecto de elaboración de TCA). La puntuación más

alta corresponde a la TCA de McCance y Widdowson¹⁸ debido a que todos los datos requeridos en los Criterios de Evaluación son especificados con detalle, lo que otorga una puntuación de “2” o “3” en cada caso. También obtiene unos buenos resultados la TCA del Ministerio, debido a que presenta datos originales y ofrece información pertinente a todos los criterios (tabla II).

Sometiendo los datos obtenidos por la Universidad de Murcia para este trabajo a los mismos Criterios de Evaluación¹⁷, también se obtiene un resultado muy positivo, pero en este caso se ha de tener en cuenta que se trata de un listado de alimentos que aunque podrían dividirse en *grupos de alimentos* y adecuarlos más al formato normalizado ya establecido, en la actualidad constituyen solamente una lista de alimentos clave en los cuales se ha determinado el contenido de folatos siguiendo las pautas normalizadas para una TCA. No obstante, todos los criterios pueden obtener una puntuación aceptable como se demuestra en la Tabla III, ya que el método utilizado, es decir, determinación mediante HPLC, está totalmente validado¹⁶, de tal forma que toda la información en cuanto a recuperación (cuyos valores están en los límites de aceptabilidad de 90-100%), exactitud (también del 90-100% y coeficiente de variación $\leq 20\%$), repetibilidad, etc, están ampliamente descritos¹⁶. De igual manera, se conoce el número de muestras y el origen de las mismas, ya que se siguió un esquema similar para la obtención de los datos comenzando por el muestreo, de cada alimento se tomaban varias muestras cada una de las cuales era analizada por triplicado. El origen era obviamente conocido ya que las muestras eran adquiridas por el grupo de investigación para cada experimento o bien suministradas por las empresas colaboradoras, las cuales facilitaban siempre toda la información.

En cuanto a los valores obtenidos y presentados para cada alimento, ya se ha dicho que en el caso de todas las tablas consideradas se trataba de folatos totales, mientras que en el caso del método seguido en la UMU, los datos facilitados son la suma de las formas monoglucámicas 5-metiltetrahidrofolato y tetrahidrofolato, que son los compuestos presentes en verduras y hortalizas de forma natural y en mayor proporción, al tiempo que son las formas más estables³¹. En la tabla III se puede observar que en los alimentos en los que se detectaron estas dos formas la forma tetrahidrofolato aparece siempre como forma minoritaria, no superando en ningún caso el 50% de los folatos totales contenidos en ese alimento. El valor normal está entre un 10 y un 20% siendo el pepino y la col de Bruselas los que presentan mayor contenido alcanzado el 50% y 30% respectivamente. Estos datos han podido ser estimados debido a que el método cromatográfico permite la diferenciación de las diferentes formas químicas del ácido fólico, lo que facilita unos datos más exactos en comparación con otros métodos de análisis de folatos como es el caso del método microbiológico. Dicho método es el usado en la TCA (a) o de McCance and Widdowson, y presumiblemente los datos referidos en las TCA españolas (b), (c) y (d), debido a que los resultados que presentan son muy similares a los de la TCA (a) y es la referencia que aparece en la bibliografía. En el método microbiológico se cuantifica el nivel de folatos en función del crecimiento del microorganismo *Lactobacillus casei*, cloranfenicol resistente, de modo que en los datos finales pueden darse errores por sobrecrecimiento o inhibición debidos a otras sustancias, condiciones de cultivo, etc., de modo que otras sustancias que los resultados obtenidos por cromatografía son más exactos y fiables puesto que cuantifican las distintas formas químicas separadas.

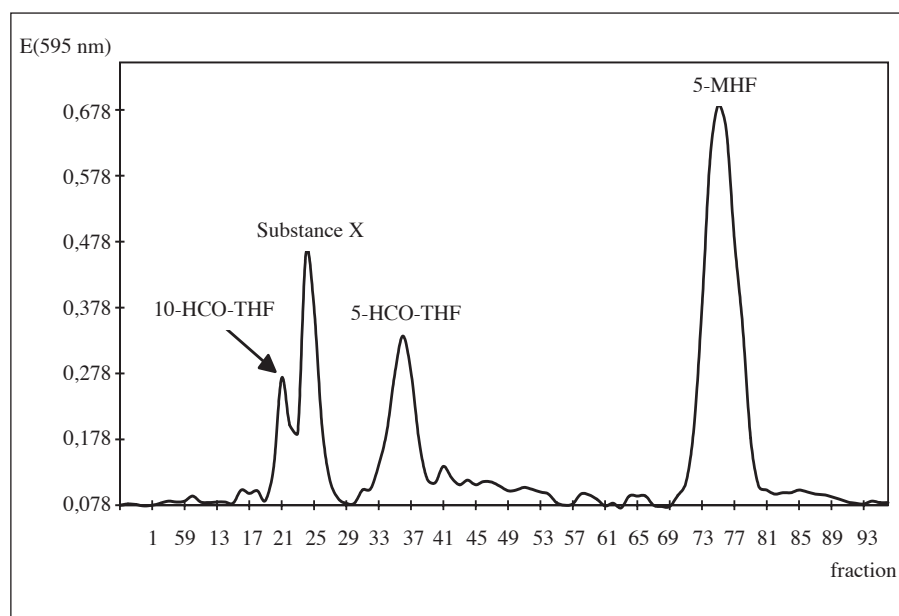


Fig. 1.— Cromatograma obtenido mediante la combinación de los métodos cromatográfico y microbiológico, donde se identifica un compuesto derivado del ácido fólico (Substance X) no identificado³².

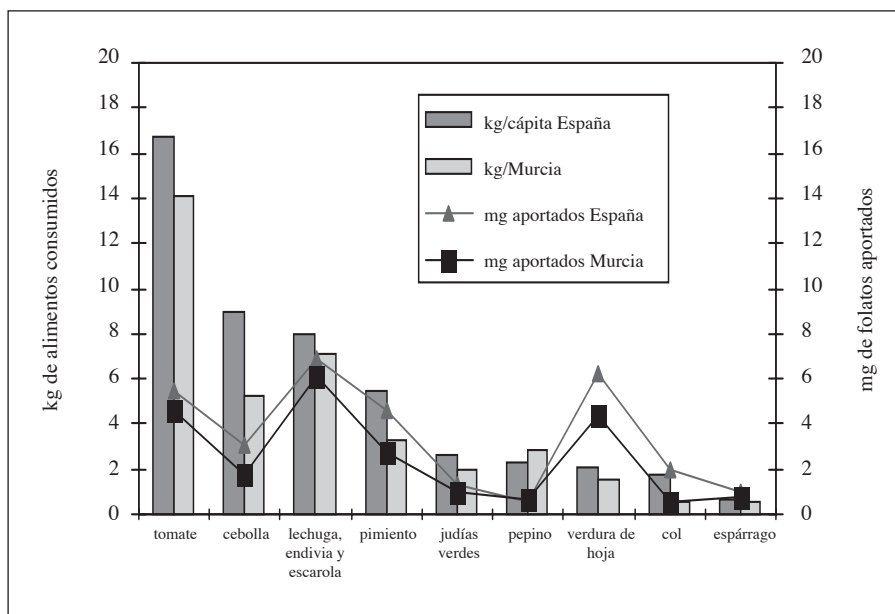


Fig. 2.- Datos de consumo de las verduras y hortalizas evaluadas, correspondientes a los valores de consumo registrados en España y Murcia en el año 2003 en kg., así como el aporte de folatos de dichos alimentos en mg³³.

Incluso es posible, mediante la combinación de los métodos cromatográfico y microbiológico, la separación de compuestos no identificados que pueden ser formas de transición o formas menos estables³² como es el caso de la muestra de verduras, concretamente espinacas, que viene representadas en la figura 1. En el caso de la TCA del Ministerio, se hace referencia a un método cromatográfico del que no se han hallado datos³⁰. En cuanto a los valores obtenidos y presentados para cada alimento, ya se ha dicho que en el caso de todas las tablas consideradas se trataba de folatos totales, mientras que en el caso del método seguido en la UMU, los datos facilitados son la suma de las formas monoglutámicas 5-metiltetrahidrofolato y tetrahidrofolato, que son los compuestos presentes en verduras y hortalizas de forma natural y en mayor proporción, al tiempo que son las formas más estables³¹. En la tabla III se puede observar que en los alimentos en los que se detectaron estas dos formas la forma tetrahidrofolato aparece siempre como forma minoritaria, no superando en ningún caso el 50% de los folatos totales contenidos en ese alimento. El valor normal está entre un 10 y un 20% siendo el pepino y la col de Bruselas los que presentan mayor contenido alcanzado el 50% y 30% respectivamente. Estos datos han podido ser estimados debido a que el método cromatográfico permite la diferenciación de las diferentes formas químicas del ácido fólico, lo que facilita unos datos más exactos en comparación con otros métodos de análisis de folatos como es el caso del método microbiológico. Dicho método es el usado en la TCA (a) o de McCance and Widdowson, y presumiblemente los datos referidos en las TCA españolas (b), (c) y (d), debido a que los resultados que presentan son muy similares a los de la TCA (a) y es la referencia que aparece en la bibliografía. En el método microbiológico

se cuantifica el nivel de folatos en función del crecimiento del microorganismo *Lactobacillus casei*, clo-ranfenicol resistente, de modo que en los datos finales pueden darse errores por sobrecrecimiento o inhibición debidos a otras sustancias, condiciones de cultivo, etc., de modo que otras sustancias que los resultados obtenidos por cromatografía son más exactos y fiables puesto que cuantifican las distintas formas químicas separadas. Incluso es posible, mediante la combinación de los métodos cromatográfico y microbiológico, la separación de compuestos no identificados que pueden ser formas de transición o formas menos estables³² como es el caso de la muestra de verduras, concretamente espinacas, que viene representadas en la Figura 1. En el caso de la TCA del Ministerio, se hace referencia a un método cromatográfico del que no se han hallado datos³⁰.

De esta manera y siguiendo la metodología, se recopiló toda la información obtenida del muestreo, del procesado de los alimentos, así como de los valores analíticos ensayados, de forma que sin ser una tabla, los datos de la UMU pudieron ser evaluados y también puntuados según los criterios de Holden y col. (1997)¹⁷. La puntuación obtenida se muestra en la Tabla III, donde se exponen las características de los distintos parámetros evaluados en los datos originales.

Una vez evaluadas las TCA, se observa que a pesar de las diferencias comentadas las verduras que poseen un mayor contenido de folatos son las mismas en todos los casos, destacando las espinacas, el brócoli o las acelgas. De esta manera se puede estimar cual es el aporte a la ingesta de los distintos alimentos evaluados en función de los datos de consumo. Sin embargo este aporte será variable en función de la TCA que se escoja. De esta manera, y realizando una estimación, se ha calculado la aportación a la ingesta de folatos a partir

de las verduras y hortalizas evaluadas. Se pudo observar que solamente teniendo en cuenta este grupo analizado el aporte diario de folatos supone un 25% de las Raciones Diarias Recomendadas (RDR) para esta vitamina, porcentaje al que habría que sumar el aporte del resto de frutas y verduras no evaluadas y del resto de componentes de la dieta. Se estimó de la misma forma el aporte de folatos de estas verduras en la Región de Murcia basados en los datos de consumo para el año 2003 en esta comunidad³³. Así en la figura 2 se puede observar que el consumo de verduras es similar en Murcia al estimado en el territorio nacional, de forma que el aporte de folatos a la dieta a partir de las verduras consideradas es principalmente realizado en ambos casos por tomates, “verduras de hoja ancha” considerándose bajo esta denominación las espinacas y las acelgas y por el grupo comprendido por lechugas, escarolas y endivias. No obstante, es necesario notar que no son estos grupos mayoritarios también en consumo, sino que se puede observar que en el caso del grupo verduras de hoja ancha el consumo es menor que el de judías verdes o pimiento, y sin embargo su aporte al total es muy superior debido a su elevado contenido en folatos.

En la actualidad como ya se ha comentado los datos se ofrecen en EFD, datos que se presentan en la tabla III correspondiente a los datos obtenidos en la UMU. En este caso los datos coinciden con los presentados en $\mu\text{g}/100\text{g}$ puesto que por definición se ha establecido que $1\mu\text{g}$ de folatos de alimentos es equivalente a $1\mu\text{g}$ de EFD.

Conclusiones

A la vista de la dificultad de obtener valores completos en la cuantificación de los folatos de los alimentos, se puede afirmar que no existe ninguna TCA que incluya datos completamente fiables en cuanto a la cantidad de folatos se refiere. Por ello, es necesario seguir desarrollando y mejorando estos métodos a fin de conseguir un consenso en cuanto a los valores de contenido de folatos de los alimentos.

Con el objetivo de unificar criterios y aumentar a calidad de las TCA se creó en Italia en 1983, un organismo denominado INFOODS (International Network of Food Data Systems). Los objetivos primordiales de este organismo eran la normalización tanto de la recogida y recopilación de datos como de la nomenclatura a utilizar, así como facilitar la identificación de los componentes de los alimentos.

Estos resultados muestran la importancia de conseguir un consenso en el método de determinación de folatos. Se sugiere así el método cromatográfico por ser en la actualidad ampliamente utilizado por numerosos laboratorios, por permitir la discriminación entre las diferentes formas químicas y por ser menos influenciado por factores externos que el método microbiológico. Otro aspecto a la vista de los datos evaluados es la necesidad de normalizar el muestreo

y el protocolo para desarrollar dicho método con el objetivo de obtener una tabla de composición de alimentos con datos más uniformes y, por tanto, más fiables en lo que respecta a esta vitamina, ya que a pesar de los avances llevados a cabo en el campo de las Tablas de Composición y Bases de Datos de Alimentos desde la creación del INFOOD y los diversos proyectos de investigación que surgieron a partir del mismo, no existe en lo que a folatos atañe unos datos uniformes y consensuados.

Una vez obtenidos los datos de composición, se debe plantear si la calidad de los mismos es la adecuada. La calidad se entiende como “el atributo de adecuación al propósito de utilización”¹⁵. De esta forma los datos deben ser representativos de los alimentos del ámbito al que van destinados; deben haber sido obtenidos a través de métodos analíticos apropiados y que hayan sido aplicados correctamente; y deben reflejar con exactitud la composición de los alimentos. Así lo que se debe considerar primordial a la hora de evaluar una TCA es el muestreo, el método analítico y la aplicación del método analítico. Está claro que para los valores de energía y macronutrientes los datos están sobradamente normalizados y consolidados. El problema surge cuando se trata de micronutrientes (vitaminas y minerales), como es el caso del ácido fólico en el que se centra este trabajo. Para estos compuestos nutricionales, los métodos de determinación son más complicados, más difícil su puesta a punto y validación; y, por tanto, la cuantificación de los mismos.

Agradecimientos

A la Comisión europea por la financiación del Proyecto: “Folate: From food to functionality and optimal health” (QLK1-1999-00576). Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la concesión de los Proyectos: AGL2000-2482-CE y AGL2003-03598 (Funcionalidad de los folatos naturales frente a suplementos en zumos de frutas y sopas de hortalizas).

Bibliografía

1. Ros G, Bernal MJ, Olivares AB, Periago MJ, Martínez C: Funcionalidad de los folatos en la dieta. *Nutrición y Obesidad* 2002, 5 (5): 223-37.
2. Gregory JF: Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv Food Nutr Res* 1989, 45: 263-335.
3. Wagner C: Biochemical role in cellular metabolism. In: Folate in Health and disease. Bailey, LB (ed.), 1995, pp. 23-42. Marcel Dekker, Inc., New York.
4. Herbert V: Biochemical and haematologic lesions in folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr* 1967, 20:562-569.
5. Hines JD, Halsted CH, Griggs RC, Harris JW: Megaloblastic anemia secondary to folate deficiency associated with hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1968, 68: 792-805.
6. Czeizel AE, Dudás I: Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N England J Med* 1992, 327:1832-1835.
7. Ubbink JB, Becker PJ, Vermaak WJ, Delport R: Results of B-vitamin supplementation study used in a prediction model to

- define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem* 1995, 11: 1033-1037.
8. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995, 274: 1049-57.
 9. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF et al.: Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *J Am Med Assoc* 1993, 270:2693-2698
 10. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, Reynolds RD, Kok FJ, Hennekens CH, Willett WC: Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: Relation with vitamins B6, B12 and folate. *Am J Epidemiol* 1996, 143: 845-859.
 11. Choi SW, Mason JB: Folate and carcinogenesis: as integrated scheme. *J Nutr* 2000, 130:129-132.
 12. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM: Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998, 55:1449-1455.
 13. Seshadri S, Beiser A, Selhub J: Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002, 346:476-483.
 14. Slimani N, Charronière UR, van Staveren W, Riboli E: Standardization of food composition databases for The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): General Theoretical Concept. *J Food Comp Anal* 2000, 1: 567-584.
 15. Farran-Codina, A: Desarrollo y aplicación de un sistema de información para la elaboración de Tablas de Composición de Alimentos. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad de Barcelona, 2004.
 16. Olivares AB, Bernal MJ, Ros G, Martínez C, Periago MJ: Folatos y su disponibilidad en alimentos evaluados por cromatografía líquida (HPLC). Validación y aplicaciones en calidad nutricional de alimentos. *An Vet (Murcia)* 2004, 20: 59-73.
 17. Holden J, Beecher R, Doherty R y Davis C: Beltsville Human nutrition Research Center, USDA. Evaluation system for the assessment of the quality of folate composition data foods. 16th International Congress of Nutrition. Montreal, Canadá, 1997.
 18. Holland B, Welch AA, Unwin ID, Buss DH, Paul AA y Southgate DAT: McCance and Widdowson's The Composition of foods. 5th (revised and extended) Ed. The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1994.
 19. Greenfield H, Southgate DAT: Food composition data: production, management and use. London: Elsevier Applied Science 1992.
 20. Southgate DAT: Guidelines for the preparation of tables of food composition. Basel: S. Karger, 1974, pp. 7-52.
 21. Farran A, Zamora R, Cervera P: Tablas de composición de alimentos del CESNID. Centro de Enseñanza de Nutrición y Dietética. Ed. Universitat de Barcelona. Mc Graw-Hill. Interamericana, 2003.
 22. Rand WM, Pennington JAT, Murphy SP, Klensin JC. Compiling data for food composition data bases. Tokyo: United Nations University Press, 1991.
 23. Institute of Medicine (IOM): Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, 1998, pp., 196-284. National Academy Press, Washington, D.C.
 24. West Suitor, C and Bailey, L B: Dietary folate equivalents: Interpretation and application. *J Am Diet Assoc* 2000, 100:88-94
 25. Sauberlich, HE, Kretsch, MJ, Skala, JH, Johnson, HL, Taylor, PC: Folate requirement and metabolism in non pregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987, 46:1016-1028.
 26. Phillips DR, Wright AJA: Studies on the response of *Lactobacillus casei* to folate vitamin in foods. *Br J Nutr* 1983, 49, 181-186.
 27. Bell, JG: Microbiological assay of vitamins of the B-group in foodstuffs. *Lab Pract* 1974, 23(5), 242-52.
 28. Mataix J, Mañas M, Llopis J, Martínez de Victoria E: Tabla de Composición de Alimentos Españoles. 2ª Edición. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Granada, 1995.
 29. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C: Tablas de composición de Alimentos. 7ª edición. Ed. Pirámide (Grupo Anaya S.A.), 2003.
 30. Shearer MJ. Vitamins, en HPLC Small Molecules, IRL Press, Oxford, 1986, pp. 162.
 31. Vahteristo L. Food folates and their analysis: Determination of folate derivatives and their stability by high-performance liquid chromatography. Doctoral Thesis. University of Helsinki, 1998.
 32. Kehlenbach U, Kariluoto S, Vahteristo L, Finglas P, Wright A, Ros-Berruazo G and Heinz N. Selective and sensitive determination of folate pattern in foodstuff using high performance liquid chromatography coupled with a microbiological assay. 30th Conference of the European Teratology Society. Hannover, Alemania, 2002.
 33. La Alimentación en España. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2004.