La determinación de folatos en alimentos. Estudio crítico y comparativo

PEDRO A. CARRERA, RICARDO N. BASUALDO Y JUAN C. SANAHUJA*
Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires.

RESUMEN

Se realiza un estudio acerca de las posibilidades que ofrece el método microbiológico para cuantificar folatos en los productos naturales.

Para ello, se analizan cada una de las variables que deben ser tenidas en cuenta previamente a la aplicación de esta técnica, a saber: naturaleza de las combinaciones naturales del compuesto con actividad vitamínica, función y distribución de las conjugasas, capacidad de absorción de los poliglutamatos presentes en los alimentos, inhibidores naturales de las conjugasas e importancia en la elección del microorganismo de ensayo.

En función de estos elementos se plantea el uso de una nueva microtécnica basada en los fundamentos generales del método microbiológico discutiéndose el planteamiento metodológico de la misma y la importancia que poseen desde el punto de vista nutricional los resultados con ella obtenidos.

INTRODUCCION

Hasta el momento el folato presente en los alimentos suele clasificarse en dos grandes grupos: folato "libre" y folato "total". Como se verá más adelante, con tales denominaciones se pretende designar ya sea la fracción biodisponible para los microorganismos de ensayo, sin tratamiento previo con enzimas conjugasas o bien la cantidad total del nutriente presente

Recibido: 7-8-1975.

en el alimento, es decir, la fracción biodisponible más la porción combinada y que es hidrolizada por las enzimas conjugasas.

No obstante, la comisión de expertos FAO/OMS en 1970, ha señalado la necesidad de conocer aún más en detalle ciertos aspectos tales como la cantidad y formas en que se encuentran presentes los folatos en los alimentos, la distribución y función de las conjugasas, la importancia y distribución de las sustancias inhibidoras de las conjugasas que puedan hallarse en los productos naturales, la influencia de factores que interfieren con la función de las conjugasas, la capacidad de las células de la mucosa del intestino delgado para absorber los poliglutamatos de la dieta, y por último un amplio estudio de todos los factores que puedan afectar la absorción (1).

De manera análoga, las técnicas de valoración de este grupo vitamínico aún son estudiadas en detalle.

Si bien es universalmente aceptado que las técnicas microbiológicas son las más adecuadas por sus especiales características de especificidad y sensibilidad, las opiniones son en cambio muy dispares en relación con las distintas metodologías propuestas para la hidrólisis de estos derivados cuando se desea evaluar el contenido de folato "total".

Así, el método descripto en 1950 en A.O.A.C. como técnica oficial para cuantificar folato "total" (2), debió ser retirado luego de la evidencia de los resultados dispares obtenidos con su empleo por distintos investigadores en estudios realizados con posterioridad a su publicación.

En dicha técnica se aconsejaba para hidrolizar los folatos el empleo de conjugasas de páncreas de pollo, previa hidrólisis de la muestra a 121ºC durante 15 minutos.

Con posterioridad, ciertos autores establecieron que las conjugasas obtenidas de esta fuente eran mucho menos activas que las que podían ser aisladas de otros órganos y especies (3) (4) y en razón de ello se ha recomendado que todo el procedimiento de extracción y cuantificación de este nutriente sea sometido a nuevos estudios.

Por su parte y hasta tanto sean dilucidados los aspectos hasta aquí mencionados, la comisión de expertos FAO/OMS (1) señala la necesidad de juzgar el aporte de folatos de la dieta en términos de folato "libre". Además, todavía limita al

50% la cantidad de este que sería realmente aprovechable por el organismo.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, este trabajo ha perseguido dos finalidades:

a) Determinar el contenido de folato "libre" en distintos productos naturales, designando como tal a la porción vitamínica presente en el alimento y que es disponible para el Streptococcus faecalis ATCC 8043, sin un previo tratamiento hidrolítico de la muestra con enzimas conjugasas. Dicha fracción incluye por lo tanto los conjugados del ácido pteroico con una y dos moléculas de ácido glutámico. Para la adopción de esta denominación seguimos el criterio adoptado por el grupo de expertos FAO/OMS (1).

b) Aportar nuevos elementos de juicio en cuanto a los resultados obtenidos en la valoración microbiológica del folato "total" de ciertos productos naturales, utilizando conjugasas de riñón de cerdo.

Para ello este estudio contempló el análisis del comportamiento de estas enzimas frente a distintas variables de procedimiento, analizándose bajo qué condiciones se pudieron obtener los mejores resultados.

Además se presenta también una clara evidencia del efecto inhibitorio que ejercen ciertos compuestos presentes en algunos productos naturales sobre las conjugasas de riñón de cerdo, comprobándose la reversión de este efecto que tiene lugar en presencia de cisteína.

Estos resultados se comparan con los obtenidos para los mismos productos sin tratamiento previo con conjugasas. Se discute la importancia que tiene desde el punto de vista nutricional el valor de dicha diferencia y se realiza un análisis y crítica del método oficial, centrando la atención en la importancia de la elección del microorganismo (Lactobacillus casei ATCC 7469 o Streptococcus faecalis ATCC 8043) en cuanto a los niveles de folato "libre" que aporta cada alimento.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El presente estudio se realizó sobre distintos tipos de harinas de girasol, provenientes del proceso industrial de extracción del aceite correspondiente, poroto de soja entero molido, carne de vaca cruda fresca, yema de huevo en polvo desengrasada, así como sobre una muestra de levadura de cerveza comercial de panadería.

Métodos

I. *Preparación de la muestra*

A. *Determinación de folato "libre"*

Se aplicó el procedimiento descripto en la XI Ed. del Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (5).

B. *Determinación de folato "total"*

En forma paralela a la determinación de folato "libre", para cada muestra estudiada se aplicaron distintos procedimientos hidrolíticos a efectos de poder estudiar el comportamiento de las conjugasas de riñón de cerdo.

Las técnicas aplicadas en cada caso se señalan a continuación:

Procedimiento I: alrededor de un gramo de muestra exactamente pesado, se transfirió a un erlenmeyer de 50 ml, adicionándose 10 ml de solución buffer de acetato de sodio (pH 4,5).

La mezcla se calentó durante 5 minutos en baño de agua a 100ºC y luego de enfriar hasta temperatura ambiente se agregaron 20 mg de un preparado comercial de conjugasas de riñón de cerdo.

Nosotros hemos utilizado "Hog Kidney Extract" liofilizado, provisto por la Nutritional Biochemicals Corporation. Esta preparación enzimática es especialmente preparada para este tipo de determinaciones, ya que se la somete a procedimientos de purificación que le confieren la característica de dar blancos de ácido fólico iguales a cero, cosa que fue verificada y comprobada en este trabajo.

El material así preparado se incubó durante 24 hs. a 37ºC. Con posterioridad se calentó en baño de agua hirviente durante 5 minutos y, una vez enfriado, se neutralizó a pH 6,6-6,8 con (OH) Na O.1 N.

Se transfirió a un matraz apropiado, llevando a volumen hasta obtener una solución de concentración similar a la del estándar trabajo. Luego, y una vez filtrada, la solución quedó ya en condiciones de ser valorada.

Procedimiento II: en un pequeño erlenmeyer se resuspendieron 20 mg de "Hog Kidney Extract" en 16 ml de solución buffer de acetato de sodio (pH 4.5), adicionando posteriormente 96 mg de L-cisteína. Se dejó en reposo 10 minutos.

Por separado, en un erlenmeyer de 50 ml, se resuspendió alrededor de 1 gramo de muestra exactamente pesado, en unos 10 ml de la solución buffer de acetato de sodio y se calentó durante 5 minutos en baño de agua hirviente.

Una vez frío el material se agregó la mezcla de enzima y cisteína, luego de lo cual se realizó la incubación a 37ºC durante 24 horas, siguiéndose a partir de aquí el mismo método descripto en el procedimiento I.

Procedimiento III: alrededor de un gramo de muestra exactamente pesado, se transfirió a un erlenmeyer de 50 ml y se resuspendió en unos 10 ml de la solución buffer de acetato de sodio. El material así preparado se sometió a un autoclavado a 121ºC durante 15 minutos.

A continuación y una vez frío, se le agregó la mezcla de enzima y cisteína preparada como se describe en el procedimiento II.

Se incubó 24 horas a 37ºC, luego de lo cual se siguió la misma técnica que se señala en el Procedimiento I.

Procedimiento IV: se siguió el mismo esquema que en II y la única variación respecto a aquel fue que en este caso se utilizaron 40 mg de la enzima.

II. *Método Microbiológico*

La técnica microbiológica empleada es una modificación del procedimiento originalmente descripto por Teply y Elveh-

jem para la determinación de ácido fólico mediante el uso de Streptococcus faecalis (6).

a) *Medio Basal:* se utilizó el "Bacto Folic A.O.A.C. Medium" preparado de acuerdo a las especificaciones descriptas en A.O.A.C. (7).

b) *Solución Estándar:* la solución estándar "stock" se preparó pesando exactamente 20 mg de ácido fólico USP Reference Standard y disolviendo luego esta cantidad en unos 15 ml de (OH) Na 0.01 N.

Posteriormente se completó con agua destilada hasta 1000 ml, habiendose ajustado previamente el pH a 7.5 con ácido clorhídrico diluido. Esta solución, así preparada, contenía 20 mcg/ml de ácido fólico.

En el momento de la determinación se diluyó con agua destilada hasta alcanzar una concentración de 100 ng/ml (solución estándar trabajo).

Luego de ello y una vez transcurrido dicho tiempo, se procedió a efectuar el lavado de la cepa habiendo utilizado para ello dos porciones de 10 ml de solución fisiológica estéril.

Finlamente se realizó el inóculo a una concentración del 1% en solución fisiológica estéril.

d) *Procedimiento Analítico:* en una batería de tubos de ensayo y por triplicado se confeccionó la curva de referencia, utilizando volúmenes crecientes de la solución estándar trabajo comprendidos entre 0.01 y 0.10 ml. De esa forma se cubrió su rango comprendido entre 1.0 y 10.0 ng de ácido fólico por tubo de valoración (10 ml).

De manera similar se procedió para la muestra, una vez preparada ésta para su cuantificación.

También se prepararon dos tubos de concentración cero y a todo el conjunto se le adicionaron 10 ml del medio basal de ensayo, tras lo cual se procedió a esterilizar todo el material autoclavando durante 5 minutos a 121ºC.

Una vez fríos los tubos se sembraron con una gota del inóculo. De los dos niveles de concentración cero, uno (blanco) permaneció sin ser sembrado, mientras que el restante (testigo) fue también inoculado con el microorganismo.

Luego se incubó a 37ºC durante 16-18 horas, tras lo cual se efectuó la evaluación turbidimétrica en espectrofotómetro a 580 nm.

e) *Método de Cálculo:* se aplica el método estadístico según se halla descripto en A.O.A.C. (8).

RESULTADOS

I. *Estudio comparativo entre la microtécnica y el procedimiento oficial*

Las dos técnicas se estudiaron en forma comparativa por medio de un mismo operador a través de cinco determinaciones independientes. El estudio se realizó sobre una muestra de carne de vaca cruda fresca previamente hidrolizada por el procedimiento III, y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Como allí puede observarse, la diferencia entre el índice de dispersión (desviación relativa individual respecto a la media) de los valores hallados con la microtécnica propuesta y el correspondiente a los resultados obtenidos con el procedimiento clásico (5+5 ml) es muy amplia y del orden del 10%.

En efecto, a un índice de dispersión del 9% que corresponde a la microtécnica, se opone un valor del 19% para el método oficial.

II. *Ensayos de Recuperación*

En la Tabla 2 se presentan los valores correspondientes a los ensayos de recuperación realizados sobre una muestra de harina de girasol y otra de carne de vaca.

El estudio se realizó a tres niveles diferentes para cada una de las muestras en estudio y permitió obtener recuperaciones cuantitativas comprendidas entre 94.0 y 107.1%.

III. *Análisis de los resultados obtenidos con las técnicas hidrolíticas utilizadas.*

Con los distintos alimentos analizados, paralelamente a la determinación del contenido de folato "libre" se realizó la evaluación, previo tratamiento del producto con conjugasas de riñón de cerdo.

En las Tablas 3 y 4 se transcriben los resultados obtenidos en estas determinaciones, comparándose en la Tabla 4 los valores hallados con los distintos procedimientos hidrolíticos.

TABLA 1

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA MICROTECNICA Y EL PROCEDIMIENTO OFICIAL EFECTUADO SOBRE UNA MUESTRA DE CARNE DE VACA CRUDA FRESCA.

ACTIVIDAD FRENTE AL STREPTOCOCCUS FAECALIS ATCC 8043 (1)

Microtécnica	Procedimiento Oficial
21.316	19.980
25.514	28.820
22.834	24.515
21.500	30.000
25.991	20.150
$\bar{x}$: 23.431 (2)	$\bar{x}$: 24.693 (2)
D.E.: ± 2.200 (3)	D.E.: ± 4.690 (3)

(1) Los valores corresponden a mcg de ácido fólico por 100 g de muestra.
(2) Media aritmética.
(3) Desviación estándar de la media.

TABLA 2

ENSAYOS DE RECUPERACION

Muestra	Contenido de ácido fólico en la muestra (1)	Acido fólico adicionado (1)	Contenido total de ácido fólico calculado (1)	Contenido total de ácido fólico hallado (1)	Recuperación %
Harina de girasol A.	0.50	0.06	0.56	0.60	107.1
	1.40	0.18	1.58	1.60	101.2
	2.10	0.24	2.34	2.20	94.0
Carne de vaca	0.30	0.06	0.36	0.35	97.2
	0.88	0.18	1.06	1.07	100.9
	1.23	0.24	1.47	1.49	101.3

(1) Los valores corresponden a ng de ácido fólico por tubo de valoración (10 ml).
Nota: Ensayos de recuperación efectuados con la técnica propuesta en este trabajo.

TABLA 3

CONTENIDO DE FOLATO "LIBRE" EN DIVERSOS PRODUCTOS NATURALES

Muestra		Número de determinaciones	Contenido en folato "libre" (1)
Levadura de cerveza		5	149.315 ± 15.660
Poroto de soja		4	12.325 ± 1.140
Harina de girasol (2)	a	6	14.541 ± 1.324
	b	4	17.323 ± 1.802
	c	4	19.504 ± 1.904
	d	5	35.360 ± 3.200
	e	5	15.604 ± 1.504
	f	4	24.306 ± 2.810
Carne de vaca		4	5.750 ± 0.620
Yema de huevo en polvo desengrasada		5	18.642 ± 1.900

(1) Los valores corresponden a mcg de ácido fólico por cada 100 g de muestra.

(2) Se analizaron seis muestras diferentes que habían sido sometidas a distintos procedimientos tecnológicos, y a las cuales se designó "a", "b", "c", "d", "e" y "f". Solamente la muestra "a" fue sometida al estudio comparativo con conjugasas de riñón de cerdo.

Nota: La expresión folato "libre" se utiliza para designar a la porción vitamínica presente en el alimento y que es disponible para el Streptococcus faecalis ATCC 8043, sin un previo tratamiento hidrolítico de la muestra con enzimas conjugasas. Dicha fracción incluye por lo tanto los conjugados del ácido pteroico con una y dos moléculas de ácido glutámico.

TABLA 4

CONTENIDO DE FOLATO "TOTAL" HALLADO CON DISTINTOS PROCEDIMIENTOS HIDROLITICOS

Muestra	Actividad frente al Streptococcus faecalis ATCC 8043 [1]			
	Procedimiento I	Procedimiento II	Procedimiento III	Procedimiento IV
Levadura de cerveza (5)	646.290±82.700[2]	906.103±133.900[3]	950.010±22.620[4]	993.315±54.880
Poroto de soja (4)	53.437± 8.255	78.662± 6.356[5]	76.060± 8.889	77.524± 8.763
Harina de girasol A_1 (6)	71.403± 6.424	81.784± 9.824	71.803±10.750	72.504± 5.664
Carne de vaca (4)	22.190± 2.115	23.431± 2.200	22.316± 1.945	23.680± 2.040
Yema de huevo en polvo desengrasada (5)	58.547± 6.312	58.236± 4.280	56.213± 4.820	60.210± 7.024

1. Expresada en mcg de ácido fólico por cada 100 g de muestra. Los números entre paréntesis que figuran a continuación de cada muestra indican el número de determinaciones realizadas en cada caso.
2. Media ± D.E. de la media.
3. $p < 0.001$ con respecto a la correspondiente muestra hidrolizada en ausencia de cisteína.
4. $p < 0.05$ con respecto a la correspondiente muestra sin autoclavar.
5. $p < 0.05$ con respecto a la correspondiente muestra hidrolizada en ausencia de cisteína.

El tratamiento de la enzima con cisteína permitió obtener resultados significativamente más elevados, tanto en la muestra de levadura de cerveza como en el poroto de soja.

En cambio en los restantes alimentos: carne de vaca, harinas de girasol, yema de huevo, las diferencias de ambas técnicas hidrolíticas no trasuntó en valores distintos. Del mismo modo, el autoclavado previo sólo en la levadura permitió realizar una extracción más completa.

Por su parte el uso de una concentración mayor de la enzima en ningún caso mejoró la efectividad del procedimiento.

DISCUSION

I. *Estudio comparativo entre la microtécnica y el procedimiento oficial*

Los resultados hallados han permitido comprobar que el índice de dispersión de los resultados fue mucho mayor con el procedimiento clásico, lo cual sin duda confirma la presencia de fuentes de error experimental que se incorporan en aquella metodología y que se han descartado en la modificación del método simplificado de Mc Mahan y Snell (9) utilizada en este estudio y consistente en la utilización de volúmenes máximos de 0.10 ml tanto para la muestra como para la solución de referencia.

La regularidad de los resultados obtenidos con esta nueva microtécnica, a lo que se suman las ventajas prácticas que condiciona su uso, nos han llevado a efectuar por medio de la misma todas las determinaciones que se describen en el presente trabajo.

II. *Análisis de los resultados obtenidos con los procedimientos hidrolíticos utilizados para determinar folato "total"*

En razón de las distintas formas en que este nutriente se encuentra presente en los productos naturales, existe cierta disparidad de criterios acerca de cual es la manera más adecuada para realizar su determinación en los alimentos.

El problema se hace más complejo aún cuando se tienen en cuenta ciertos elementos sobre los cuales hasta el presente no existe un acabado conocimiento.

Por ejemplo en 1970, el comité de expertos FAO/OMS ha insistido en la necesidad de adquirir, a través de nuevos estudios, un mayor conocimiento en cuanto a la naturaleza de las combinaciones en que el folato se halla presente en los productos naturales, así como sobre la función y distribución de las conjugasas y la capacidad de las células de la mucosa del intestino delgado para absorber los diferentes poliglutamatos presentes en los alimentos.

En ese informe se insiste en juzgar el valor de un alimento por su aporte de folatos en función de la cantidad de la vitamina que se encuentra en estado libre.

Por lo tanto, y ante la complejidad del problema, su discusión conviene ordenarla según los siguientes aspectos: a) microorganismo utilizado en la determinación, b) estudio crítico de los métodos hidrolíticos utilizados y c) análisis comparativo entre los valores hallados, previa hidrólisis de las muestras y aquellos obtenidos sin haber realizado el tratamiento con conjugasas.

A continuación nos referiremos por lo tanto a cada uno de estos items.

a) *Microorganismo utilizado en la determinación*

La diferencia de especificidad entre el Lactobacillus casei ATCC 7469 y el Streptococcus faecalis ATCC 8043 es muy importante, ya que estudios muy recientes han demostrado que la mucosa intestinal del perro es permeable tanto al pteroilmonoglutamato como al diglutamato y que por lo tanto "in vivo" la membrana de la célula mucosal se asemeja en su comportamiento al S. faecalis (10).

En este mismo estudio se comprobó una absorción regular de diglutamato cuando el triglutamato se depositaba en el lumen. Del mismo modo se observó también que a partir de los poliglutamatos fue imposible detectar la absorción de otras formas de folatos distintas al monoglutamato, sugiriendo que para los compuestos con más de dos restos de ácido L-glutámico el bajo grado de absorción permitiría completar la hidrólisis hasta derivados con sólo un resto de ácido L-glutámico que, entonces bajo esta forma, pasaría a través de las células de la mucosa intestinal.

Estos hallazgos otorgan gran validez nutricional a aque-

llas determinaciones microbiológicas de folatos realizados en los productos naturales por medio del S. faecalis, sin un tratamiento previo de las muestras con conjugasas.

Por otra parte, otros investigadores (11) han demostrado que el S. faecalis es capaz de sintetizar poliglutamatos a partir de mono y diglutamatos, existiendo evidencia de que este organismo no posee enzimas capaces de hidrolizar poliglutamatos en unidades de menor longitud.

Este hecho otorga mayor validez aún a las determinaciones de "folato libre" en los alimentos, puesto que permite descartar una fuente de error que sería de gran importancia en cuanto a la extrapolación de los resultados obtenidos en estas condiciones al estudio del aporte de los distintos productos naturales.

Por último, cabe señalar que las características de este microorganismo fueron evaluadas en forma comparativa con las de otros organismos de ensayo a través de estudios realizados en colaboración por A.O.A.C. y al cabo de los mismos se resolvió su utilización en las técnicas oficiales (5).

En nuestro trabajo hemos contemplado ambos aspectos: analítico y nutricional, a la luz de los últimos estudios, habiendo preferido por todo lo expuesto la utilización del S. faecalis ATCC 8043.

b) *Estudio crítico de los métodos hidrolíticos utilizados para determinar folato "total"*

Si se quiere cuantificar la cantidad total de folato que aporta un alimento, la incapacidad de los microorganismos de ensayo para utilizar los compuestos con más de dos o tres restos de ácido glutámico, obliga al empleo de procedimientos hidrolíticos previos.

Entre 1947 y 1949, los métodos microbiológicos propuestos para la valoración de folatos fueron estudiados en colaboración por A.O.A.C.

Como consecuencia de estos estudios se adoptó el Streptococcus faecalis ATCC 8043 como organismo de ensayo y el procedimiento de extracción aconsejado especificaba incubar la muestra con polvo de páncreas de pollo, después de un autoclavado del material durante 15 minutos a 121°C, en presencia de una solución buffer de fosfato de pH 7.2.

A su vez, los estudios desarrollados en los años posteriores revelaron la existencia de una multiplicidad de compuestos con actividad de ácido fólico que se encuentran en la naturaleza y la necesidad de revisión y uso de nuevos procedimientos de extracción previos a la valoración de actividad de folato en los alimentos.

Flynn, primero en 1964 y posteriormente en 1965, luego de sus estudios sobre determinación de folato en alimentos (12 (13), concluye recomendando que todo el procedimiento de extracción y cuantificación de este nutriente sea sometido a nuevos estudios.

Nosotros hemos trabajado aquí con conjugasas de riñón de cerdo, investigando de qué manera se comportó la enzima según las modificaciones de medio a que estuvo sometida.

En la Tabla 4 se presentan los valores que hemos obtenido en este trabajo, luego de aplicar los cuatro procedimientos previamente descritos sobre las muestras en estudio.

Como allí puede observarse, el tratamiento previo de la enzima con cisteína permitió obtener resultados significativamente más elevados, tanto en la muestra de levadura como en el poroto de soja.

En la torta de girasol y en la muestra de carne de vaca y de yema de huevo, en cambio, la diferencia de procedimientos no arrojó resultados significativamente diferentes.

Por otra parte, el autoclavado previo preconizado en la técnica que inicialmente recomendó A.O.A.C. (2), sólo en la levadura permitió realizar una extracción más completa.

Tanto en la harina de girasol como en la muestra de poroto de soja y en la de carne y huevo, el autoclavado no estableció diferencia entre ambos procedimientos.

Por su parte el empleo de una mayor cantidad de enzima, 40 mg, en ningún caso permitió obtener resultados significativamente superiores a los obtenidos con el mismo procedimiento y 20 mg de enzima.

Estos resultados permitieron comprobar la acción inhibitoria que ejercen algunas sustancias sobre las conjugasas de riñón de cerdo, así como la reversión de este efecto que tiene lugar en presencia de cisteína.

El efecto inhibitorio, inicialmente señalado para los ácidos nucleicos de levadura, fue en nuestro caso muy evidente.

En esta experiencia, el tratamiento previo de la enzima con cisteína permitió obtener resultados hasta en un 40% superiores a los hallados en ausencia del aminoácido.

Respecto al autoclavado previo, en la levadura produce también un incremento significativo que no se observa en las muestras restantes, lo que haría sospechar en ese caso la existencia de formas activas en uniones o combinaciones más estables que, por lo tanto, hacen necesario el empleo de procedimientos de liberación algo más enérgicos.

Este hecho, además, permitiría confirmar cuanto se ha señalado últimamente acerca de la gran multiplicidad de derivados en los productos naturales.

c) *Análisis comparativo entre los valores de folato "libre" y "total" hallados en las muestras estudiadas*

En la Tabla 3 se presentan los valores de folato "libre" obtenidos mediante la aplicación de la técnica propuesta sobre los diferentes productos naturales estudiados.

Del estudio comparativo entre estos resultados y los que se presentan en la Tabla 4, surge claro que los pteroilpoliglutamatos representan la fuente principal de folatos en los alimentos.

Esto ha sido señalado en 1970 por el comité de expertos FAO/OMS (1), donde se indica que la cantidad de folato "libre" representa aproximadamente el 25% del contenido total del folato dietético.

En nuestro trabajo, para las muestras analizadas, hemos obtenido resultados algo inferiores, excepto en la muestra de yema de huevo donde el valor de folato "libre" hallado fue de un 30% respecto al contenido total.

En cambio, en las harinas de girasol la cantidad de folato "libre" fue término medio de un 17-18% del contenido total, cifra que descendió a alrededor del 15% para la levadura de cerveza y el poroto de soja.

Es interesante señalar además, que en el caso de las distintas harinas de girasol estudiadas, la cantidad de folato "libre" hallada varió dentro de límites muy amplios. Así para al-

gunas muestras la concentración de folato "libre" fue superior al doble del valor obtenido para otras.

Por último, en las muestras de carne de vaca se obtuvo un valor del 24.2% de folato "libre" respecto al hallado previo tratamiento de la muestra con conjugasas.

Estos resultados señalan la importancia que tiene desde el punto de vista nutricional, no ya la determinación del contenido total del nutriente sino la evaluación de aquella fracción que con seguridad será absorbida.

Al respecto, como ya se señaló, el grupo de expertos FAO/OMS asume que aún no toda esta fracción es utilizada por el organismo y que solamente sería disponible la mitad de este valor.

No obstante se insiste en la necesidad de profundizar los estudios, en particular a nivel de los mecanismos de absorción del nutriente y principalmente en la distribución y función de las conjugasas, así como de todos los aspectos relacionados con los factores que puedan afectar la absorción.

SUMMARY

Determination of folates in foods, a critical and comparative study

A study on the microbiologic method for folate determination in natural products was carried out. The variables that must be considered were analyzed previous to the application of this technique, that is: nature of combinations of the compounds with vitamin activity, function and distribution of the conjugases, capacity of absorption of the polyglutamates present in foods, natural inhibitors of the conjugases and the importance of the selection of the microorganism used.

Based on the preliminary investigations a modified microbiological microtechnique is proposed and its importance for some nutricional aspects is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. Requerimientos de Acido Ascórbico, Vitamina D, Vitamina B_{12}, Folato y Hierro. **Informe del Grupo de Expertos FAO/OMS**, Roma (Italia), 1970.
2. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, VII Ed., 1950.
3. Sebrell, W. H. & Harris, R. S. **The Vitamins**, Vol. I, II Ed., pág. 163, Academic Press, U.S.A., 1954.

4. Adrian, J.: Le Dosage Microbiologique des Vitamines du Groupe B: **Ann. Nutr. Alim.** 13; 109-126, 1959.
5. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists; XI Ed., pág. 785-786, 1970.
6. Teply, L. J. & Elvehjem, C. A.: Titrimetric determination of "Lactobacillus casei factor" and "Folic Acid": **J. Biol. Chem.**; 157, 303-309, 1945.
7. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, IX Ed., pág. 666, 1960.
8. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, XI Ed., pág. 784, 1970.
9. Mc Mahan, J. R. & Snell, E. E.: The Microbiological Determination of Amino Acids. I. Valine and Arginine: **J. Biol. Chem.**; 152, 83-95, 1944.
10. Baugh, C. M., Krumdieck, C. L., Baker, H. J. & Butterworth, C. E.: Studies on the Absorption and Metabolism of Folic Acid: **J. Clin. Invest.** 50, 2009-2021, 1971.
11. Wood, R. C. & Wise, M. F.: Conversion of folic acid derivatives to their conjugated forms by cells of Streptococcus fecalis: **Tex. Rep. Biol. Med.**; 23 (Suppl.); 512-529, 1965.
12. Flynn, L. M.: Collaborative Study of Microbiological Assay For Folic Acid: **Journal of the A.O.A.C.**; 47, 765-771, 1964.
13. Flynn, L. M.: Microbiological Assays of Folic Acid Activity in Foods: Changes in Results with variation of Experimental conditions and Methods: **Ibid.**; 48, 1230-1235, 1965.