



Original / Vitaminas

Cuantificación de folato total en alimentos *ready-to-eat*

Violeta Fajardo Martín, Elena Alonso-Aperte y Gregorio Varela-Moreiras

Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud. Facultad de Farmacia. Universidad CEU San Pablo. Madrid. España.

Resumen

Introducción: Los productos *ready-to-eat*, ya cocinados, envasados y refrigerados, son cada vez más consumidos en nuestro país. Sin embargo, no existen estudios que cuantifiquen su disponibilidad comercial, composición e información detallada para poder estimar su impacto sobre las ingestas, particularmente de folatos, en los diferentes grupos de población.

Objetivos: La finalidad de este trabajo de investigación ha consistido en conocer la disponibilidad actual de alimentos *ready-to-eat* de base vegetal y aportar datos sobre el contenido de folato total de los mismos.

Métodos: La concentración de folato total se determinó en 17 productos precocinados refrigerados, con ingredientes vegetales, mediante el método microbiológico basado en el crecimiento del *Lactobacillus casei subespecie rhamnosus* resistente a cloranfenicol. La precisión del procedimiento analítico se comprobó mediante un material de referencia certificado y por una prueba de recuperación con ácido fólico tritiado.

Resultados y discusión: El contenido medio de FT varió desde 13,6 hasta 103,8 µg/100 g de peso fresco, siendo superior en hamburguesas vegetales, recetas con garbanzos, guisantes o alcachofas con jamón. Los alimentos se sometieron al tratamiento térmico indicado por el fabricante previo a su consumo, observándose que no existen pérdidas de folatos durante este último procesado. El coeficiente de variación de los duplicados del mismo producto fue inferior al 15%.

Conclusiones: Se presentan datos pioneros relativos al análisis de folatos en alimentos *ready-to-eat* en el mercado español, que ayudarán a evaluar la adecuación de la ingesta de folatos en la población. El contenido de folatos de estos productos, su facilidad de consumo y atractiva presentación, los convierte en fuentes potenciales de la vitamina.

(Nutr Hosp. 2013;28:1210-1218)
DOI:10.3305/nh.2013.28.4.6567

Palabras clave: Folatos. Alimentos de conveniencia. Productos *ready-to-eat*. Estado nutricional.

Correspondencia: Violeta Fajardo Martín.
Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud.
Facultad de Farmacia. Universidad CEU San Pablo.
Urb. Montepíncipe. Ctra. Boadilla del Monte, km. 5,3.
28668 Boadilla del Monte. Madrid. España.
E-mail: violeta.fajardomartin@ceu.es

Recibido: 11-III-2013.
Aceptado: 28-III-2013.

DETERMINATION OF FOLATE CONTENT IN READY-TO-EAT FOOD PRODUCTS

Abstract

Introduction: In the last years, the consumption of *ready-to-eat* foods has become an increasing part of the current Spanish diet. Accordingly, the nutritional composition of these food categories should be investigated in order to estimate its contribution to vitamin and nutrient intakes, in particular its folate content. The broad lack of folate data in food composition tables and databases justifies this approach.

Objectives: The aim of this work was to screen the current availability and to supply new folate data in *ready-to-eat* commercial products in the Spanish market.

Methods: Seventeen *ready-to-eat* foods, including mainly vegetable ingredients, were analysed for total folate content using a validated method that relies on *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* chloramphenicol-resistant folate dependent growth. The accuracy of the analytical procedure was checked using a certified reference material and by a recovery test.

Results: Mean TF content ranged from 13.6 to 103.8 µg/100 g in different food matrices on a fresh weight basis. Higher TF quantity was found for vegetable hamburgers, recipes including chickpeas, peas or artichokes. Selected precooked products were also analysed after a soft heat treatment as recommended by the manufacturer before its consumption. No significant differences were found in the folate content after processing. The coefficient of variation for the duplicates of the same product was less than 15%.

Conclusion: Folate content in *ready-to-eat* products indicates the potential to considerably increase folate intake by choosing folate-rich foods. There have been no previous reports on folate data in chilled *ready-to-eat* meals. The present data will assist dietary studies to estimate and evaluate the adequacy of population folate intakes.

(Nutr Hosp. 2013;28:1210-1218)
DOI:10.3305/nh.2013.28.4.6567

Key words: Folate. *Ready-to-eat* foods. Nutritional status.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AF: Ácido fólico.

ARN: Ácido ribonucleico.

DS: Desviación estándar.

FT: Folato total.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

L. casei ssp. *rhamnosus*: *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*.

LC-MS: Cromatografía combinada de líquidos-masas.

TCA: Tablas de Composición de los Alimentos.

TF: Total folate.

UV: Ultravioleta.

Introducción

El término “folatos” se utiliza de forma genérica para referirse a una familia de vitaminas hidrosolubles del grupo B, concretamente la vitamina B₉, que tienen estructura y propiedades nutricionales similares a las del ácido fólico (AF) y se encuentran mayoritariamente en vegetales de hoja ancha, algunas frutas, legumbres, huevos e hígado¹. Estas vitaminas son un componente esencial de la dieta, necesarias para la formación de las células de las series blanca y roja de la sangre, y las células epiteliales del tracto digestivo. Especialmente en estas células de rápida multiplicación, los folatos forman parte de las reacciones de transferencia de carbono, resaltando por su importancia las implicadas en el metabolismo del ADN, ARN y aminoácidos. Por tanto, debido a su destacada función metabólica, los folatos tienen una importante repercusión en la salud. En este sentido, se ha comprobado que el AF presenta una relevancia potencial en la prevención de diversas patologías. Juega un papel esencial reconocido en la prevención de malformaciones congénitas relacionadas con los defectos del tubo neural tal y como es la prevención de la aparición de espina bífida en neonatos. Además, existen claras evidencias epidemiológicas acerca de la relación entre una ingesta elevada de AF y la reducción de ciertos factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, así como la disminución en la aparición de ciertos tipos de cáncer. Estos hechos han potenciado la implantación de estrategias para aumentar la ingesta de folatos y AF a través de una correcta educación e información sobre la alimentación, la suplementación farmacológica y la fortificación obligatoria o voluntaria de numerosos alimentos^{1,2}.

Estudios recientes muestran, sin embargo, una situación subóptima en la ingesta y estado marginal o deficiente en la vitamina^{3,4}. Además, los posibles efectos adversos del AF sintético, tales como enmascarar los síntomas de la deficiencia de vitamina B₁₂ y ciertos tipos de cáncer abren el debate sobre los riesgos/beneficios de la fortificación obligatoria con AF, en países desarrollados⁵. En este sentido, y teniendo en cuenta

que los folatos presentes de forma natural en alimentos se ha demostrado que aumentan las concentraciones séricas de folato de manera similar al AF contenido en los alimentos fortificados⁵, el promover la ingesta de alimentos fuente de folatos naturales continúa siendo una estrategia potencial saludable para alcanzar un adecuado estado nutricional.

Cabe mencionar que los patrones de consumo alimentario en España se han modificado en los últimos años, como consecuencia de la demanda e inquietudes de los consumidores y siguiendo las tendencias que, con anterioridad, han manifestado otros países como Estados Unidos, Francia o Inglaterra. Los cambios en la composición de la unidad familiar, la incorporación de la mujer al mundo laboral, la influencia de otras culturas y la falta de tiempo para cocinar platos tradicionales, son tan sólo algunos de los factores que han contribuido a la transformación de los patrones de consumo tradicionales⁶. Una de estas nuevas tendencias es la aparición de *alimentos de conveniencia*, que responden a una necesidad de disminuir el esfuerzo y el tiempo empleados en la preparación de los alimentos. Entre estos últimos, destacan los productos *ready-to-eat*, ligeramente procesados o precocinados. En particular, los también denominados *alimentos de quinta gama*, son platos ya cocinados, que se comercializan envasados y refrigerados. Para su consumo se requiere, normalmente, un calentamiento previo, sin necesidad de grandes manipulaciones y muchas veces en el propio envase^{1,7}.

Los platos precocinados y preparados forman un conjunto muy variado de ofertas, con componentes y formas de conservación diferentes y con situaciones y perspectivas de mercado también muy diversas, por lo que resulta prácticamente imposible proporcionar cifras y tendencias generales, a pesar de que son los productos alimentarios que están experimentando una mayor expansión en la actualidad⁸. Asumiendo esa complejidad, puede indicarse que el mercado español de los platos preparados ronda las 490.000 toneladas, por un valor de unos 2.010 millones de €. Aproximadamente los platos congelados constituyen el 35% de todas esas ofertas en volumen y el 36,5% en valor⁸. Sin embargo, el segmento de los alimentos de quinta gama, de temperatura controlada, ha crecido notablemente en el lineal durante la última década, reclamando un espacio propio para competir así en igualdad de condiciones con los congelados. A su favor cuentan con una mayor imagen de “calidad”, con una presentación que se aproxima mucho más al producto elaborado en el hogar, de mayor frescura y, en general, con mejor imagen que los alimentos congelados, pero han de competir frente al menor precio y la larga tradición de estos últimos⁹. Entre las soluciones de comida refrigerada, las pizzas, sopas y cremas, recetas tradicionales, tortillas, ensaladas y asados destacan con mayores cuotas de venta y consumo⁸.

En el año 2006, la población española ya dedicó un 3,3% del gasto en alimentación en platos preparados,

cifra similar al dinero que se destinó a la adquisición de aceite de oliva, frutas y hortalizas transformadas, las patatas o las bebidas refrescantes. Y tan sólo un 1% menos que a la compra de leche¹⁰. Conforme a la información aportada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, a través del Panel de Consumo Alimentario, el consumo per cápita de platos preparados a nivel nacional en el año 2011 ascendió a, lo que supone un aumento del 0,5% respecto al año anterior y un 17,5% en los últimos cinco años⁸. A pesar de ello, el consumo de platos preparados por parte del consumidor español aún es muy reducido en el conjunto de Europa¹.

Sin embargo, a pesar de que el sector de los alimentos *ready-to-eat* tiene cada vez mayor relevancia y porcentaje en la dieta de los consumidores de países desarrollados, apenas existen estudios que cuantifiquen su disponibilidad comercial, composición nutricional e información detallada, para poder estimar su impacto sobre las ingestas en los diferentes grupos de población. En este sentido, cabe resaltar la falta de información acerca del contenido de AF o folatos de alimentos disponibles para el consumidor, fuente de folato natural o añadido, como los productos precocinados. Esta categoría de alimentos preparados se presentan como potencial alternativa a la hora de cubrir las necesidades de folatos.

Más aún, existe un interés emergente en el campo de la nutrición en implantar el concepto de “trazabilidad nutricional”, para que el propio ciudadano tenga criterio para poder discernir a la hora de adquirir los productos más o menos saludables. Este concepto aún no está tan implantado como en el área de la seguridad alimentaria, aunque es pionero no sólo a nivel español sino europeo, manifestándose la necesidad de saber qué le ocurre a los nutrientes desde la producción de los alimentos en la industria alimentaria hasta que éstos llegan al consumidor final, intentando controlar y optimizar las condiciones de conservación y tratamientos culinarios y tecnológicos aplicados a los mismos, para minimizar las pérdidas de estos nutrientes, en particular de algunos tan lábiles como los folatos¹². En este sentido, los productos de última generación, como los de quinta gama, ya han sido procesados por la industria y es importante conocer y comprobar la forma y cantidad presente de estos vitámeros en estos alimentos, así como su disponibilidad para calcular las necesidades reales en la dieta¹.

A la vista de estas consideraciones, el *objetivo* de este trabajo de investigación ha consistido en conocer la disponibilidad actual de alimentos *ready-to-eat* de base vegetal y aportar datos sobre el contenido de folato total de los mismos en el mercado español mediante la aplicación de un ensayo microbiológico validado.

Métodos

En la figura 1 se representa el esquema general de las etapas del método empleado para el análisis de folatos en alimentos *ready-to-eat*.

Adquisición y procesado de muestras

Diecisiete alimentos precocinados *ready-to-eat*, de matriz vegetal, se adquirieron en superficies de venta (super e hipermercados) de diferentes municipios de la Comunidad de Madrid. Dicha selección se realizó de acuerdo al hecho de que los alimentos de base vegetal contienen ingredientes con mayor cantidad de folatos naturales según las Tablas de Composición de Alimentos (TCA), existiendo un consenso a nivel científico internacional de que la promoción de los alimentos de origen y/o base vegetal puede constituir una magnífica estrategia para alcanzar las ingestas recomendadas de la vitamina, como fuentes naturales de la misma¹. Dos lotes diferentes de cada una de las recetas comerciales elegidas fueron homogeneizados, procesados y analizados por duplicado, tal y como se presentan en el envase y tras someterlos al calentamiento indicado por el fabricante previo a su consumo.

Todos los análisis se completaron en un tiempo inferior a un mes y se realizaron bajo luz tenue y minimizando el contacto con el oxígeno. Las muestras homogeneizadas se almacenaron alicuotadas con nitrógeno gaseoso a -20° C.

Determinación de humedad

Para cada uno de los lotes de cada una de las muestras seleccionadas, se determinó la humedad mediante el método oficial AOAC 950.46¹³ (fig. 1).

Extracción trienzimática de los alimentos *ready-to-eat*

El proceso de extracción trienzimático se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Martin et al.¹⁴ con modificaciones propuestas por Póo-Prieto et al.¹⁵ (fig. 1).

Las muestras fueron descongeladas y suspendidas en 10 volúmenes (p/v) de solución extractora constituida por tampón Tris-HCl a pH 7,4 que contenía 1% (p/v) de ascorbato sódico, 2-mercaptoetanol 5 mM como antioxidante y 0,02 µCi/ml de trazador tritiado de ácido fólico [3, 5, 7, 9-³H] purificado (69 Ci/mmol) (Moravek Biochemicals, Brea, CA, EE.UU), en tubos de centrífuga de polialómero (Beckman Instruments, Alemania). Los tubos se taparon y autoclavaron a 120° C (15 psi, 1.034 bares) durante 15 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo, se homogenizaron durante 40 s (Diach 600 homogenizer, Helidolph, Alemania) y se incubaron en un baño a 37° C, con agitación y protegiendo los tubos de la luz, junto con 1,25 ml de una solución de α-amilasa 20 mg/ml (*Bacillus* sp. (EC.3.2.1.1), Sigma) y 200 µl de conjugasa de plasma de rata (Laboratorios Charles River, Francia) durante 3 h; seguido por dos horas

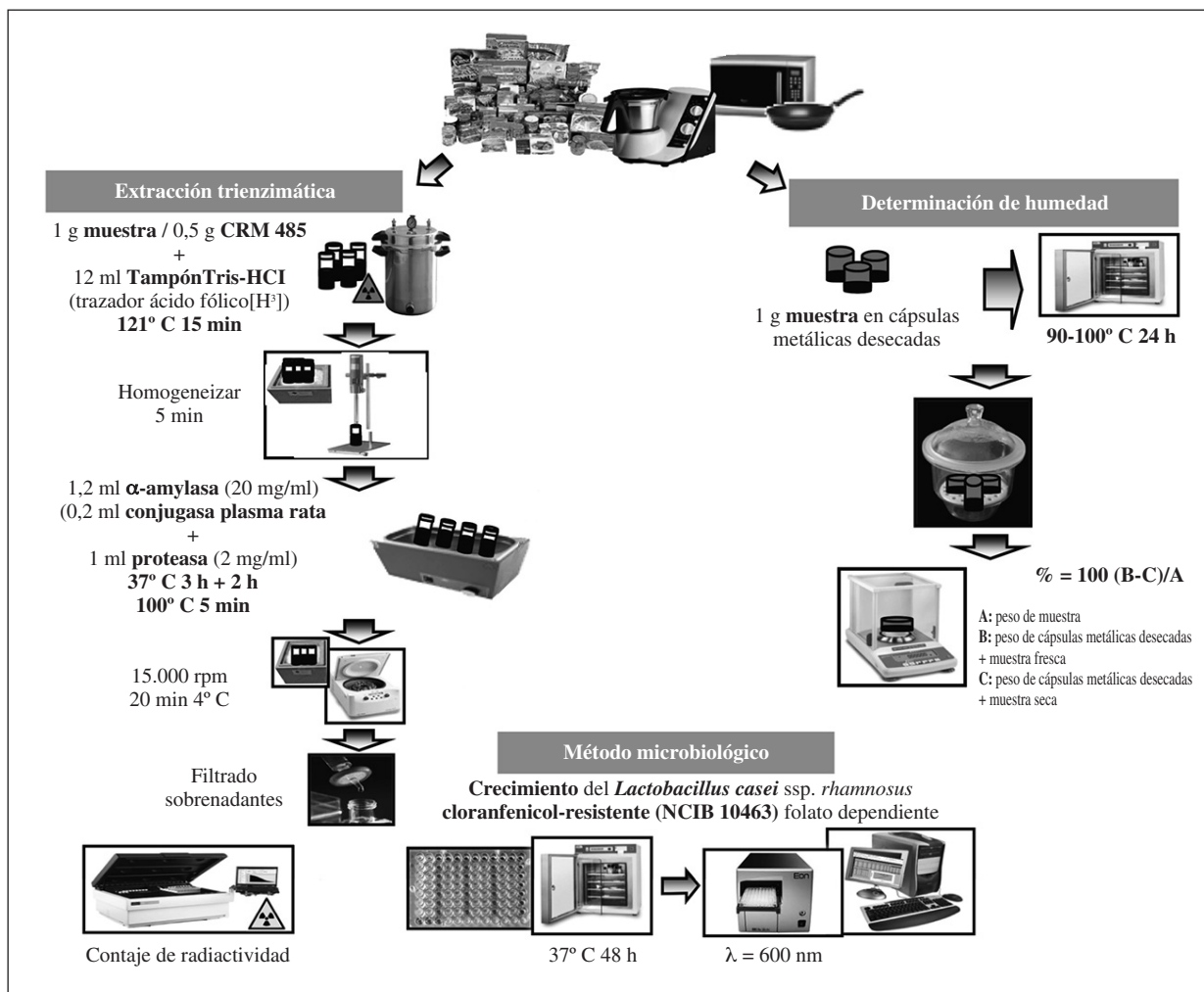


Fig. 1.—Esquema general del método desarrollado para el análisis de folatos y determinación de humedad en alimentos ready-to-eat (procesado de muestras, extracción trienzimática y ensayo microbiológico).

más de incubación en las mismas condiciones y añadiendo 1 ml de una solución de proteasa 2 mg/ml (type XIV, *Streptomyces griseus*, Sigma). La actividad de las enzimas añadidas a la suspensión se detuvo en un baño de agua a 100° C durante 5 min. A continuación, los homogeneizados se enfriaron en hielo y centrifugaron a 36.000 g durante 20 min a 4° C. Para finalizar, las fracciones sobrenadantes se filtraron con filtros de jeringa estériles (Millex-AA 0.8 m, Millipore, España). Una pequeña alícuota se separó para determinar su radiactividad y el resto se almacenó a -20° C para su posterior análisis.

Ensayo microbiológico con *L. casei* spp. *rhamnosus* cloranfenicol-resistente (NCIB 10463)

La concentración de folato total en los alimentos ready-to-eat seleccionados se determinó mediante la aplicación del método microbiológico basado en el crecimiento del *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* resistente a cloranfenicol (NCIB 10463), adap-

tado del método de O'Broin y Kelleher (1992)¹⁶ (fig. 1).

El microorganismo *L. casei* pp. *rhamnosus* cloranfenicol-resistente (NCIB 10463), se adquirió en forma de liofilizado a la *National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd.* (Escocia, Reino Unido). El proceso de crioprotección se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Wilson y Horne¹⁷.

Los valores de absorbancia obtenidos de las muestras incubadas a 37° C durante 42 h en placas estériles de 96 pocillos (Costar 3596, Corning Inc., Tewksbury, MA, USA) con *Folic Acid Medium Casei* (FACM) (Difco, Becton Dickinson and Co., Sparks, Md.) se determinaron en un lector de placas automático a 620 nm (Digiscan Reader, AsysHitech, Austria). Las concentraciones de las soluciones estándar de trabajo elaboradas por disolución de AF (Sigma) en 0,01 mol/L de NaOH (20 mmol/L) y tamponadas a pH 7,0 se establecieron por absorción UV a 282 nm para AF y un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 27.000 mol⁻¹ cm⁻¹. A partir de la solución madre de AF se construyó para cada día de ensayo una curva de calibrado con 8 puntos.

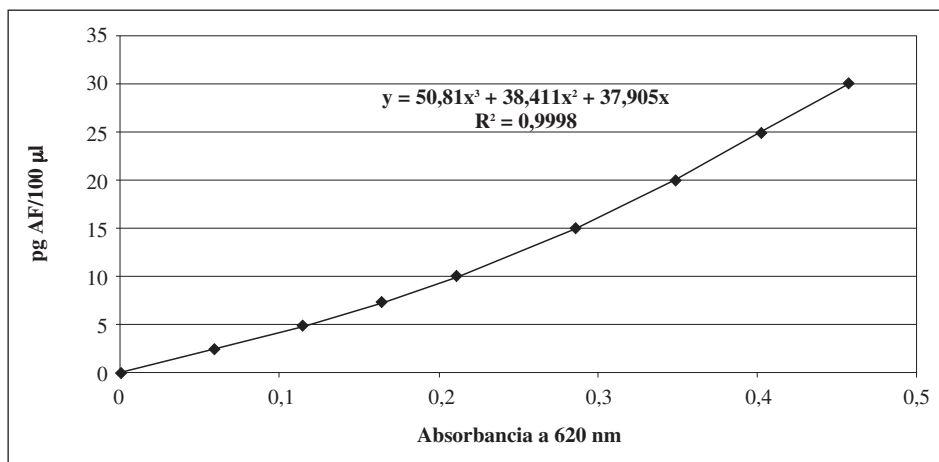


Fig. 2.—Linealidad del método microbiológico con *L. casei* spp. *rhamnosus* cloranfenicol-resistente (NCIB 10463).

Control de calidad y análisis estadístico

Control de calidad externo

La precisión del método se estableció mediante el empleo del Estándar Internacional para folato en suero (*WHO 1st Serum folate International Standard IS 03/178, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, Reino Unido*), cuyo valor certificado de identidad es de 5,33 ng/ml de folato total¹⁸.

Controles de calidad internos

A partir de los extractos trienzimáticos obtenidos se prepararon diluciones a concentraciones baja, media y alta (≈30, 75 y 100 µg/100 g) de folatos totales para utilizarlos como controles de calidad cada día de ensayo y en paralelo junto con las muestras. Alícuotas codificadas fueron almacenadas a -80° C.

La repetibilidad y precisión intra e inter-ensayo se determinó mediante el análisis, junto con las muestras y de manera repetitiva, de porciones del Material de Certificado de Referencia CRM 485 (*Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Bélgica*) utilizado en la validación de métodos para determinación de vitaminas en matrices alimentarias similares¹⁹.

La adecuación del proceso de extracción se controló a través de experimentos de recuperación con el mencionado trazador de AF tritado.

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos alcanzados permitió la validación de los resultados a través del análisis de linealidad, precisión, exactitud y recuperación del método de cuantificación²⁰. Éste se llevó a cabo con el programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS) version 17. Los resultados se presentaron como medias ± desviación estándar (DS).

Resultados

Precisión, exactitud y repetibilidad del método microbiológico

El tratamiento estadístico de los datos alcanzados permitió la validación de los resultados a través del estudio de la linealidad, la precisión inter e intra-ensayo y exactitud del procedimiento analítico. La recuperación del método se comprobó mediante el uso de ácido fólico (AF) tritado.

Linealidad

El crecimiento de *L. casei* spp. *rhamnosus* cloranfenicol-resistente (NCIB 10463) resultó lineal frente a concentraciones entre 0 y 300 pg/ml de AF (0-30 pg/100 µl), con un coeficiente de regresión de $R^2 = 0,99$ tal como se observa en la figura 2.

Se analizaron los extractos trienzimáticos de las enzimas utilizadas en el ensayo (α -amilasa, proteasa y conjugasa de plasma de rata), los cuales no presentaron niveles cuantificables de folatos, con lo cual se confirmó, que su adición en el ensayo trienzimático no aporta folatos endógenos.

Precisión inter- e intra-ensayo

Control de calidad externo

Tras el análisis del estándar externo (*WHO International Standard*), los resultados obtenidos $5,12 \pm 0,38$ ng/ml (CV = 7,5%) se consideraron adecuados frente al valor certificado de 5,33 ng/ml de folato total (FT)²⁰.

Controles de calidad internos

La repetibilidad del ensayo microbiológico se comprobó tras obtener resultados reproducibles al analizar en

Tabla I
 Precisión del método microbiológico con *L. casei* spp. *rhamnosus* (NCIB 10463): coeficiente de variación intra- e inter-ensayo y contenido en folato total del material estándar de referencia CRM 485^a

Material Referencia Certificado	Folato total intra-ensayo ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) ^b	CV (%)	Folato total inter-ensayo ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) ^b	CV (%)
CRM 485	301,90 \pm 26,72 (n = 5)	8,85	316,07 \pm 27,65 (n = 20)	13,81

^aCRM 485: Material Certificado de Referencia (IRMM), Mezcla liofilizada de vegetales. Valor de referencia certificado para FT = 315 \pm 28 $\mu\text{g}/100\text{ g}$.

^bCada resultado representa la media \pm DS de n extractos trienzimáticos independientes y cuantificación por el método microbiológico.

paralelo, junto con las muestras objeto de estudio, tres concentraciones diferentes (baja, media y alta) de folatos totales procedentes de extractos trienzimáticos de los alimentos seleccionados. Es necesario ajustar la dilución de las muestras dentro de este rango de concentraciones de FT elegidas como controles de calidad internos para su ensayo por este método (resultados no mostrados).

Además, la variación intra- e inter-ensayo se determinó analizando los extractos del Material Certificado de Referencia CRM 485 sometidos al tratamiento trienzimático en paralelo a las muestras problema (tabla I), mediante los cuales se controló todo el proceso de extracción y cuantificación de FT a lo largo del periodo de análisis. Este material de referencia se basa en una mezcla de vegetales (maíz dulce, tomate y zanahoria) liofilizada, cuya concentración de folato mayoritaria es la forma natural de esta vitamina presente en los alimentos (5-metil-tetrahydrofolato).

La adecuación del proceso de extracción se comprobó a través de experimentos de recuperación con el trazador de AF tritiado. Los valores de recuperación obtenidos (97,8 \pm 5,53%) se consideraron aceptables de acuerdo a lo estipulado por la AOAC²¹.

Análisis de folato total mediante ensayo microbiológico

La tabla II muestra los resultados medios de FT obtenidos tras el análisis de los 17 productos alimenticios *ready-to-eat* seleccionados mediante el método microbiológico basado en el crecimiento *L. casei* spp. *rhamnosus* resistente a cloranfenicol (NCIB 10463). El contenido medio de FT varió desde 13,6 hasta 103,8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso fresco, siendo superior en hamburguesas vegetales, recetas con garbanzos, guisantes o alcachofas.

Tabla II
 Contenido de folato total en alimentos *ready-to-eat*

Nombre del producto	Ración declarada (g)	Folato total estimado ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Folato total ($\mu\text{g}/100\text{ g SF}$) ^a	Folato total por ración estándar (μg) ^b
Hamburguesa de verduras	100 x 2	ND	103,8* \pm 21,21	103,8 \pm 21,21
Callos con garbanzos	450	20	85,0 \pm 3,59	382,5 \pm 3,89
Empanada de brocoli	100	20	56,8 \pm 8,46	56,8 \pm 8,46
Guisantes con jamón	300	60	50,6 \pm 1,06	151,8 \pm 1,06
Alcachofas con jamón	225	11,05	49,8 \pm 0,63	112,05 \pm 0,63
Hamburguesa vegetal de queso y brocoli	75 x 2	25	47,9 \pm 1,20	35,9 \pm 1,20
Cocido	500	90	30,1 \pm 0,99	150,5 \pm 0,99
Garbanzos con espinacas	250	130	29,3 \pm 0,92	11,72 \pm 0,92
Hamburguesa vegetal de tofu y espinacas	75 x 2	26	27,5 \pm 0,21	20,6 \pm 0,21
Empanada de hortalizas	400	ND	22,2* \pm 7,63	88,8 \pm 7,63
Alcachofas salteadas	225	11,05	20,9 \pm 2,33	47,0 \pm 2,33
Barritas de tofu, queso y espinacas	180	40	19,3 \pm 1,27	34,7 \pm 1,27
Hamburguesa vegetal de tofu, espinacas y queso	75 x 2	26	18,2 \pm 1,98	13,6 \pm 1,98
Menestra de verduras salteadas	250	11	17,5 \pm 0,14	43,7 \pm 0,14
Pisto de verduras	250	16	14,6 \pm 1,06	36,5 \pm 1,06
Judías verdes salteadas	250	65	14,1 \pm 1,41	36,0 \pm 1,41
Lentejas estofadas	250	30	13,3* \pm 3,88	34,0 \pm 3,88

^aCada resultado representa la media \pm DS de dos extractos trienzimáticos independientes procedentes de dos lotes diferentes de cada uno de los productos *ready-to-eat* analizados; ND: No determinado.

^bSegún la indicada por el fabricante.

*Valores de coeficiente de variación superiores al 15%; SF: Sustancia fresca; Folato estimado: contenido de folatos calculado a partir de los datos publicados en TCA^{22,23} de acuerdo a los ingredientes mostrados en el etiquetado de cada producto.

Tabla III
Contenido de folato total en alimentos ready-to-eat antes y después del acondicionamiento previo a su consumo

Nombre del producto	Folato total ($\mu\text{g}/100\text{ g SF}$) ^a		Humedad (%) ^a		Folato total ($\mu\text{g}/100\text{ g SS}$) ^a	
	Envase	Precautado	Envase	Precautado	Envase	Precautado
Hamburguesa de verduras	103,8* \pm 21,21	82,0 \pm 6,22	60,63 \pm 0,48	57,80 \pm 0,33	263,65*	194,31
Callos con garbanzos	85,0 \pm 3,89	89,9 \pm 6,08	74,74 \pm 0,25	73,01 \pm 0,11	336,50	333,09
Empanada de brocoli	56,8 \pm 8,46	50,5 \pm 2,47	49,52 \pm 2,13	48,64 \pm 4,39	112,52	98,33
Guisantes con jamón	50,6 \pm 1,06	35,2 \pm 2,54	71,2 \pm 0,21	69,08 \pm 0,03	175,69	113,84
Alcachofas con jamón	49,8 \pm 0,63	40,4 \pm 2,05	75,86 \pm 0,26	69,10 \pm 1,12	206,30	130,74
Hamburguesa vegetal de queso y brocoli	47,9 \pm 1,20	23,1* \pm 2,82	62,23 \pm 0,14	54,30 \pm 0,09	126,82	50,55
Cocido	30,1 \pm 0,99	34,2 \pm 2,68	72,30 \pm 0,09	71,73 \pm 0,14	108,3	120,98
Garbanzos con espinacas	29,3 \pm 0,92	23,2 \pm 0,63	78,13 \pm 0,61	77,17 \pm 0,79	133,97	101,62
Hamburguesa vegetal de tofu y espinacas	27,5 \pm 0,21	35,0 \pm 0,85	59,49 \pm 0,16	55,57 \pm 0,16	67,88	78,78
Alcachofas salteadas	20,9 \pm 2,33	19,0 \pm 2,75	69,68 \pm 0,33	72,89 \pm 1,36	68,93	70,08
Barritas de tofu, queso y espinacas	19,3 \pm 1,27	12,6 \pm 0,07	56,04 \pm 0,19	50,16 \pm 0,51	43,90	34,51
Hamburguesa vegetal de tofu, espinacas y queso	18,2 \pm 1,98	17,2 \pm 1,41	52,87 \pm 0,85	49,91 \pm 1,18	38,62	34,34
Menestra de verduras salteadas	17,5 \pm 0,14	20,0 \pm 3,25	88,98 \pm 0,09	87,02 \pm 0,16	158,80	154,08
Pisto de verduras	14,6 \pm 1,06	16,7 \pm 4,88	87,53 \pm 0,15	87,90 \pm 0,12	117,08	138,02
Judías verdes salteadas	14,1 \pm 1,41	13,3 \pm 0,85	77,14 \pm 0,05	76,16 \pm 0,02	61,68	55,79
Lentejas estofadas	13,3* \pm 3,88	18,1* \pm 2,19	81,37 \pm 0,08	80,91 \pm 0,09	73,00*	94,81*

^aCada resultado representa la media \pm DS de dos extractos trienzimáticos independientes procedentes de dos lotes diferentes de cada uno de los productos *ready-to-eat* analizados; ND: No determinado.

*Valores de coeficiente de variación superiores al 15%; SF: Sustancia fresca; SS: Sustancia seca.

Cada resultado representa la media \pm desviación estándar (DS) de dos extractos trienzimáticos independientes procedentes de la homogenización de dos lotes diferentes de cada uno de los productos precocinados seleccionados, de los cuales varias alícuotas se analizaron mediante ensayo microbiológico. El coeficiente de variación de los duplicados analizados del mismo producto fue inferior al 15%, salvo en algunos productos difíciles de homogeneizar, marcados en la tabla (*).

Asimismo, aclarar que el término “folato estimado” hace referencia al contenido de folatos calculado a partir de los datos publicados en las Tablas de Composición de Alimentos (TCA) consultadas^{22,23} de acuerdo a los ingredientes mostrados en el etiquetado de cada producto, el cual, en la mayoría de los casos, es bastante deficiente e incluso inexistente en algunos casos (Ej. empanada de hortalizas).

Por otro lado, como se detalla en el apartado de “Métodos”, los alimentos se sometieron al tratamiento térmico indicado por el fabricante previo a su consumo. Observándose, tras el ajuste de los valores obtenidos con los datos de humedad, que no existen pérdidas de folatos significativas durante este calentamiento (tabla III).

Discusión

Debido al importante papel que desempeña en el metabolismo, existen numerosas situaciones fisiológicas y patologías relacionadas con la ingesta insuficiente

de ácido fólico (AF) y folatos. Presentan un papel esencial reconocido en la prevención de los defectos del tubo neural, tal como la reducción de la aparición de espina bífida en neonatos, en la disminución del riesgo a padecer ciertos tipos de cáncer, y existen evidencias epidemiológicas que sugieren que niveles elevados de homocisteína en plasma ($> 15\ \mu\text{mol/L}$) constituyen un factor de riesgo independiente para las enfermedades cardiovasculares². Por lo tanto, es esencial poseer un correcto *status* de folatos, y alcanzar unos niveles adecuados en plasma a través de una adecuada ingesta alimentaria. Para ello, es imprescindible conocer la cantidad de folatos que contienen los alimentos, con el fin de adecuar la dieta a los niveles que de la vitamina se precisan^{1,24}. Además, no debe olvidarse que en el caso de los alimentos, y sobre todo los de base mayoritaria vegetal, éstos no aportan sólo el nutriente *target* sino otros componentes bioactivos igualmente relevantes¹¹.

Actualmente, los datos disponibles de contenido de folatos en alimentos *ready-to-eat* son muy escasos. Sin embargo, en los últimos años, se ha observado en España una fuerte irrupción de este tipo de alimentos. En este contexto, su presencia pone de manifiesto la continua evolución de la oferta de la industria alimentaria y la dificultad para recopilar Bases de Datos que den lugar a Tablas de Composición de Alimentos (TCA) precisas y actualizadas^{1,25}.

Teniendo en cuenta estos aspectos, con el fin de aportar datos muy novedosos sobre el contenido de folato total (FT), se han analizado alimentos *ready-to-*

eat disponibles en el mercado español mediante la aplicación de un ensayo microbiológico validado.

El contenido medio de FT cuantificado tras el análisis de las 17 recetas *ready-to-eat* analizadas mediante método microbiológico fue muy variable según la composición de las mismas (13,6-103,8 µg/100 g peso fresco), siendo superior en hamburguesas vegetales, recetas con garbanzos, guisantes o alcachofas (tabla II). Hasta el momento, apenas se disponen de datos publicados acerca del contenido de folatos para alimentos precocinados, por lo que es difícil comparar los datos obtenidos con los valores presentes en las TCA más usadas en nuestro país^{22,23}. En éstas se encontraron las discrepancias de nomenclaturas para los folatos que resaltan Bouckaert et al.²⁵, además de la ausencia o escasez de datos para los nuevos productos, tales como comidas cocinadas o listas para consumir. Por tanto, los datos de “folato estimado” detallados en la tabla II representan valores de las TCA consultadas en relación a alimentos crudos, ya que apenas existen datos sobre este tipo de productos. Al respecto, cabe mencionar que la complicada composición, característica de los productos *ready-to-eat* (multitud de ingredientes, conservantes, etc.), hace difícil estandarizar las recetas para aportar datos fiables y homogéneos por países¹. Así, en algunos casos, el dato de “folato estimado” no se pudo determinar ya que los datos recogidos en el etiquetado no informan detalladamente acerca de la composición del producto, sobre todo de forma cuantitativa. En este sentido, Olivares et al.²⁶ evaluaron la calidad de los datos de composición de folatos en TCA españolas, encontrando entre éstas marcadas diferencias y/o falta de consenso. Es necesario actualizar TCA y bases de datos con el contenido de folatos de los distintos alimentos de acuerdo a proyectos europeos como *The European Food Information Resource network of Excellence (EuroFIR)*, que busca aportar y homogeneizar datos actuales de composición en nutrientes de diferentes alimentos para construir una base de datos de nutrientes europea²⁵.

La calidad de los datos de folato obtenidos al analizar alimentos depende también de la elección del método de análisis. Varios estudios sugieren que los valores de datos publicados se derivan de los procedimientos de ensayo que subestiman el contenido de folato en los alimentos^{27,28}. Todos los métodos disponibles poseen limitaciones, ya que existen ciertas formas químicas derivadas que pueden no ser cuantificadas y, en otros casos, se sobrestima la realidad del contenido de esta vitamina por diferencias en la afinidad de los distintos vitámeros^{15,24}.

Desde hace más de 40 años, el método microbiológico ha sido considerado como el método más práctico y útil para medir concentraciones de FT en alimentos, siendo la técnica oficial aprobada por la AOAC. Este procedimiento se basa en la cuantificación del crecimiento del microorganismo folato dependiente *L. caseis* pp. *rhamnosus*, el cual es proporcional a la concentración de dicha vitamina y se mide en función del

aumento en la turbidez de las soluciones incubadas²⁹. La respuesta del microorganismo es similar para mono, di y tri-glutamatos, pero más lenta para poliglutamatos de cadena larga. Por este motivo, es necesaria la deconjugación incluida en la extracción trienzimática descrita en el apartado de “Métodos”³⁰. Akilanathan et al.³¹ apoyan la introducción del tratamiento trienzimático en el protocolo de análisis de folatos en alimentos, ya que la adición de α -amilasa y proteasa mejora la liberación de folato atrapado en la matrices alimentarias proteicas o ricas en oligosacáridos, además de la deconjugación con la enzima conjugasa, para aumentar el rendimiento en la obtención de los folatos presentes en los alimentos analizados. De esta forma, el ensayo microbiológico nos proporciona la cuantificación de FT de la muestra incluyendo las formas naturales y, si existe, el AF añadido, pero no puede diferenciar entre formas distintas de folatos. Otros métodos para cuantificar folatos en alimentos son la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y los ensayos enzimáticos con proteínas ligante de folatos¹. Estos métodos permiten discriminar las distintas especies de la vitamina en los alimentos ya que existe una aparente menor disponibilidad de las formas poliglutámicas frente a las monoglutámicas de los folatos, así como la posible diferencia en la biodisponibilidad de los diversos vitámeros. De forma similar, también se están perfeccionando técnicas para la determinación en cromatografía combinada de líquidos-masas (LC-MS) para permitir una mayor certeza en la determinación de la especie química de folato. Sin embargo, estos métodos aportan limitados resultados en cuanto a datos sobre FT en los alimentos²⁴.

La cuantificación de folato por diversos métodos también varía en función del tratamiento culinario empleado y del alimento. La tabla III muestra que no existen pérdidas significativas de folatos, tras el ajuste de los valores obtenidos con los datos de humedad, cuando los alimentos *ready-to-eat* objeto de estudio se sometieron al tratamiento térmico indicado por el fabricante previo a su consumo. Por lo tanto, este último procesado no afecta al contenido de folatos de estos alimentos. Sin embargo, algunos estudios previos han demostrado que se producen pérdidas de estos vitámeros tras el cocinado, debido a la solubilización de los mismos en los líquidos de cocinado o por acción del calor en presencia de oxígeno³²⁻³⁴.

Por todas estas razones, en la actualidad, existe una necesidad no sólo de mejorar, sino también de proporcionar nuevos datos de FT y las formas individuales de folato en dietas mixtas que contienen alimentos *ready-to-eat*, para estimar su aportación en la alimentación actual^{11,35}.

Conclusiones

Debido a la escasez de datos relativos al contenido de folatos en las Tablas de Composición de los Alimen-

tos actuales, en este trabajo de investigación se presenta el análisis de alimentos *ready-to-eat*, cada vez más populares en nuestro país. El contenido de folatos de estos productos, su facilidad de consumo y atractiva presentación, los convierte en fuentes potenciales de folato. Estos datos preliminares pueden ser útiles para evaluar la adecuación de la ingesta de folatos en la población, y proporcionar una información pionera en nuestro país en un tema emergente y de gran actualidad.

Agradecimientos

Violeta Fajardo cuenta con un contrato Postdoctoral del Subprograma Juan de la Cierva (Ministerio de Economía y Competitividad, Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, España).

Referencias

- Fajardo V, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Lack of data on Folate in convenience foods: Should ready-to-eat products be considered relevant for folate intake? The European challenge. *J Food Comp Ana* 2012; 28: 155-63.
- Fajardo V, Varela-Moreiras G. Efficacy of adding folic Acid to foods. *Int J Vit Nutr Res* 2012; 82: 177-86.
- Flynn A, Hirvonen T, Mensink GB, Ocké MC, Serra-Majem L, Stos K et al. Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food Nutr Res* 2009; 53: 1-51.
- Elmadfa I, Freisling H. Nutritional status in: methods and results. *Nutr Rev* 2009; 67: S130-S134.
- Ashfield-Watt PAL, Whiting JM, Clark ZE, Moat SJ, Newcombe RG, Burr ML et al. A comparison of the effect of advice to eat either /'5-a-day/' fruit and vegetables or folic acid-fortified foods on plasma folate and homocysteine. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 316-23.
- Ahlgren M, Gustafsson IB, Hall G. Attitudes and beliefs directed towards ready-meal consumption. *Food Service Technol* 2004; 4: 159-69.
- Achón M, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G, García A. Alimentos precocinados. Madrid: Gráficas Jomagar, S.L., 2007.
- Mercasa. Platos precocinados y preparados. In: Mercasa. Alimentación en España 2011. Madrid: Mercasa, 2011: 392-8.
- Aparicio A, García, MJ. Alimentos de futuro: cuarta y quinta gama. Avilés: Aliformastur, 2005.
- MARM. La Alimentación en España 2006. Panel de Consumo Alimentario. Estudios sobre la comercialización Agroalimentaria en España. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MARM), 2006.
- Ros G, Martínez de Victoria E, Farran A. Spanish food composition database: A challenge for a consensus. *Food Chem* 2009; 113: 789-94.
- Costa HS, Vasilopoulou E, Trichopoulou A, Finglas P, Participants of EuroFIR Traditional Foods Work Package. New nutritional data on traditional foods for European food composition databases. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: S73-S81.
- AOAC. AOAC Official Method. *JAOAC* 1950; 33: 749.
- Martin JI, Landen WO, Soliman AGM, Eitenmiller RR. Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. *J Assoc Off Anal Chem* 1990; 73: 805-8.
- Póo-Prieto R, Haytowitz DB, Holden JM, Rogers G, Choumenkovitch SF, Jacques PF, Selhub J. Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products. *J Nutr* 2006; 136: 3079-83.
- O'Broin S, Kelleher B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. *J Clin Pathol* 1992; 45: 344-7.
- Wilson SD, Horne DW. Use of glycerol-crioprotected *Lactobacillus casei* for microbiological assay of folic acid. *Clin Chem* 1982; 28: 1198-200.
- WHO International Standard Vitamin B12 And Serum Folate NIBSC code: 03/178 Instructions for use (Version 2.0, Dated 04/04/2008) 2008.
- Koontz JL, Phillips KM, Wunderlich KM, Exler J, Holden JM, Gebhardt SE. Comparison of total folate concentrations in foods determined by microbiological assay at several experienced U.S. commercial laboratories. *JAOAC Int* 2005; 88: 805-13.
- Samaniego-Vaesken ML, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market. *J Food Comp Anal* 2010; 23: 419-23.
- AOAC. Peer verified methods program. Manual on Procedures. AOAC International, 1998.
- Moreiras O, Carvajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de Composición de Alimentos 14.ª edn. Madrid: Pirámide, 2010.
- Base de Datos Española de Composición de Alimentos <http://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Olivares AB, Ros GF, Periago MJ, Martínez C, Bernal MJ. Valoración de la biodisponibilidad de folatos en la dieta. *ANS* 2004; 11: 49-60.
- Bouckaert KP, Slimani N, Nicolas G, Vignat J, Wright AJA, Roe M et al. Critical evaluation of folate data in European and international databases: recommendations for standardization in international nutritional studies. *Mol Nutr Food Research* 2011; 55: 166-80.
- Olivares AB, Bernal MJ, Ros G, Martínez C, Periago MJ. Quality of data on folic acid content in vegetables included in several Spanish food composition tables and new data on their folate content. *Nutr Hosp* 2006; 21: 97-108.
- Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends Food Sci Technol* 2005; 16: 253-66.
- Samaniego-Vaesken ML, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos. *Nutr Hosp* 2009; 24: 459-66.
- Finglas PM, Faure U, Southgate DAT. First BCR-intercomparison on the determination of folates in food. *Food Chem* 1993; 46: 199-213.
- Hyun TH, Tamura T. Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: An updated review. *Exp Biol Med* 2005; 230: 444-54.
- Akilanathan L, Vishnumohan S, Arcot J, Uthira L, Ramachandran S. Total folate: diversity within fruit varieties commonly consumed in India. *Int J Food Sci Nutr* 2010; 61: 463-72.
- Bassett MN, Sammán NC. Folate content and retention in selected raw and processed foods. *ALAN* 2010; 60: 298-305.
- Agte V, Tarwadi K, Mengale S, Hinge A, Chiplonkar S. Vitamin profile of cooked foods: how healthy is the practice of ready-to-eat foods? *Int J Food Sci Nutr* 2002; 53: 197-208.
- Dang J, Arcot J, Shrestha A. Folate retention in selected processed legumes. *Food Chem* 2000; 68: 295-8.
- Uusitalo U, Kronberg-Kippilä C, Aronsson CA, Schakel S, Schoen S, Mattisson I. Food composition database harmonization for between-country comparisons of nutrient data in the TEDDY Study. *J Food Comp Anal* 2011; 24: 494-505.