

## Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos

Ana Belén Olivares Martínez, Gaspar Ros Berruero, M<sup>a</sup> José Bernal Cava, Carmen Martínez Graciá y M<sup>a</sup> Jesús Perigo Castón

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

**RESUMEN.** El término "folato" se utiliza de forma genérica para denominar las distintas formas químicas derivadas del ácido fólico, una de las vitaminas del grupo B (concretamente la vitamina B<sub>9</sub>). Son esenciales en el metabolismo al actuar como cofactores en las reacciones de transferencia de un carbono. No obstante, solamente las plantas y los microorganismos son capaces de sintetizarlos de novo, de tal forma que tanto los animales como el hombre necesitan ingerirlos a través de los alimentos de la dieta. Se encuentra ampliamente extendido en la naturaleza, presentándose en mayor cantidad en las verduras de hoja ancha, en hígado y en cereales. Aún así, en la actualidad es una de las deficiencias nutricionales más comunes en todo el mundo, y tiene graves consecuencias sobre la salud humana. Existe evidencia de que incluso en países desarrollados la ingesta de folatos es generalmente baja, e incluso en algunos casos por debajo de los niveles óptimos. Las autoridades competentes de numerosos países están tomando medidas a este respecto, de tal forma que se está realizando la fortificación de numerosos alimentos considerados de consumo diario, tales como leche o cereales, ya sea de forma obligatoria (Estados Unidos, Canadá o Chile) o voluntaria (la mayoría de los países de Europa).

**Palabras clave:** Folatos, ácido fólico, mono y poliglutamatos, conjugasa, ingesta de folatos, biodisponibilidad de folatos, enriquecimiento de alimentos.

**SUMMARY.** Folate and folic acid intake estimation and food enrichment requirements. The term "folate" is a generic way to name the different forms derived from folic acid, one of the B vitamins (specifically B<sub>9</sub> vitamin). They are essential in the metabolism when they act as cofactors in the transfer reactions of one carbon. However, only plants and microorganisms are able to synthesize them *de novo*, in such a way that both animals and human beings have to intake them through their diet. Folic acid is widely spread in nature, mainly in vegetables, liver and cereals. However, nowadays, the lack of folates in the diet is one of the most common nutritional deficiencies in the world, and it has serious consequences on human health. There is evidence that even in developed countries folate intake is usually low; and even, in some cases, below optimal levels. The authorities in several countries have adapted different norms related to folic acid, fortifying staple food such as dairy products or cereals, mandatory (USA, Canada or Chile) or voluntary (most of the European countries).

**Key words:** Foliates, folic acid, mono and poliglutamate, conjugase, folates intake, folate bioavailability, food enrichment.

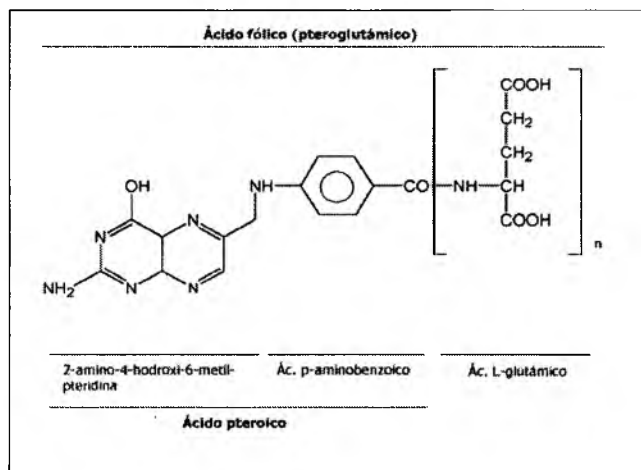
### INTRODUCCION

Folato es un término que se ha utilizado de forma genérica para denominar a los compuestos derivados del ácido fólico o ácido pteroilmonoglutámico que exhiben la actividad biológica del ácido fólico. Los folatos son un grupo de compuestos heterocíclicos basados en el esqueleto de ácido 4-((pteridin-6-metil amino) benzoico) (Pte o grupo pteroil) conjugado con uno o más residuos de ácido L-glutámico (Glu) (Figura 1). Estos mono o poli- $\gamma$ -glutamilconjugados son nombrados por el número de residuos glutamilo (n) según la fórmula PteGlu<sub>n</sub> (1, 2). La molécula de ácido fólico con el anillo de pteridina completamente oxidado no está presente en la naturaleza en cantidades significativas, aunque es la estructura más estable y, por tanto, la forma sintética utilizada en la elaboración de alimentos enriquecidos (3).

Las formas naturales de folatos difieren en la longitud y estado de reducción del grupo pteroil, la naturaleza de los sustituyentes en el anillo de pteridina y el número de residuos glutamato unidos al grupo pteroil. Las formas naturales más abundantes son los pteroilpoliglutamatos que contienen entre dos y siete glutamatos ligados por uniones amida (péptidos) al grupo gamma-carboxilo. Estos folatos naturales incluyen 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), 5-formiltetrahydrofolato (5-formil-THF), 10-formiltetrahydrofolato (10-formil-THF), 5, 10-metiltetrahydrofolato (5,10-metilen-THF), 5,10-metentetrahydrofolato (5,10-metenil-THF), 5-forminotetrahydrofolato (5-forminino-THF), 5, 6, 7, 8-tetrahydrofolato y dihydrofolato (DHF). Durante el metabolismo de los folatos se produce la reducción del anillo de pirazina de la molécula de pteridina hasta la forma tetrahydro, y también se produce la elongación de la cadena

por la adición de residuos de glutamato en unión gamma-péptido, y la adquisición y oxidación o reducción de un carbono unido a las posiciones N-5 y o N-10.

FIGURA 1  
Estructura del ácido pteroilglutámico



La función que realizan los folatos es a nivel coenzimático como receptores y donantes de unidades monocarbono en reacciones que forman parte del metabolismo de nucleótidos y aminoácidos. Debido a la importancia de su función, es necesario su correcto aporte a través de la dieta, ya que los mamíferos carecen de la habilidad de sintetizarlos *de novo*. No obstante, los folatos se encuentran en gran número de alimentos siendo las verduras, hortalizas y cereales los que presentan un mayor contenido. Sin embargo, es característica de los folatos su inestabilidad, de tal forma que las formas reducidas son menos estables que el ácido fólico sintético, y además su inestabilidad varía con la sustitución de la unidad monocarbono. Todas las formas derivadas son sensibles a la oxidación, a la luz y a las variaciones de pH, de tal forma que se producen grandes pérdidas de folatos durante los procesos de preparación de los alimentos, sobre todo cuando conllevan tratamientos térmicos, y se realizan bajo condiciones oxidativas (4). También tienen lugar pérdidas de folatos por lixiviación al agua de cocción durante la preparación de alimentos, incluso se producen pérdidas durante el almacenamiento de los alimentos donde tiene lugar la hidrólisis de los derivados poliglutámicos hasta monoglutamatos, transformación que puede continuar durante la fase posterior de preparación de los alimentos. Por ello, a pesar de su amplia distribución en los alimentos, todavía se presentan casos, si no de carencia, si de bajos niveles de folatos en la dieta, lo que es necesario corregir preferentemente en los denominados grupos de riesgo como embarazadas, lactantes o ancianos. De ahí el actual interés de enriquecer diversos alimentos de los considerados

de consumo diario, tales como leche y productos lácteos o cereales, con ácido fólico en su forma sintética.

### Absorción y metabolismo

Los folatos presentes en los alimentos de forma natural pueden estar tanto en forma poliglutámica como monoglutámica, pero las formas predominantes son los derivados poliglutamatos, ya que se ha estimado que alrededor de un 80% de los folatos naturales están presentes en la forma poliglutámica (5). Estas formas no son capaces de atravesar la mucosa intestinal, por lo que deben ser hidrolizados hasta monoglutamatos para poder ser absorbidos. Esta transformación está catalizada por la enzima  $\gamma$ -glutamihidrolasa, localizada en el borde apical de las microvellosidades de la mucosa yeyunal. El papel biológico de la cadena poliglutamil no ha sido aclarado todavía. Se afirma que los folipoliglutamatos son la forma intracelular coenzimáticamente activa, y que los monoglutamatos, capaces de atravesar la mucosa, son las formas de transporte (2,6). El ácido fólico sintético procedente de alimentos enriquecidos o preparados farmacéuticos no necesita deconjugación y atraviesa la membrana mediante un proceso saturable, pH dependiente. Sin embargo, a elevadas concentraciones un proceso no saturable de difusión pasiva es el que contribuye a la absorción del ácido fólico (7,8). Previamente a su entrada en la circulación, el ácido fólico padece una reducción hasta tetrahydrofolato y una metilación o bien una formilación en las células de la mucosa. Esta reducción es más bien limitada por lo que cantidades significativas de ácido fólico son halladas en plasma y orina (9). Los poliglutamatos naturales, por su parte, necesitan de la reconjugación para penetrar en la mucosa intestinal. Aquí son convertidos en poliglutamatos por acción de una sintetasa folato-dependiente y tras esto son de nuevo hidrolizados intracelularmente hasta monoglutamatos (10). De esta forma pasan a la sangre, se incorporan a la circulación portal, y de ahí pasan al resto de tejidos (11) donde desempeñarán sus funciones.

### Funciones

La función principal de los folatos en el metabolismo de todos los organismos es ser cofactor esencial en las reacciones de transferencia de unidades monocarbono, solo las plantas y los microorganismos son capaces de sintetizarlos.

### Folatos en vegetales

La ruta de biosíntesis de folatos en la planta no está completamente definida, pero probablemente es similar a la que tiene lugar en microorganismos, que si es conocida. Lo que es característico de estas reacciones en la planta es su distribución, ya que tienen lugar en tres compartimentos celulares diferentes. En el citosol y los plástidos (peroxisoma) tienen lugar la formación de unidades de pteridina y

paraminobenzoatos los cuales serán posteriormente condensados, glutamilados y reducidos en la mitocondria para dar lugar a los tetrahidrofolatos (12). En las plantas los folatos están involucrados en una ruta muy específica: la fotorespiración. Esta es iniciada a nivel de la ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). Esta es una enzima cloroplástica bifuncional que cataliza ambos procesos, carboxilación y oxigenación de la ribulosa 1, 5 bifosfato (RuBP) (13,14). La reacción de carboxilación da lugar a la producción de dos moléculas de 3-fosfoglicerato, mientras que la reacción de oxigenación da lugar a una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de 2-fosfoglicolato. Esta reacción de oxigenación es el primer evento de la ruta metabólica antes mencionada y llamada fotorespiración, que está asociada con la obtención de  $O_2$  y la evolución del  $CO_2$ . Este ciclo se considera como el reciclado de 2 moléculas de fosfoglicolato en 3-fosfoglicerato e involucra a tres partes diferentes de la célula: cloroplasto, peroxisoma y mitocondria. Los pasos clave en esta ruta tienen lugar en el interior de la mitocondria, donde la glicina es oxidada y convertida en serina a través de dos reacciones folato dependientes que están íntimamente conectadas. Estas dos reacciones son catalizadas por la serina hidroximetiltransferasa (SHMT) y el sistema de división de la glicina (GDC). En estas reacciones, GDC es el proveedor de metilentetrahydrofolato ( $CH_2-H_4FGLu$ ) requerido para la actividad de la SHMT (15).

La biosíntesis de tetrahidrofolato debe estar perfectamente regulada con la finalidad de establecer una estrecha correspondencia entre producción y demanda del cofactor. Esto quiere decir que su síntesis depende de las necesidades requeridas en el metabolismo de unidades monocarbono (15). Considerando las rutas en las cuales el cofactor está involucrado (síntesis de ácidos nucleicos, y de aminoácidos como la metionina, glicina o serina) está claro que los tetrahidrofolatos son requeridos en los procesos de división celular, tanto en las plantas como en los microorganismos que son capaces de sintetizarlos de novo, así como en los animales cuando los asimilan a través de la dieta.

### Folatos en animales

Al igual que en las plantas, en los animales la principal función de los folatos es ser portadores de unidades monocarbono, tales como grupos metil y formil (5). Son numerosos los procesos en los que los folatos desempeñan un papel fundamental para la salud humana. Cabe destacar la síntesis de ADN, donde los folatos actúan como coenzimas en la síntesis de timidilato y purinas. Otro de los procesos es la transferencia mediada por folatos de unidades monocarbono procedentes de la serina, la cual provee la mayor fuente de sustrato en el metabolismo de unidades monocarbono. Por último, intervienen en la conversión de homocisteína hasta metionina, reacción que requiere vitamina B12 como coenzima

y 5-metil tetrahidrofolato como sustrato. Esta reacción es muy importante porque supone la mayor fuente de metionina para la síntesis de S-adenosil-metionina que es un importante agente metilante in vivo (16).

### Folatos y salud

La manifestación clínica clásica de deficiencia de folatos es la anemia megaloblástica (17,18), la cual es debida a la interrupción del ciclo del ADN, produciéndose una síntesis defectuosa del mismo y continuando la síntesis de ARN, dando lugar a un aumento de la masa y la maduración citoplásmica. Se forman así hematíes macroovalocíticos en los cuales la maduración citoplásmica es mayor que la nuclear, produciéndose el megaloblasto en la médula, y la destrucción intramedular de las células. Como se afectan todas las líneas celulares, además de anemia se produce también leucopenia y trombocitopenia. Igualmente se ha relacionado esta anemia con la deficiencia de vitamina  $B_{12}$  o su uso defectuoso (19).

En deficiencias severas, la interrupción del ciclo de metilación llega a causar neuropatías. En los años noventa, se demostró la relación entre un bajo estatus de folatos y el desarrollo de enfermedades del cierre del tubo neural en neonatos (20). Los defectos del tubo neural son unos de los más prevalentes defectos al nacimiento en el mundo entero (21). Durante el embarazo el incremento de la división celular está asociado con el rápido crecimiento del feto y la placenta y con el aumento del número de células maternas y la talla de órganos reproductivos (22). Esto, está asociado a una marcada aceleración en las reacciones de transferencia de unidades monocarbono, incluyendo aquellas requeridas para la síntesis de nucleótidos y división celular, lo cual es básico para incrementar los requerimientos de folatos durante este periodo, ya que los folatos funcionan como coenzimas en reacciones de transferencia de unidades monocarbono en el metabolismo de nucleótidos y aminoácidos (2). Debido a este aumento de las demandas de folatos, las mujeres embarazadas presentan más posibilidad de desarrollar deficiencia de folatos que mujeres no embarazadas (21) de ahí la importancia de una correcta ingesta o suplemento de folatos para mantener un estatus adecuado.

Estudios más recientes relacionan el bajo estatus de folatos con disfunciones neurocognitivas (23,24). Los folatos juegan un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central y en el metabolismo de algunos neurotransmisores; bajas concentraciones de folatos pueden también estar relacionadas con demencia y función cognitiva disminuida a través de mecanismos no vasculares. Los folatos séricos tienen una fuerte correlación negativa con el riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer, y puede ser debido, en parte, al papel de los folatos en la reducción de los niveles de homocisteína sanguínea ya que elevadas concentraciones en sangre están asociadas con una progresiva atrofia del lóbulo

medio temporal en sujetos con Alzheimer (23). Se ha demostrado mediante autopsia que un déficit de folatos coincidía con una mayor atrofia de los tres lóbulos del neocórtex (frontal, parietal y temporal) y otras lesiones neocorticales propias de esta patología (25).

De igual forma se ha establecido la relación de los niveles de folatos con determinados tipos de cáncer, sobre todo de colon y recto (26,27). Potencialmente, los folatos pueden reducir la carcinogénesis por medio de varios mecanismos, manteniendo la normal síntesis del ADN y mediante la metilación del ADN (Figura 2). El 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) es esencial para la metilación del ADN y los folatos se requieren en la forma de 5, 10 metilentetrahidrofolato (5, 10 metilTHF) para convertir el deoxiuridilato en timidilato. Cuando los niveles de 5, 10 metilTHF son inadecuados, se produce la incorporación incorrecta de uracilo por timidina durante la síntesis de ADN. En humanos un estatus inadecuado de folatos está relacionado con la masiva incorporación de uracilo dentro del ADN y se incrementa la frecuencia de roturas cromosomales. Estas aberraciones genéticas son normalizadas con la suplementación de ácido fólico. La metilación del ADN es determinante para su configuración y estabilidad estructural (28) lo que es esencial en la carcinogénesis, ya que da estabilidad al genoma (26). Así, el papel de los folatos en mantener la metilación normal del ADN podría ser un mecanismo de acción por el cual los folatos intervienen en el riesgo de padecer cáncer (29).

Una baja ingesta de folatos provoca hiperhomocisteinemia leve, es decir, elevación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína (30), lo que es un importante factor de riesgo para la aparición de enfermedades cardiovasculares (31). Este hecho ha sido demostrado por numerosos estudios en los que se observa que un incremento de 5 µmol/L en la concentración de homocisteína en plasma está asociado con un aumento del 20 al 30% del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (32). De esta manera, la suplementación con ácido fólico (con dosis de 250 hasta 500 µg diarios) ha mostrado una significativa reducción de las concentraciones plasmáticas de homocisteína en sujetos sanos (33-36). También se ha observado esta respuesta cuando se aumenta la ingesta de folatos (hasta niveles de aproximadamente 560 µg diarios) a través de la dieta por incremento del consumo de frutas y hortalizas (37).

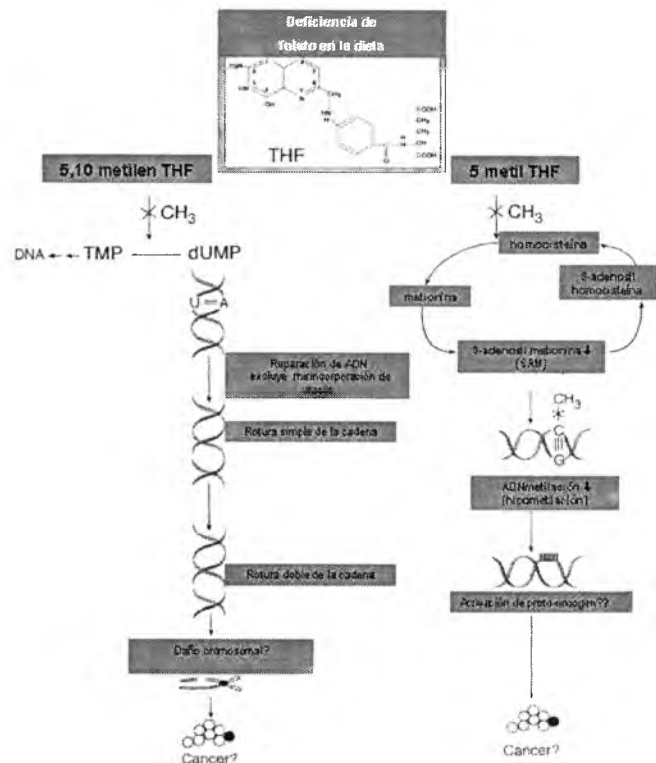
### Recomendaciones dietéticas de ingesta

Las recomendaciones de ingesta están basadas en la prevención de la anemia megaloblástica y no en la prevención de defectos del cierre del tubo neural, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (38). Para la prevención de la hiperhomocisteinemia, los requerimientos de folatos serán más altos que las RDA (38). Cuando se trata de la prevención de defectos del cierre del tubo neural se aconseja, a las mujeres que desean quedar embarazadas, la ingestión de

dosis elevadas de ácido fólico (400 µg diarios) al menos 4 semanas antes de la concepción, hasta unas 8 semanas después. De esta manera muchos países como Estados Unidos, Hungría, Bolivia, Colombia o Sudáfrica, han establecido la obligatoriedad de fortificar la harina de trigo con ácido fólico.

FIGURA 2

Deficiencia de folato e inestabilidad del ADN: mecanismo potencial. THF, tetrahidrofolato; 5, metil THF, 5-metiltetrahidrofolato; 5,10 metilTHF, 5,10-metilentetrahidrofolato; C, citosina; G, guanina; X expresa la incapacidad de donar un grupo metil (CH<sub>3</sub>) (75)



En España, como en la mayoría de los países de la Unión Europea y Noruega, no existe dicha obligatoriedad pero si se reconoce la importancia de alcanzar unos niveles adecuados de ingesta a fin de prevenir los síntomas de deficiencia de folatos, con lo que se opta por la fortificación voluntaria, más aceptada entre los países europeos (39). No obstante, el enriquecimiento de los alimentos con ácido fólico no está permitida en otros países como Holanda (40).

Aunque las dosis de ingesta recomendadas están basadas en la prevención de la anemia megaloblástica, la fortificación, sin embargo, está enfocada a la prevención de deficiencias en grupos más sensibles, como es el caso de mujeres en edad fértil, mujeres en periodo de lactación y ancianos. En el caso de mujeres en edad de procrear catalogadas dentro del grupo

de riesgo (aquellas que ya han tenido un hijo con defectos del tubo neural) la dosis aconsejada es de 5 mg totales al día (los medicamentos disponibles en España ofrecen esta cantidad), repartidos en dos tomas, teniendo en cuenta que si se divide la dosis se consigue una menor cantidad de ácido fólico libre que pueda bloquear receptores útiles para la organogénesis (41).

Las estrategias para conseguir unos niveles de folatos adecuados en estas poblaciones son, la correcta educación e información sobre la alimentación, fortificación de los alimentos (42), así como suplementos farmacológicos. En este último caso, la suplementación debe ser bajo prescripción médica y preferiblemente monofármaco, es decir, no en forma de complejo multivitamínico, ya que estos pueden dar lugar a un aumento no deseado de otras vitaminas (21). El principio activo de elección es el ácido fólico, debido a que numerosos estudios (43,44) han permitido comprobar la mayor biodisponibilidad de este compuesto frente a los folatos naturales presentes en la dieta, ya que el ácido fólico sintético es una forma monoglutámica y, por tanto, más fácilmente absorbible (21).

### **Biodisponibilidad**

Este concepto puede ser definido (en el ámbito de los folatos) como la fracción ingerido que es absorbido en el intestino delgado y que puede ser usado para procesos metabólicos o de almacenamiento en el organismo (9,42). Así surgen otros conceptos como son, "bioconversión" ó proporción de folatos ingeridos que es metabolizada en sus derivados, y "bioeficacia" que es la proporción de folatos ingeridos que tiene un efecto favorable en otros biomarcadores tales como la concentración de homocisteína plasmática (45).

El ácido fólico sintético tiene una mayor biodisponibilidad que los folatos naturales, de hecho, se puede afirmar que los folatos de los alimentos procedentes de una dieta mixta, presentan una biodisponibilidad de aproximadamente el 50% (37,46). Esto es así porque existen numerosos factores que afectan la "biodisponibilidad", "bioconversión" y "bioeficacia" de los folatos (45), entre los que cabe destacar: la estructura química de folato (ya que tienen mayor biodisponibilidad las formas reducidas), las uniones a la cadena poliglutámica (se ha observado menor biodisponibilidad en el caso de los poliglutamatos), la cantidad de folato (se absorbe mayor cantidad cuando el estatus es bajo), la matriz del alimento (mayor biodisponibilidad para los procedentes de dietas basadas en verdura y frutas), los efectos modificadores (determinados componentes de dieta pueden interferir la absorción de los folatos, como es el caso de la fibra dietética), el estatus corporal de otros nutrientes o los factores genéticos (modificaciones genéticas que afectan a genes que codifican para enzimas que intervienen en el metabolismo de los folatos). Este último, el genético, es uno de los factores más estudiados

actualmente debido al descubrimiento de un polimorfismo muy común en el gen que codifica para la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR 677C>T) que afecta a la bioconversión de las formas derivadas de folatos en el organismo y, por tanto, a su bioeficacia (47). Factores individuales relacionados con el hospedador, como es el caso de estados fisiológicos (gestación o lactación) o bien interacciones o combinación de alguno o todos los anteriores (38).

Se ha comprobado que la biodisponibilidad de formas monoglutámicas puede variar entre el 70 y el 120% en relación a la del ácido fólico sintético (100%) (48). Por tanto, para expresar el porcentaje de biodisponibilidad de un alimento se hace comparando con la biodisponibilidad del ácido fólico y surge el concepto de Equivalentes Dietéticos de Folato (EDF). Cuando el ácido fólico sintético es consumido como suplemento sin alimento, tiene una biodisponibilidad cercana al 100% (16); sin embargo cuando es consumido con alimento (como ocurre siempre en caso de productos fortificados), su absorción es reducida en un pequeño porcentaje, y se estima que la biodisponibilidad es aproximadamente del 85% (49, 50, 51). Se ha comprobado que los folatos presentes de forma natural en los alimentos son menos absorbidos en el organismo que el ácido fólico sintético. Así, los EDF pueden expresarse de distintas formas dependiendo del tipo de conversión necesaria (52), de tal forma que: 1 µg de EDF será 1.0 µg de folato del alimento, o 0.6 µg de ácido fólico añadido a los alimentos, o bien 0.5 µg tomados sin alimento; sin embargo 1 µg de ácido fólico tomado como fortificante será igual a 1.7 µg EDF; y finalmente 1 µg de ácido fólico tomado como suplemento o ayuno será equivalente a 2.0 µg EDF.

En la actualidad, los datos de contenido de folatos en los alimentos, presentados en las tablas de composición de alimentos (53) comienzan a expresarse en unidades EDF en lugar de µg/100g, que venía siendo la forma de expresión clásica.

### **Fuentes dietéticas de folatos. La controversia del enriquecimiento**

#### **Los datos de folatos en las Tablas de Composición de Alimentos (TCA)**

Los alimentos con mayor contenido de folatos (Tabla 1) son las verduras y hortalizas, los cereales y las frutas con valores entre 20 y 160 µg/100g. Este hecho facilita que la "Dieta Mediterránea" sea ideal para cubrir las necesidades de folatos. Como ejemplo en España (Figura 3), los valores de ingesta estimados son unos de los más elevados en Europa (54). Los alimentos de origen animal, en general, presentan un escaso o nulo contenido, a excepción de algunos como el hígado (700-1400 µg/100g). En estas afirmaciones coinciden todas las tablas publicadas que se han consultado (45, 55-57),

sin embargo, existe una amplia variabilidad en los resultados entre las diferentes fuentes estudiadas para un mismo alimento o grupo de alimentos (Tabla 1). Esto es debido a numerosos factores, entre los que destaca la utilización de métodos de determinación diferentes, lo que da lugar a que la calidad y el origen de los datos sean a menudo cuestionados (16,58).

TABLA 1  
Contenido en folatos en diversos alimentos en  $\mu\text{g}/100\text{g}$   
de peso fresco

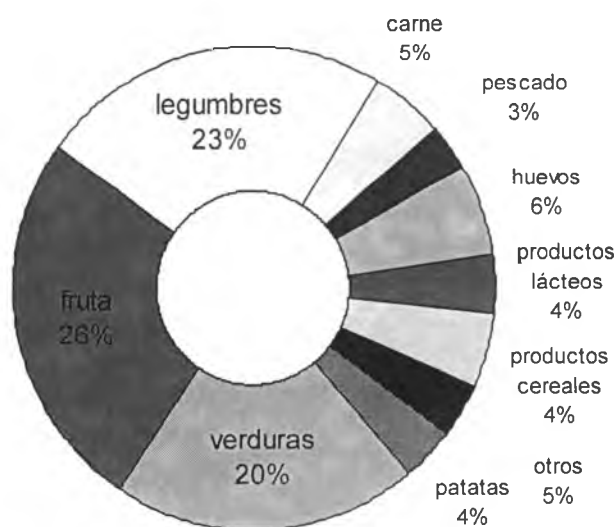
	(21) <sup>a</sup>	Referencia (55) <sup>b</sup>	(56) <sup>b</sup>
Soja		240	-
Hígado	227	207-1385	420-1470
Legumbres	180	17-20	-
Acelgas	140	-	-
Espinacas	140	83	48
Guisante	78	-	59
Naranja	37	18	27
Lechuga	34	43	51
Tomate	26	8	11
Queso	20	7-38	-

<sup>a</sup> Método no especificado

<sup>b</sup> Resultados obtenidos por cromatografía líquida (HPLC)

FIGURA 3

Contribución a la ingesta de folatos de los diferentes grupos de alimentos en la población española (76)



Tradicionalmente, los folatos procedentes de los alimentos eran determinados por el Método Microbiológico (59). Con este ensayo se obtiene el resultado de folatos totales, ya que

no discrimina entre las diferentes formas químicas de folatos. El método está basado en el crecimiento de un microorganismo, generalmente el *Lactobacillus rhamnosus* variedad *Casei*, que responde a las formas monoglutámicas así como a las di- y triglutámicas (60). No obstante, estos datos pueden ser enmascarados por la presencia en la muestra de compuestos no folatos que pueden activar o inhibir el crecimiento del microorganismo. Surge así la necesidad de investigar nuevos métodos de determinación de folatos en alimentos que permitan la diferenciación entre las diferentes formas químicas, lo que permite obtener datos más exactos y fiables (61). Para la separación de las diferentes formas se han desarrollado métodos cromatográficos de alta resolución (HPLC) que permiten diferenciar y cuantificar las distintas formas derivadas tras una extracción previa de la matriz del alimento y la posterior deconjugación por incubación con la enzima conjugasa (61). Actualmente, incluso se están perfeccionando técnicas para la determinación en cromatografía combinada de Líquidos-Masas (LC-MS), que permite una mayor certeza de la especie química que se determina. También se están realizando ensayos basados en las proteínas fijadoras de folatos (62), y son los denominados ensayo con radioproteínas fijadoras (Radio Protein Binding Assay o RPBA) y ensayo con enzimas proteicas unidoras (Enzymatic Protein Binding Assay o EPBA) (63,64). De esta manera se han conseguido mejoras considerables en la determinación de folatos, lo que ha incrementado la calidad de las tablas de composición de alimentos (TCA) en cuanto a este compuesto se refiere. Pero, aún así, la información pertinente a la identificación de las distintas formas químicas es todavía muy limitada. Esto es debido a la baja cantidad en la que están presentes en los alimentos de forma natural, a la elevada labilidad de algunos derivados folatos y a la difícil extracción de dichos compuestos de la matriz del alimento (55).

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. 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. No obstante, resulta difícil establecer la ingesta media de folatos en alimentos para adultos, pues estudios recientes realizados entre la población de varios países europeos establecen la ingesta media en un amplio rango que oscila entre 197-326  $\mu\text{g}/\text{día}$  en hombres, y 168-320  $\mu\text{g}/\text{día}$  en mujeres (54), mientras que en España los valores estimados de ingesta en la población, se ha estimado en 205  $\mu\text{g}/\text{EDF}/\text{día}$  y 196  $\mu\text{g}/\text{EDF}/\text{día}$ , para hombres y mujeres respectivamente. De acuerdo a los valores de Recomendaciones Dietéticas de Ingesta (RDI) en adultos presentados en la Tabla 2, dichas recomendaciones son

cumplidas. No obstante el término RDI describe el nivel de ingesta estimado que es suficiente para cubrir las necesidades de la mayoría de la población sana (97.5%) para ese determinado nutriente (65). Cabe destacar que en estos valores de ingesta recomendada debe tenerse en cuenta un margen de seguridad para periodos de disminución de la ingesta, aumento de la variabilidad y la utilización individual y la biodisponibilidad de los folatos naturales procedentes de los alimentos. Así, las RDI pueden ser utilizadas para la evaluación de la ingesta derivada de un estudio nutricional, por ejemplo para detectar grupos con una baja ingesta dentro de una población (65).

TABLA 2  
Valores establecidos como dosis de ingesta recomendadas de ácido fólico

Edad	µg de ácido fólico/día <sup>a</sup>	µg EDF <sup>b</sup> /día <sup>c</sup>
Niños		
0.0-0.5	40	80
0.5-1.0	60	80
1-3	100	160
4-9	200	330-400
Hombres		
10-12	300	400
13- 60 y más	400	400
Mujeres		
10-12	300	400
13-60 y más	400	400
Gestación (2ª mitad)	+200	600
Lactancia	+100	500

<sup>a</sup> Recomendaciones recogidas en Tablas de Composición Españolas (57)

<sup>b</sup> DFE: equivalentes dietéticos de folato EDF

<sup>c</sup> Recomendaciones de la FAO/WHO (53)

### Enriquecimiento o fortificación de los alimentos con ácido fólico

A fin de prevenir las enfermedades derivadas del déficit de folatos (sobre todo las relacionadas con el cierre del tubo neural en neonatos) en muchos países, con Estados Unidos y Canadá a la cabeza, se ha establecido la obligatoriedad de fortificar ciertos alimentos. Según el Codex Alimentarius (66) fortificación o enriquecimiento de alimentos, es "la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento con el propósito de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o grupo de población", definición que debe ser diferenciada de la de suplemento, definido por la FDA como "aquel producto tomado a través de la boca y que contiene uno o más ingredientes dietéticos destinados a suplementar la dieta". Estos ingredientes dietéticos pueden ser vitaminas, minerales, plantas o hierbas,

aminoácidos e incluso sustancias tales como enzimas, tejidos de órganos, tejidos glandulares y metabolitos (67).

El alimento más frecuentemente elegido en el caso del ácido fólico ha sido la harina de trigo (68). Se pretende conseguir una mayor uniformidad en los datos de ingesta, basados en el consumo de productos con una cantidad de ácido fólico conocida. Esta medida ha sido adoptada en la mayoría de los países de Centro y Sudamérica, en los que existe la obligación de fortificar la harina de trigo, como uno de los mejores vehículos para suministrar o aportar las vitaminas y minerales a un amplio número de personas. En El Salvador, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Nicaragua y Panamá se fortifica la harina de trigo desde los años 90 (68). Las cantidades de ácido fólico con las que se fortifica son diferentes para cada país. En el caso de Guatemala que comenzó a enriquecer la harina en 1992, los niveles exigidos son de 0.35-0.45 mg/kg, muy bajos si se les compara con los niveles que se establecieron en México de 2.0 mg/kg o en Costa Rica de 1.5 mg/kg.

En Chile la fortificación fue aprobada por el Ministerio de Salud y se aplica desde el año 2000 (69) con niveles de enriquecimiento más elevados: 2.20 mg/kg de harina. Uno de los últimos países en adoptar esta medida ha sido Perú mediante el Decreto Supremo 008-2004-SA, donde los niveles se han fijado en 1.2 mg/kg. El Decreto involucra también la adición a la harina de hierro, niacina y vitaminas B1 y B2 (70).

En Estados Unidos la obligatoriedad de fortificar los alimentos con ácido fólico comenzó en 1998, mientras que en Canadá se realiza desde mucho tiempo antes, concretamente desde 1975, con niveles mínimos de 0.15 mg/100g de harina, pero fue en 1998, cuando en este país se incluyó el enriquecimiento con folatos de todos los cereales de consumo humano (71). El resultado de esta medida es muy satisfactorio en cuanto a la reducción de defectos del cierre del tubo neural en neonatos, puesto que existen estudios que afirman un 19% de reducción de la incidencia de estos defectos en Estados Unidos tras poner en práctica esta fortificación (72). Resultados todavía más satisfactorios se obtuvieron en Chile cuando a partir de la decisión de la fortificación obligatoria de la harina, se inició un estudio a fin de comprobar el efecto de dicha medida. Así los datos preliminares obtenidos entre el periodo anterior a la fortificación (años 1999-2000) y después de iniciada la misma (2001-2002) demuestran una disminución del 40% en los casos de nacimientos con defecto del tubo neural (69).

En Europa, a pesar de conocer la importancia de un correcto status de folatos, y ser conscientes de su influencia en la salud, no existe obligatoriedad de enriquecimiento de alimento alguno. De hecho, Gales tiene la incidencia más altas de casos de defectos de cierre del tubo neural, y aún así, se practica la fortificación voluntaria de alimentos (45). Existen

países muy pragmáticos a este respecto, otros contrarios a la fortificación de la harina, como es el caso de Francia, y los países Escandinavos que son reacios a la fortificación en general (73). Esta medida fue tomada por acuerdo común en la Declaración conjunta de los representantes de la Agencias de Seguridad Alimentaria y de las instituciones relacionadas con la nutrición en los países europeos y Noruega (39). Estos países reconocen la importancia del ácido fólico en la prevención de defectos de cierre de tubo neural, en mujeres en edad de concebir, así como la dificultad de alcanzar los 400 µg de folato a través de la dieta. De ahí que se hayan diseñado cuatro estrategias para afrontar este riesgo, como son: promocionar el consumo de alimentos ricos en folatos, consumo de complementos dietéticos, fortificación voluntaria de alimentos o fortificación obligatoria de alimentos. En Europa se ha optado por la fortificación voluntaria, haciendo hincapié en el hecho de supervisar las consecuencias de dicha fortificación toda vez que puede enmascarar la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, sobre todo en la población anciana (39). No obstante, se han realizado estudios que confirman la inocuidad de fortificar con ácido fólico. Incluso cuando se usan cantidades superiores a 15 mg/día, como se ha hecho en los últimos estudios de toxicidad, se muestra seguro (74).

### CONCLUSIONES

Ante la importancia de los folatos en la salud y de su papel en el metabolismo, surge la necesidad de establecer valores adecuados de ingesta, que sean fiables y estén basados en datos contrastados. Es, por tanto, prioritario aumentar el interés y la formación de los consumidores acerca de esta vitamina, especialmente mujeres, con la finalidad de aumentar su nivel de folato, así como de explorar las posibilidades de promocionar lo beneficiosas que son para la salud algunas fuentes de folatos, teniendo en cuenta los futuros reglamentos sobre reclamaciones sanitarias de la UE. En el campo de la fortificación con ácido fólico, se puede afirmar que enriquecer la harina de trigo es una forma segura y efectiva de evitar los riesgos de aparición de enfermedades relacionadas con la deficiencia de ácido fólico, debido a que se ha comprobado que tras el consumo de alimentos fortificados se observan aumento de los niveles de folatos en suero y células rojas, disminuye el número de casos de cierre del tubo neural, y disminuye la concentración de homocisteína en plasma, lo que reduce la probabilidad de riesgo de enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer así como de la enfermedad de Alzheimer (74). Debería ser una prioridad para los países que todavía no fortifican las harinas de trigo el llevarlo a cabo, puesto que son numerosos los beneficios para la salud que se obtienen como consecuencia de esta medida.

### 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 los proyectos AGL2000-2482-CE y AGL2003-03598 (Funcionalidad de los folatos naturales frente a suplementos en zumos de frutas y sopas de hortalizas).

### REFERENCIAS

1. Blakley L. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. Recommendations 1986. *J Biol Chem* 1988;263(1):605-607.
2. Combs GF Jr. *The Vitamins. Fundamental aspects in Nutrition and Health.* Academic press, San Diego, CA.1992.
3. Eitenmiller RR and Landen WO Jr. *Vitamins In: Analyzing Food for Nutrition labelling and Hazardous Contaminants.* Eds. Jeon, I.J. and Ikins, W.G. Marcel- Dekker, Inc. New York. 1995. pp. 195-281.
4. Gregory JF. Chemical and nutritional aspect of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv Food Nutr Res* 1989;33:1-101.
5. Vahteristo L. Food folates and their analysis: Determination of folate derivatives and their stability by high-performance liquid chromatography. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Doctoral Thesis. University of Helsinki. 1998. pp.12-19.
6. Gregory JF. *Vitamins. In: Food Chemistry, 3<sup>rd</sup> Ed.* Fennema, O.R. Marcel Dekker, Inc. New York. 1996. pp. 531-616.
7. Selhub J, Dhar GJ, Rosenberg IH. Gastrointestinal absorption of folates and antifolates. *Pharmac Ther* 1983;20:397-418.
8. Mason JB. Intestinal transport of monoglutamyl folates in mammalian systems. In: *Folic acid metabolism in health and disease.* Eds. Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF. New York: Wiley-Liss. 1990. pp. 47-64.
9. Gregory JF. The bioavailability of folate. In: *Folate in Health and Disease.* Ed. Bailey LB. Marcel Dekker, Inc. New York. 1995. pp. 95-235.
10. Halsted CH. Jejunal brush-border folate hydrolase, a novel enzyme. *West J Med* 1991;155: 605-609.
11. Steinberg SE. Mechanisms of folate homeostasis. *Am J Physiol* 1984;246:G319-G324.
12. Hanson AD, Gregory JF. Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2002;5:244-249.
13. Lorimer GH. The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-biphosphate. The primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu Rev Plant Physiol* 1981;32:349-383.
14. Gutteridge S, Gatenby AA. Rubisco synthesis, assembly, mechanism and regulation. *Plant Cell* 1995;7:809-819.
15. Scott J, Rébeillé F, Fletcher J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric* 2000;80:795-824.
16. Gregory JF. Bioavailability of folate. *Eur J Clin Nutr*

- 1997;51:S54-S59.
17. Herbert V. Biochemical and haematologic lesions in folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr* 1967;20:562-569.
  18. Hines JD, Halsted CH, Griggs RC, Harris JW. Megaloblastic anemia secondary to folate deficiency associated with hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1968;68: 792-805.
  19. Arbage K. Vitamin B12, Folate and Folate-Binding proteins in Dairy products. Analysis, process retention and bioavailability. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. 2003. pp. 13-30.
  20. MRC vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects. Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*. 1991;338:131-137.
  21. González AI, García M. Ácido fólico y defectos del tubo neural en Atención Primaria. *MEDIFAM* 2003;13(4):305-310.
  22. 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.
  23. 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.
  24. 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.
  25. Snowdon DA, Tully CL, Smith CD, Riley KP, Markesbery WR. Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun Study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:993-998.
  26. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: as integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129-132.
  27. Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002;132:2413S-2418S.
  28. Giovanucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002;132:2350S-2355S.
  29. Kim Y-I. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of Gene-Nutrient interaction in carcinogenesis. *Nutr Rev* 2000;58(7):205-209.
  30. Kang SS, Wong PWH, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36:458-462.
  31. The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. *J Am Med Ass* 2002;288:2015-2022.
  32. Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000;72:324-332.
  33. Homocysteine Lowering Trialists Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *Brit Med J* 1998;316:894-898.
  34. Ward M, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, Scott JM. Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological doses of folic acid. *Q J Med* 1997;90:519-524.
  35. Bronstrup A, Hages M, Pietrzik K. Lowering homocysteine concentrations in elderly men and women. *Int J Vitam Nutr Res* 1999;69:187-193.
  36. Brouwer IA, van Dusseldorp M, Thomas CMG. Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine. A randomized trial. *Am J Clin Nutr* 1999;69:99-104.
  37. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled study. *J Nutr* 1999;129:1135-1139.
  38. Melse-Boonstra A. Dietary folate: Bioavailability studies in humans. Doctoral thesis 2003. Wageningen Centre for Food Science. Wageningen University.
  39. Agencia Española de Seguridad Alimentaria AESA. Ministerio de Sanidad y Consumo 2003. Declaración conjunta de las Agencias de Seguridad Alimentaria y de las Instituciones relacionadas con la nutrición en los países europeos y en Noruega.
  40. Health Council of the Netherlands. Risks of folic acid fortification. The Hague: Health Council of the Netherlands. 2000.
  41. Anónimo. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. 1998. Vol. 22, Nº 6. pp 150-151.
  42. Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects (Cochrane Review). En: *The Cochrane Library*, 2000. Oxford: Update Software.
  43. Bronner F. Nutrient bioavailability, with special reference to calcium. *J Nutr* 1993;123:797-802.
  44. Stokstad ELR, Shin YS, Tamura T. Distribution of folate forms in foods and folate availability. In: *Folic acid: biochemistry and physiology in relation to the human nutrition requirement*. Washington, DC: National Academy of Sciences. 1977. pp.56-68.
  45. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Steegers-Theunissen RPM. Bioavailability and bioefficacy of folate acid in humans. *Nutr Res Rev* 2001; 14:267-293.
  46. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987;46:1016-1028.
  47. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
  48. Tamura T, Stokstad ELR. The availability of food folate in man. *Br J Haematol* 1973;25:513-532.
  49. Subcommittee on Folate, other B vitamins, and Choline. *Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, vitamin B6, Folate, vitamin B12, Pantothenic acid, Biotin, and Choline*. Institute of Medicine. Washington, DC. National Academy Press; 1998.
  50. Cuskelly GJ, McNully H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 1996;347:657-659.
  51. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF. Absorption of folate from fortified cereal-grain and products and of supplemental folate consumed with or without food determined using a dual-label stable isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1388-1397.

52. West Sutor C, Bailey LB. Dietary folate equivalents: Interpretation and application. *J Am Dietetic Assoc* 2000;100:88-94.
53. Joint FAO/WHO. Expert Consultation on Human Vitamin and mineral Requirements. FAO, Bangkok, Thailand. Preliminary Report on Recommended Nutrient Intakes. 1998.
54. de Bree A, van Dusseldorp M, Brower IA, van Het Hof KH, Steegers-Theunissen RPM. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:643-660.
55. Konings EJM. Dietary folates in human nutrition, analysis, intake, bioavailability and association with colorectal cancer. Doctoral thesis. 2001. Nutrition and Toxicology Research in Institute Maastricht (NUTRIM).
56. Vahteristo L, Lehtikainen K, Ollilainen V, Varo P. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chem* 1997;59(4):589-597.
57. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de composición de alimentos. 7ª edición. Ediciones Pirámide. Grupo Anaya S.A. Madrid. 2003.
58. Ball GFM. Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods. 1st ed. Chapman & Hall, London. 1998.
59. Finglas PM, Faure U, Southgate DAT. First BCR-intercomparison in the determination of folates in food. *Food Chemistry* 1993;46:199-213.
60. Martin CA. Folate analysis in foods. *BNF Nutrition Bulletin*. 1995; 20:8-15.
61. Vahteristo L, Ollilainen V, Koivistoinen PE, varo P. Improvement in the Analysis of reduced folate monoglutamates and Folic Acid in Food by high-Performance liquid Chromatography. *J Agric Food Chem* 1996;44:477-482.
62. Finglas PM, Faulks RM, Morgan MRA. The development and characterization of a protein-binding assay for the determination of folate-potential use in food. *J Micronutr Anal* 1988;4:295-308.
63. Hansen SI, Holm J. A competitive enzyme-linked ligand sorbent assay (ELISA) for quantitation of folates. *Anal Biochem* 1988;172(1):160-164.
64. Verwei M, Arkbåge K, Mocking H, Havenaar R and Groten J. The binding of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate to folate-binding proteins during gastric passage differs in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J Nutr* 2004;134:31-37.
65. Bailey LB. Folate requirements and dietary recommendations. En: *Folate in Health and Disease*. Ed. LB Bailey. New York, Marcel Dekker, Inc. 1995. pp.123-125.
66. Codex alimentarius. Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos-CAG/GL 09-1987.
67. U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA)*. 1994.
68. Guamuch M. Programas de Salud pública de fortificación de alimentos en Centroamérica. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 2003; Notas técnicas PP/NT/032.
69. Estudio INTA. Harina enriquecida con Ácido Fólico. *Nutrición XXI*. 2003;9:20-21.
70. Asociación Peruana de Consumidores y Usuarios (ASPEC). Pan será más nutritivo: harina de trigo deberá estar enriquecida con vitaminas y minerales. *Food Science Technology*. 2004. Oficina de Comunicaciones. Nota de prensa.
71. Montaner J. El consumo de folatos en el embarazo. *Diario de la seguridad alimentaria*. Julio de 2004.
72. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LC. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *J Am Med Association* 2001;285:2981-2986
73. Food Standards Agency and UK Health Departments. Report from the Folic acid public stakeholder meeting. 2002.
74. Quinlivan EP, Gregory JF III. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States 2003. *Am J Clin Nutr* 2003;77(1):221-225.
75. Duthie SJ. Folic acid and ADN stability. *Br Med Bull* 1999;55:578-592.
76. Planells E, Sánchez C, Montellano MA, Mataix J, Llopis J. Vitamins B6 and B12 and folate status in a adult Mediterranean population. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:777-785.

Recibido: 05-08-2004

Aceptado: 02-02-2005