

La determinación “in vitro/in vivo” de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza

Abril 2000

**Dr. Gregorio Varela-Moreiras
Dra. Elena Alonso Aperte y
Rosalía Póo Prieto**

*Facultad de Ciencias
Experimentales y Técnicas.
Universidad San Pablo-CEU, Madrid*

4



SUMARIO

La determinación “in vitro/in vivo” de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza

1	ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA BIODISPONIBILIDAD DEL ÁCIDO FÓLICO CONTENIDO EN CERVEZA: EFECTO SOBRE ALGUNOS MARCADORES CLAVE DEL CICLO DE LA METIONINA/METILACIÓN	4
	1.1. Ácido Fólico	4
	1.1.1. Descubrimiento	4
	1.1.2. Estructura química	4
	1.1.3. Absorción y metabolismo	7
	1.1.4. Funciones bioquímicas y actividad biológica	10
	1.2. Folatos y Salud	12
	1.2.1. La carencia clásica	12
	1.2.2. Las nuevas funciones	12
	1.3. Recomendaciones Dietéticas	15
	1.4. Fuentes Alimentarias	19
	1.5. Cerveza y Ácido Fólico	21
	1.5.1. Desarrollo de un método de cromatografía de afinidad y HPLC para el análisis de folatos	23
	1.5.2. Contenido y distribución de folatos en cerveza	32
2	ESTUDIO <i>IN VIVO</i> MEDIANTE EL EMPLEO DE UN MODO EXPERIMENTAL ANIMAL DEL EFECTO DE LA CERVEZA VS. OTRAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS EN RELACIÓN CON ALGUNOS MARCADORES CLAVES DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO	35
3	ANEXO DE RESULTADOS	42
4	CONCLUSIONES	53
	• BIBLIOGRAFÍA	55

1

1.1. ÁCIDO FÓLICO

1.1.1. DESCUBRIMIENTO

El término ácido fólico se aplica en realidad a toda una familia de vitámeros con actividad biológica equivalente. Dentro de la nomenclatura, otros términos como folato, folatos, y folacina se suelen emplear indistintamente. En algunos casos también se utiliza el término vitamina B₉ (1).

El ácido fólico fue aislado en 1943 por el grupo de E.L. Robert Stokstad, a lo que siguió la identificación y síntesis del ácido pteroilmonoglutámico en 1945 (2). Quince años antes, Lucy Wills había descrito un "nuevo factor hematopoyético" en la levadura, que tenía capacidad para curar la anemia macrocítica tropical en la India: a este nuevo y desconocido factor se le denominó "Factor Wills", encontrándose en extracto de hígado utilizado para la curación de la anemia perniciosa. Tras diferentes intentos de identificar este factor para el que se le asignaban diversos nombres (vitamina M, vitamina B_C), fueron Mitchell y col. en 1941 (3) quienes propusieron el término "ácido fólico" a un factor de crecimiento presente en las hojas de las espinacas.

Las interacciones metabólicas del ácido fólico con la vitamina B₁₂ y su común asociación con la anemia megaloblástica han constituido una parte muy importante de la historia de ambas vitaminas. De forma retrospectiva podemos reconocer que la vitamina B_C era lo que hoy conocemos como ácido fólico, y que quedaba en el aire un "factor extrínseco" que posteriormente se denominaría vitamina B₁₂.

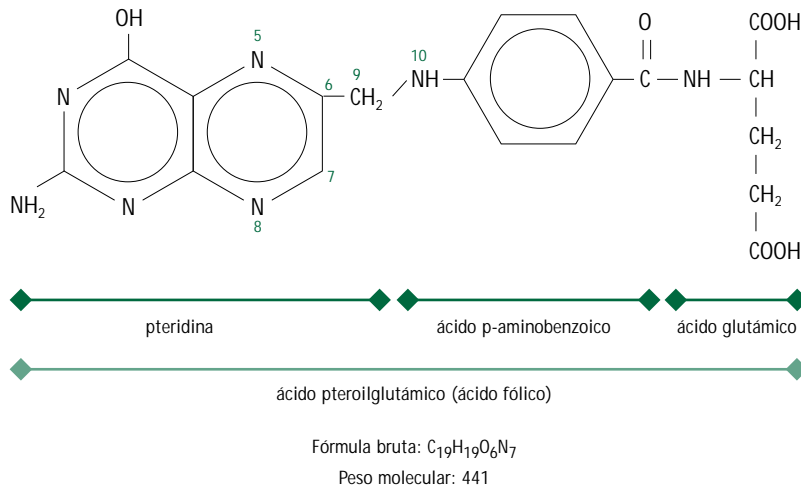
La primera mitad del presente siglo se ocupó de la identificación y síntesis de las formas de la vitamina para el tratamiento de la deficiencia y anemia, mientras que la segunda mitad ha estado orientada a la nueva investigación en relación a la absorción y metabolismo y sus nuevas funciones frente a cáncer, enfermedades cardiovasculares y defectos de nacimiento.

1.1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA

Todos los folatos tienen en común la estructura del ácido pteroilglutámico (PteGlu), molécula constituida por un anillo de pteridina unido por un puente metileno a un residuo de ácido p-aminobenzoico que a su vez se une por enlace amida a un resi-

duo de ácido glutámico (Figura I). Los distintos folatos se diferencian en el anillo de pteridina, que puede presentar varias formas reducidas y varios tipos de sustituciones, y en el residuo de p-aminobenzoglutamato, que puede presentar unidos en enlace peptídico un número variable de residuos de glutamato.

Figura I. Estructura química del ácido pteroilglutámico



El anillo de pteridina puede encontrarse parcialmente reducido en la posición 7,8 ($H_2PteGlu_n$ o DHF) o completamente reducido en las posiciones 5,6,7 y 8 ($H_4PteGlu_n$ o THF). El tetrahydrofolato, a su vez, es capaz de aceptar unidades de un solo átomo de carbono que se fijan en las posiciones 5, 10 ó ambas y pueden encontrarse en diferentes estados de oxidación :

- en las formas más oxidadas, la sustitución se puede producir en la posición 5 (5-formil- $H_4PteGlu_n$), en la posición 10 (10-formil- $H_4PteGlu_n$) o en ambas (5,10-metenil- $H_4PteGlu_n$),
- en las formas intermedias, la sustitución ocupa ambas posiciones (5,10-metilén- $H_4PteGlu_n$)
- en las formas más reducidas, la sustitución ocupa la posición 5 (5-metil- $H_4PteGlu_n$).

Así mismo, todos los folatos pueden presentar un número variable de residuos glutámicos unidos a la estructura, siendo los más frecuentes en el organismo los mono-, penta- y hexaglutamatos (4). Los derivados reducidos de los poliglutamatos son los que constituyen las formas biológicamente activas y las posiciones N5 y N10 son los sitios activos de la molécula de los folatos.

En la tabla 1 quedan reflejados los diferentes derivados que constituyen la familia de los folatos y las nomenclaturas más frecuentemente utilizadas.

Tabla 1. *Los folatos. Esquema de estructuras y nomenclaturas*

Nombre del compuesto	Característica estructural	Abreviaturas
ácido pteroilglutámico ácido fólico	no reducido, sin sustituciones	PteGlu
dihidrofolato ácido dihidrofólico	-H en 5,6	H ₂ PteGlu _n DHF
tetrahydrofolato ácido tetrahidrofólico	-H en 5,6,7,8	H ₄ PteGlu _n THF
5-formiltetrahydrofolato * ácido 5-formiltetrahidrofólico ácido folínico	-CHO en 5	5-formil-H ₄ PteGlu _n 5-formil-THF
10-formiltetrahydrofolato ácido 10-formiltetrahidrofólico	-CHO en 10	10-formil-H ₄ PteGlu _n 10-formil-THF
5,10-meteniltetrahydrofolato * ácido 5,10- meteniltetrahidrofólico	-CH= en 5,10	5,10-metenil-H ₄ PteGlu _n 5,10-metenil-THF
5,10-metiléntetrahydrofolato * ácido 5,10-metiléntetrahidrofólico	-CH ₂ - en 5,10 5,10-metilén-THF	5,10-metilén-H ₄ PteGlu _n
5-metiltetrahydrofolato * ácido 5-metiltetrahidrofólico	-CH ₃ en 5	5-metil-H ₄ PteGlu _n 5-metil-THF
...monoglutamato ...poliglutamato	1 glutamato n glutamatos	...PteGlu ...PteGlu _n

(*) A pesar de la presencia de sustituyentes en el anillo de pteridina y, por tanto, de saturarse el doble enlace 5-6 con un sólo hidrógeno, el prefijo indicando reducción (tetrahydro-) sigue manteniéndose por convenio (5).

1.1.3. ABSORCIÓN Y METABOLISMO

Absorción

Los folatos en la alimentación se encuentran en su mayor parte (90%) como poliglutamatos ligados a proteínas. En el intestino, son liberados de las proteínas alimentarias por acción de las proteasas digestivas. Posteriormente, los folilpoliglutamatos deben perder sus residuos glutámicos para poder ser absorbidos a nivel intestinal (7,8). La pteroilpoliglutamato hidrolasa presente en la membrana de "borde en cepillo" de las células intestinales es el enzima que cataliza la reacción. Los monoglutamatos así formados ingresan en la célula intestinal mediante un mecanismo de transporte activo, aunque a altas dosis el mecanismo de absorción de elección es la difusión pasiva. En el "borde en cepillo" se ha descrito una proteína de alta afinidad por los folatos, llamada la "proteína ligante de folatos" que podría estar implicada en el transporte activo (9).

Los folatos que ingresan en la célula intestinal son transferidos al plasma sin sufrir apenas más transformaciones, a excepción de una pequeña parte que es reducido y metilado para dar lugar a 5-metilTHF.

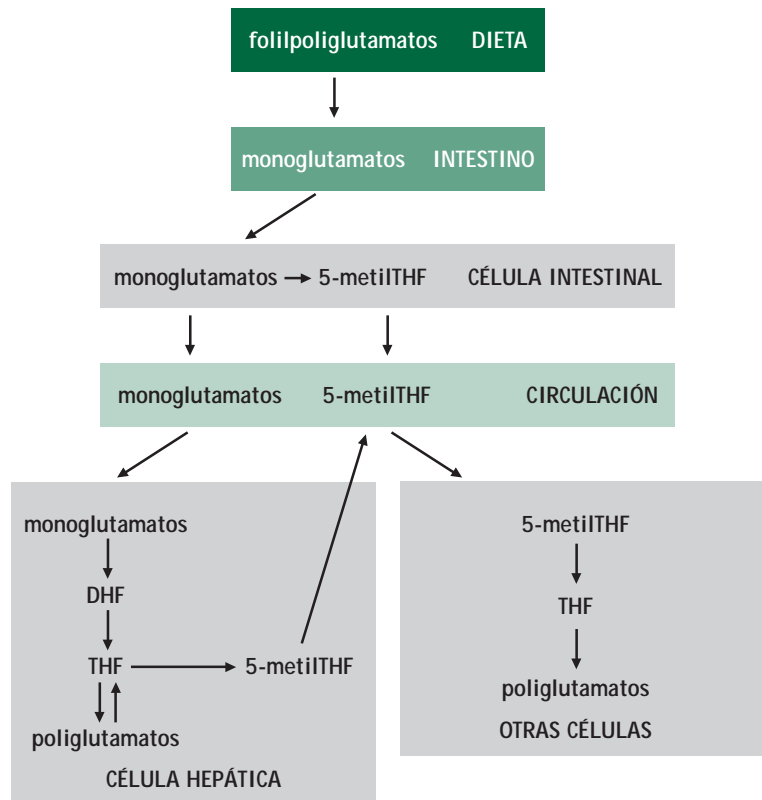
Distribución

El 5-metilTHF por la circulación general difunde a los tejidos y los demás derivados monoglutámicos son metabolizados principalmente a nivel del hígado. Allí, los monoglutamatos son reducidos y metilados formándose 5-metilTHF, el cual es cedido de nuevo a la circulación desde donde llegará a todos los tejidos. Las formas activas van a ser siempre las formas reducidas. Por ello, en el hígado y otros tejidos existe un enzima, la dihidrofolato reductasa, que cataliza la reducción a dihidrofolato (DHF) y tetrahidrofolato (THF). Además, el hígado también almacena folatos como poliglutamatos, principalmente como pentaglutamatos. Estas reservas (en torno a 5 ó 10mg) son suficientes para cubrir las necesidades durante aproximadamente 4 meses.

Gracias al metabolismo hepático, la forma circulante mayoritaria es el 5-metilTHF. En la circulación, el 5-metilTHF se encuentra unido a proteínas, principalmente a albúmina y a una proteína de alta afinidad por los folatos, la llamada "proteína ligante de folatos". La tasa plasmática de folatos es de 10 a 30nmol/l mientras que en los eritrocitos se encuentra en una concentración de 10 a 30 veces más alta.

Los folatos se distribuyen en el organismo a través de la circulación principalmente hacia tejidos de rápida división celular, como la médula ósea o la mucosa gastrointestinal, ya que necesitan el folato para la síntesis de ADN. En los tejidos de mamíferos, se encuentran principalmente como derivados poliglutamados, encontrándose los pteroilmonoglutamatos únicamente en plasma y orina. La poliglutamilación y las proteínas ligante de folatos son las responsables de la retención de los folatos en los tejidos (10,11).

Figura II. Absorción y distribución de los folatos en el organismo



(adaptado de (6))

El contenido total de folatos en el organismo se encuentra entre 5 y 10mg, siendo los órganos más ricos en folatos el hígado (2,7-15,6 μ g/g) y el cerebro. La tasa de folatos en líquido cefalorraquídeo es 3 ó 4 veces superior a la tasa plasmática (6).

Metabolismo

A nivel de los tejidos periféricos, el 5-metilTHF penetra en el interior de la célula gracias a un sistema específico. Allí, pierde su grupo metilo al cederlo a la homocisteína en la síntesis de metionina, reacción que es catalizada por la metionina sintasa, enzima que también requiere de la vitamina B₁₂ para su actividad. El THF formado es el sustrato preferente en las reacciones de poliglutamación, en las cuales la folilpoliglutamato sintasa adiciona de nuevo los residuos glutámicos y los folatos quedan retenidos en el interior de la célula, ya que sólo pueden abandonarla si se transforman de nuevo en derivados monoglutámicos. El mecanismo de poliglutamación implica que la mayoría de los folatos celulares contienen cinco o seis residuos de glutamato. Sin embargo, hay condiciones especiales como la deficiencia dietaria, alcoholismo, terapia con metotrexato y otros fármacos antifolato, que se han asociado con una mayor elongación de la cadena de restos de ácido glutámico, aunque el mecanismo de este fenómeno no se conoce bien.

Eliminación

Los folatos son eliminados del organismo a través de las vías fecal y urinaria. En las heces aparecen folatos procedentes de la fracción alimentaria que no es absorbida (aproximadamente un 20%), de la secreción biliar y de la síntesis por las bacterias intestinales. Parte de los folatos secretados en la bilis son de nuevo reabsorbidos, estableciéndose un ciclo enterohepático importante. Así mismo, los folatos sintetizados por las bacterias intestinales pueden ser absorbidos, contribuyendo en pequeña proporción al estatus corporal en folatos.

A través de la orina se eliminan los folatos metabolizados como pteridinas y ácido benzoilglutámico, compuestos que se forman tras la ruptura del enlace C9-N10 del ácido fólico. A nivel renal, también se produce una importante reabsorción tubular de los folatos filtrados. El rango de folatos eliminados por vía urinaria oscila entre 1 y 10 μ g/día en forma de metabolitos (6).

1.1.4. FUNCIONES BIOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En la célula, la función de los folatos reside principalmente en su capacidad para donar y captar unidades de carbono. El THF es capaz de captar el grupo metilo de la serina en una reacción reversible catalizada por la serina hidroximetil transferasa que da lugar a 5,10-metilénTHF (Figura III).

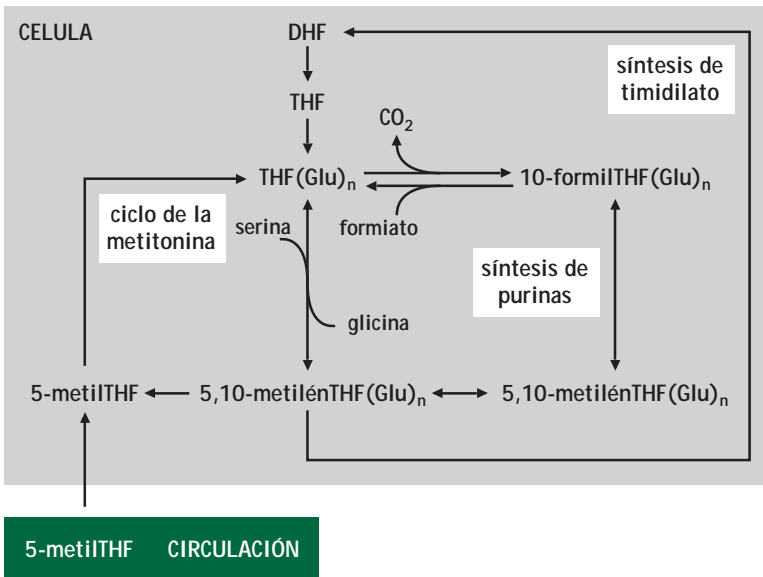
El 5,10-metilénTHF es el derivado más inestable y se disocia en seguida en formaldehído y THF pero, sin embargo, participa en una serie de reacciones de gran importancia :

- Cede el grupo metileno y dos electrones del anillo de pteridina para la síntesis de deoxitimidina monofosfato a partir de deoxiuridina monofosfato y participa por ello en la síntesis de timidilato y ADN. En esta reacción, catalizada por la timidilato sintasa, se genera DHF, el cual debe reducirse para volver a entrar en el ciclo de derivados activos.
- Puede oxidarse en una reacción reversible catalizada por la metiléntetrahydrofolato deshidrogenasa y dar lugar a 5,10-metenilTHF, el cual a su vez puede transformarse en 10-formilTHF por acción de la metiléntetrahydrofolato ciclohidrolasa. El 5,10-metenilTHF y el 10-formilTHF participan en la síntesis de purinas.
- Puede reducirse en una reacción irreversible catalizada por la metiléntetrahydrofolato reductasa dando lugar a 5-metilTHF.

El 5-metilTHF es el derivado que cede su grupo metilo en la síntesis de metionina a partir de homocisteína en una reacción catalizada por la metionina sintasa, enzima que además requiere la presencia de vitamina B₁₂ como cofactor. Esta es una de las reacciones principales del ciclo de la metilación, en el cual se sintetiza S-adenosilmetionina, molécula que actúa como donante de grupos metilo en un sinnúmero de reacciones de transmetilación implicadas en el metabolismo celular. Además, es la única reacción en la que el 5-metilTHF puede perder su grupo metilo. Como se ha indicado anteriormente, los folatos en la circulación se encuentran principalmente en la forma de 5-metilTHF. Para que puedan ser retenidos en la célula es necesario que adquieran residuos glutámicos adicionales, pero el 5-metilTHF no es buen sustrato de la folilpoliglutamato sinta-

sa. El 5-metilTHF debe demetilarse en la reacción catalizada por la metionina sintasa para convertirse en THF y ser susceptible de poliglutamilación, por lo que esta reacción es también necesaria para la captación de los folatos circulantes (4).

Figura III. *Metabolismo y función de los folatos en el organismo*



En resumen, los folatos participan en el metabolismo de ciertos aminoácidos, en la síntesis de S-adenosilmetionina y en la síntesis de purinas y pirimidinas. En cuanto a los aminoácidos, participan en el catabolismo de la histidina y la glicina, en la interconversión glicina-serina y en la síntesis de metionina. También participan en la síntesis de proteínas al actuar en la reacción de formilación de la metionina. La S-adenosilmetionina es la molécula donante de grupos metilo. Las purinas (adenina y guanina) y las pirimidinas (timina, citosina, uracilo) se unen a moléculas de azúcares (ribosa y desoxiribosa) y ácido fosfórico para formar los nucleótidos (AMP, GMP, TMP, CMP, UMP). Los nucleótidos forman parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y de derivados de gran importancia metabólica (AMPcíclico, ATP, GTP, etc.).

1.2. FOLATOS Y SALUD

1.2.1. LA CARENCIA CLÁSICA

Sintomatología. El ácido fólico es un nutriente esencial para la vida celular por lo que su deficiencia da lugar al desarrollo de patologías. El trastorno más frecuente que se produce como consecuencia de una deficiencia de ácido fólico es la anemia macrocítica y megaloblástica, cuya sintomatología clínica es muy parecida a la de la anemia inducida por deficiencia de vitamina B₁₂. Si se instaura de forma crónica, además de signos hematológicos, aparecen signos generales y neuropsiquiátricos. Entre los signos generales, cabe destacar la astenia y la anorexia, que van apareciendo de forma progresiva. Entre los signos neuropsiquiátricos se observan trastornos del sueño y la memoria, irritabilidad y convulsiones. En algunos casos también se puede producir neuropatía periférica, síndrome cerebeloso, depresión y demencia.

Cuando la deficiencia se produce de forma aguda, como en el caso de la administración de fármacos antifolatos (ej. metotrexato), se manifiesta a través de sintomatología digestiva, cutánea y hematológica. A nivel del digestivo se producen náuseas y diarrea. En cuanto a la sintomatología cutánea, la deficiencia aguda produce ulceración en las mucosas bucofaringeas y dermatitis de aspecto variable (herpetiforme, eczematosa, exfoliativa o de tipo acneico) (6).

Cuando los depósitos corporales de folatos son normales, la deficiencia tarda unos 4 meses en desarrollarse. Si hay depleción inicial de los depósitos, la sintomatología aparece a los 2 ó 3 meses (12). Los síntomas y signos de la carencia revierten o mejoran con la administración de ácido fólico siempre que las lesiones, sobre todo de tipo neurológico, no sean ya irreversibles.

En nuestro laboratorio, en diferentes situaciones experimentales, hemos inducido deficiencia en ácido fólico, ya sea mediante dieta o debido a la interacción con diferentes fármacos (13, 14, 15, 16, 17)

1.2.2. LAS NUEVAS FUNCIONES

La anemia megaloblástica sigue siendo una patología frecuente especialmente en poblaciones de riesgo como embarazadas o alcohólicos, pero en la actuali-

dad la deficiencia o la suplementación de ácido fólico parece también relacionarse con otro tipo de patologías, de manera que se han propuesto nuevas fórmulas de terapia o prevención basadas en el ácido fólico.

La Prevención de los Defectos del Tubo Neural (DTN).

Los DTN son malformaciones congénitas que afectan a la formación del tubo neural. En sus diferentes formas (anencefalia, meningocele, espina bífida), son especialmente graves y muchas veces incompatibles con la vida. La etiología de estos DTN es multifactorial y en ella están implicados tanto factores genéticos como ambientales, entre los que el estatus nutricional en ácido fólico juega un papel importante. Este hecho ha sido demostrado en varios estudios. Por ejemplo, Kirke y col. (18) y Daly y col. (19) demostraron que la concentración sanguínea de folatos al inicio de la gestación es un factor de riesgo independiente en el desarrollo de los DTN, ya que riesgo y folatos se relacionan de forma inversa, de manera que el riesgo es 8 veces mayor en las mujeres cuyos niveles de folatos son menores que $150\mu\text{g/l}$ que en aquellas con niveles de folatos superiores a $400\mu\text{g/l}$. Otros estudios observacionales también parecen demostrar que el uso de preparados multivitamínicos con ácido fólico o la ingesta elevada de folatos en la dieta ejerce un papel protector frente a la incidencia de DTN (20-22).

Sin embargo, los estudios de intervención, en los que se ha determinado el efecto de la suplementación materna con ácido fólico durante la gestación sobre la prevalencia de DTN en los hijos, han sido los más definitivos para establecer el papel preventivo del ácido fólico en las primeras etapas de la gestación. El más significativo fue el realizado por el Consejo de Investigaciones Médicas del Reino Unido (United Kingdom Medical Research Council (MRC)). Este organismo planeó un ensayo doble ciego y aleatorizado para evaluar el papel de la suplementación con ácido fólico en la prevención de DTN. El estudio se realizó en 33 centros en 7 países diferentes e involucró a un total de 1.817 mujeres de alto riesgo, es decir, que ya habían padecido un embarazo afectado por DTN, que planeaban una nueva gestación. Las mujeres fueron clasificadas aleatoriamente en cuatro grupos experimentales que recibieron respectivamente: ácido fólico, ácido fólico y suplemento polivitamínico sin ácido fólico, suplemento polivitamínico sin ácido fólico o placebo. La dosis de ácido fólico empleada fue de 4mg diarios. Se completaron 1195 gestaciones antes de que el ensayo se interrumpiera al considerarse que los resultados eran suficientemente

concluyentes : entre las 593 mujeres que tomaron el suplemento de ácido fólico, sólo se observaron 6 casos de DTN (1%), mientras que entre las 602 mujeres que no lo recibieron, padecieron DTN 21 hijos (3,5%). Es decir, la suplementación con 4mg diarios de ácido fólico en la etapa periconcepcional redujo el riesgo de recurrencia de DTN en un 72%. El preparado polivitamínico sin ácido fólico no ejerció, sin embargo, ningún efecto protector (23).

El estudio del MRC descrito anteriormente fue un ensayo de recurrencia, es decir, se evaluaba la capacidad del ácido fólico para prevenir un embarazo afectado por DTN en una mujer que ya había padecido uno o más embarazos afectados y que, por tanto, es considerada de alto riesgo. En un ensayo realizado en Hungría, Czeizel y Dudás (24,25) evaluaron la capacidad del ácido fólico para prevenir la ocurrencia de DTN, es decir un primer embarazo afectado. El ensayo fue doble ciego y aleatorizado y en él se administró diariamente un suplemento multivitamínico con 0,8mg de ácido fólico o un suplemento mineral. Ningún niño nació con DTN entre las 2.391 madres que recibieron el suplemento vitamínico con ácido fólico y 6 casos se detectaron entre las 2.052 madres que recibieron el suplemento mineral. La suplementación con 0,8mg diarios de ácido fólico en la etapa periconcepcional redujo el riesgo de ocurrencia de DTN significativamente.

La regulación de la Homocisteína.

La concentración elevada de homocisteína en sangre se asocia con la enfermedad vascular (26), ya que el aminoácido podría estar implicado en la oclusión vascular y en la trombogénesis (27). Gracias a la implicación del ácido fólico en el metabolismo de la homocisteína, la suplementación con ácido fólico puede ser efectiva en el tratamiento de la hiperhomocisteinemia y, por tanto, en la prevención de las lesiones vasculares a distintos niveles (28, 29).

En uno de los primeros estudios de intervención realizados, Brattström y col. (30) observaron una reducción significativa de la concentración de homocisteína administrando suplementos con una dosis de 5mg/día de ácido fólico en hombres y mujeres ligeramente hiperhomocisteinémicos. Posteriormente, Ubbink (31) también consiguió normalizar la concentración de homocisteína administrando un complejo vitamínico con ácido fólico en una dosis más baja (1mg/día) y además vitamina B₆ (12,2mg/día) y vitamina B₁₂ (0,4mg/día). Posteriormente, este mismo grupo evaluó la capacidad de las tres vitaminas B, en conjunto y por separado, y observaron que el ácido fólico en una dosis de 650µg/día era capaz de reducir la concentración de

homocisteína en casi un 50% en pacientes con ligera hiperhomocisteinemia, mientras que la vitamina B₆ no producía ningún efecto y la vitamina B₁₂ reducía la concentración de homocisteína en una menor magnitud (14,8%) (28). El efecto del combinado, por tanto, era debido al ácido fólico.

En otro sentido, cuando se relaciona la ingesta de ácido fólico con la concentración plasmática de homocisteína, se establece una correlación negativa entre ambas, de manera que las concentraciones más bajas de homocisteína se mantienen cuando la ingesta de ácido fólico alcanza los 350-400µg/día (32,33). Así mismo, en estudios observacionales parece demostrarse también que la baja concentración de folatos en suero se asocia a un mayor riesgo de infarto (34) y enfermedad coronaria (35).

La prevención del cáncer.

El estatus en folatos puede participar en la modulación de las transformaciones neoplásicas, especialmente a nivel de ciertos tejidos epiteliales. La deficiencia en ácido fólico parece acelerar el desarrollo tumoral y la suplementación con ácido fólico podría prevenir el avance del proceso tumoral, especialmente en el cáncer de estómago y colon, o reducir el riesgo de carcinogénesis (36). Son necesarios, sin embargo, mayor número de estudios para clarificar el papel del ácido fólico en la prevención del cáncer.

1.3. RECOMENDACIONES DIETÉTICAS

Población General

Las ingestas recomendadas para folatos se calculan en base al requerimiento mínimo de ácido fólico puro aumentando la cantidad para cubrir la biodisponibilidad incompleta, la variación individual y la necesidad de reservas adecuadas.

La tabla 2 recoge las recomendaciones dietéticas actuales para la población española (37) y para la población estadounidense (38), según la edad, sexo y estado fisiológico. En la tabla 3 quedan reflejadas las recomendaciones dietéticas de ácido fólico para adultos (mayores de 18 años) propuestas por diferentes organismos mundiales y europeos (39).

Tabla 2. Recomendaciones dietéticas de ácido fólico: España y Estados Unidos

Categoría y edad (años)	Recomendaciones dietéticas españolas (µg/día)	Recomendaciones dietéticas estadounidenses (µg/día)
Niños		
0-0,5	40	25
0,5-1	60	35
1-3	100	50
4-6	100	75
7-10	100	100
Hombres		
10-12	100	150
12-51+	200	200
Mujeres		
10-12	100	150
12-51+	200	180
Gestación	+200	400
Lactación	+100	260-280

(adaptado de Moreiras y col. (37) y Food and Nutrition Board (38))

Tabla 3. Recomendaciones dietéticas de ácido fólico para adultos: Organismos internacionales y Europa

	Hombres (µg/día)	Mujeres (µg/día)
FAO/WHO	200	170
Estados Unidos	200	180
Reino Unido	200	200
Holanda	200-300	200-300
Francia	300	300
Alemania	300	300
España	200	200

(adaptado de de Bree (39))

Prevención de los Defectos del Tubo Neural

Recurrencia. En 1991, el Consejo Médico del Reino Unido, como conclusión al estudio realizado, publicó :

"La suplementación con ácido fólico puede ser ya recomendada a todas las mujeres que han padecido embarazos afectados por DTN y los organismos encargados de la salud pública deben tomar medidas para asegurar que todas las mujeres en edad de procrear reciben suficiente ácido fólico."
(23)

La respuesta de las autoridades sanitarias al llamamiento realizado en el estudio del Consejo Médico del Reino Unido, no se hizo esperar mucho. En ese mismo año, el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (Centers for Disease Control, CDC) recomendó que todas las mujeres que habían padecido anteriormente un embarazo afectado por DTN y que planearan una nueva gestación tomaran un suplemento de 4mg diarios de ácido fólico con el fin de prevenir la recurrencia de DTN. El suplemento debía tomarse como mínimo desde un mes antes de la concepción y durante el primer trimestre de la gestación (40). Esta recomendación se dirigió únicamente a mujeres de alto riesgo y no incluía a: mujeres que nunca hubieran padecido un embarazo afectado por DTN, familiares de madres con hijos afectados por DTN, mujeres con espina bífida o mujeres epilépticas en tratamiento con valproato.

Algo más tarde, las autoridades sanitarias en Reino Unido y Holanda formularon recomendaciones similares (4-5mg/día) para reducir el riesgo de recurrencia de DTN (41,42). Esta recomendación sigue hoy siendo aceptada (39). Aun en dosis muy elevadas (15mg/día) no se han descrito efectos tóxicos adversos del ácido fólico en sujetos sanos. Sin embargo, la suplementación en dosis superiores a 1mg/día podría complicar el diagnóstico de la deficiencia de vitamina B₁₂ y en el caso de la epilepsia, podría inducir ataques epilépticos en pacientes bajo tratamiento anticonvulsivante (43,44). Debido a estos efectos secundarios potenciales, los suplementos de ácido fólico en dosis comprendidas entre 4 y 5mg/día sólo deben administrarse bajo supervisión médica.

Ocurrencia. En lo referente a la prevención de la ocurrencia de los DTN (primer embarazo afectado), la dosis mínima eficaz de ácido fólico no está tan definida. En los diferentes estudios realizados, se ha observado reducción significa-

tiva del riesgo con dosis que van desde 0,4mg/día hasta 1mg/día (20,21,24,45). Como resultado de todos estos estudios, los Departamentos de Salud de Estados Unidos (US Department of Health and Human Services) y Holanda (Health Council/Food and Nutrition Council) ampliaron la recomendación a todas las mujeres :

"Todas las mujeres en edad de procrear que puedan quedarse embarazadas deben consumir 0,4mg de ácido fólico diarios (naturales, de alimentos fortificados o de suplementos) con el fin de reducir el riesgo de un embarazo afectado por espina bífida u otro tipo de DTN." (42,46).

En la recomendación holandesa, se especificaron también como mujeres con un mayor riesgo de embarazo afectado por DTN a aquellas en tratamiento anti-epiléptico, pacientes con diabetes mellitus o mujeres bajo tratamiento hormonal para inducir la ovulación. En estos casos, recomendaban la ingesta de suplementos farmacológicos con 0,4mg/día además de la dieta normal. Para obtener la cantidad de ácido fólico necesaria, se propusieron tres medidas:

- Cambio de los hábitos alimentarios hacia el consumo de alimentos ricos en folatos.
- Fortificación de alimentos con ácido fólico.
- Uso de suplementos vitamínicos farmacológicos.

Recomendaciones similares han sido propuestas en el Reino Unido (41), Australia (47) y Canadá (48).

En Estados Unidos, el país pionero en las recomendaciones de ácido fólico, ya se han iniciado campañas activas de prevención de DTN. La organización encargada de la regulación de drogas y alimentos (Food and Drug Administration, FDA) ha propuesto la fortificación de cereales en una cantidad de 140µg de ácido fólico por 100g de cereal (49). Poco después también aprobó que en el etiquetado de los alimentos tradicionalmente fortificados (como los cereales de desayuno) o los ricos en folatos de forma natural, se indicara su importancia en la prevención de los DTN (50). La fortificación de cereales con ácido fólico en Estados Unidos es obligatoria desde el 1 de Enero de 1998.

Regulación de la Homocisteína

Es difícil establecer una ingesta recomendada de ácido fólico para mantener normalizada la concentración de homocisteína porque no está bien establecido el rango de valores normales para el aminoácido. Hasta ahora, se viene considerando normal la concentración plasmática de homocisteína por debajo de $16,3\mu\text{mol/l}$ (28,31,51) y se consideran hiperhomocisteinémicos aquellos que la presenten por encima. Sin embargo, algunos estudios parecen indicar que la suplementación con ácido fólico en dosis de 400 y $500\mu\text{g/día}$ puede reducir más aún la concentración de homocisteína en personas cuya concentración se considera normal (52), lo que nos indica que el rango de valores normales puede encontrarse por debajo de lo que se viene considerando hasta ahora. En base a lo que se conoce hasta el momento, sería necesaria una ingesta de al menos $350\mu\text{g/día}$ de ácido fólico para mantener "normal" la concentración plasmática de homocisteína y un suplemento de, al menos, $650\mu\text{g/día}$ para reducir concentraciones elevadas de homocisteína (39).

1.4. FUENTES ALIMENTARIAS

Formas

En los alimentos, los folatos se encuentran mayoritariamente como derivados poliglutámicos y pueden presentarse todas las formas en base al estado de oxidación y las sustituciones sobre el anillo de pteridina. El término ácido fólico fue introducido por primera vez por Mitchell y col. en 1941 para describir un factor aislado de las hojas de espinaca, de las cuales tomó el nombre. El propio nombre, del latín "*folium*", es indicativo de los alimentos más ricos en esta vitamina: las hojas. El ácido fólico, entendido como ácido pteroilmonoglutámico, está totalmente oxidado y es la forma sintética que normalmente aparece en los suplementos, pero no de forma natural, en cantidades significativas.

Alimentos

Las principales fuentes alimenticias "clásicas" de folatos son, por tanto, las verduras y hortalizas, entre las cuales cabe destacar: las acelgas y espinacas

(140 μ g/100g PC PC:porción comestible), los grelos y las nabizas (140 μ g/100g PC), la remolacha (90 μ g/100g PC), las coles y los guisantes (78 μ g/100g PC). Así mismo, los garbanzos que, hay que recordar, es una leguminosa de amplio consumo en la dieta española, presentan un elevado contenido de folatos (180 μ g/100g PC). Algunas frutas frescas como la naranja, el melón o el plátano aportan también folatos pero su contenido es menor (20-40 μ g/100g PC) y los frutos secos tales como almendra, avellana o aguacate presentan un contenido alto de folatos (96-110 μ g/100g PC). Otra buena fuente de folatos son los cereales de desayuno fortificados (150-200 μ g/100g PC). La leche y derivados lácteos contienen 5-50 μ g/100g PC y las carnes y pescados son, en general, fuentes pobres de folatos a excepción del hígado (182 μ g/100g PC) (37).

Procesos culinarios

Los folatos son sensibles a la luz, los ácidos, los álcalis, los oxidantes y los reductores. Por su carácter hidrosoluble también pueden perderse con el agua de cocción de los alimentos. Por ello, se estima que prácticamente el 50% del contenido inicial de folatos en los alimentos se pierden en los procesos culinarios. La elaboración al vapor o la fritura conducen a pérdidas del contenido inicial en folatos que pueden alcanzar el 90%. Las verduras pierden casi el 70% de su contenido en folatos al hervirlas durante 8 min, en gran parte por disolución en el agua de cocción (12,53).

Biodisponibilidad

La estimación de la eficacia con que se absorben los folatos y de su biodisponibilidad es todavía incompleta. Sólo los monoglutamatos se absorben directamente en el intestino, mientras que los poliglutamatos deben ser primero hidrolizados a monoglutamatos por acción de un enzima intestinal, la pteroilpoliglutamato hidrolasa. En conjunto, se absorben alrededor del 90% de los monoglutamatos y entre el 50 y el 90% de los poliglutamatos, aunque las cifras varían mucho según el tipo de alimento y la metodología de análisis empleada. Estas diferencias entre alimentos se deben a la presencia de inhibidores de la hidrolasa, copuladores u otros factores desconocidos (54,55). Las diferencias entre ensayos radican principalmente en la dificultad que entraña la determinación de los folatos en alimentos y en la estimación del verdadero folato endógeno que se eli-

mina, ya que existe una síntesis bacteriana del mismo. Ejemplos de alimentos con alta disponibilidad de folatos son el plátano, la lima, la piña, el hígado y las levaduras. Por el contrario, ejemplos de alimentos con baja disponibilidad de folatos son el zumo de naranja, la lechuga, la yema de huevo, la col, la semilla de soja y la simiente del trigo (12).

1.5. CERVEZA Y ÁCIDO FÓLICO

La cerveza es una bebida de baja graduación alcohólica, obtenida por fermentación de un extracto acuoso de cebada malteada. En nuestro país sigue un patrón de consumo moderado, casi siempre asociado a nuestro característico "tapeo".

La cerveza es una bebida de bajo contenido calórico, aproximadamente 32 Kcal por 100 ml (37), no contiene grasas y sí una cantidad considerable de hidratos de carbono, vitaminas y proteínas. Dentro de este amplio espectro de nutrientes, nuestro interés radica básicamente en el ácido fólico, vitamina hidrosoluble del grupo B, que en la cerveza se encuentra en cantidades comprendidas entre 1 y 10 $\mu\text{g}/100$ ml dependiendo del tipo de cerveza y los métodos analíticos empleados. Las Tablas de Composición de Alimentos Españoles indican un contenido de 4,1 $\mu\text{g}/100$ ml (37).

En la actualidad, las Ingestas Recomendadas de ácido fólico para la población adulta en los distintos países, incluyendo España, oscila entre 180 y 200 $\mu\text{g}/$ día. Por tanto, podemos estimar que el aporte de ácido fólico de una botella de tercio o una lata de 33 cl de cerveza al día sería de unos 20 a 25 μg , lo que supondría cubrir entre un 10 y un 15 % de las Ingestas Recomendadas para la vitamina. Este es un porcentaje muy importante por dos razones: hay pocos alimentos que "per se" puedan administrar tal cantidad de ácido fólico, y porque la cerveza se consume regularmente. Por ello, aunque pueda haber alimentos con mayor contenido de ácido fólico, tales como el hígado, también es indudable que la cerveza tiene una mayor aceptación para la mayor parte de la población. De tal modo, teóricamente la cerveza puede constituir una fuente relativamente importante de ácido fólico en la dieta española, por supuesto dentro de los límites que hoy se consideran de consumo moderado y responsable.

Cravo et al. (56) en un estudio realizado en alcohólicos crónicos, observaron que consumidores de cerveza presentaban concentraciones significativamente más bajas de homocisteína comparado con bebedores de vino o destilados. En consonancia con

estos estudios, la cerveza, de acuerdo con los resultados de la Estudio Nacional de Nutrición (E.N.N.A. 1991), es la única bebida alcohólica cuya ingesta se correlaciona de forma negativa con el riesgo de padecer cáncer. Este estudio de tipo "ecológico" analiza la asociación causa/efecto entre ingesta de alimentos/nutrientes y patrones de morbilidad/mortalidad.

Desde el punto de vista de la salud pública, no cabe duda de que estas nuevas funciones son de gran importancia, si se tiene en cuenta que a través de una modulación nutricional, podemos ser capaces de reducir el riesgo de problemas sanitarios graves y costosos. Por ello, ha habido un interés creciente en conocer la ingesta real de ácido fólico y las fuentes alimentarias más importantes, tanto por parte de la población general y la comunidad científica (57, 58), como por parte de autoridades sanitarias como la Food and Drug Administration en Estados Unidos (FDA, 1994) (59). Esto permitirá poder establecer estrategias para aumentar las ingestas actuales de ácido fólico en los diferentes países, ya sea vía dieta rica en folatos, a través de la fortificación de los alimentos, o mediante suplementación vitamínica (58,60,61).

En este sentido, nos encontramos con grandes diferencias en los valores de ingesta entre diferentes países y en el contenido de folatos reflejado en las tablas de composición de alimentos. Ello se debe en gran medida a la dificultad que entraña la determinación analítica de esta vitamina, debido principalmente a que el término folato -como ya se ha señalado en el apartado de estructura química- engloba una serie de vitámeros diversos, y con una base común que corresponde al ácido pteroilglutámico. Éste, a su vez, está formado por: un anillo de pteridina, un residuo de ácido p-aminobenzoico, -unido a la pteridina por un puente metileno mediante un enlace C9- N10-, y de uno a seis ácidos glutámicos.

Los distintos folatos se diferencian entre sí por los sustituyentes que se pueden localizar a lo largo de su molécula y los diferentes grados de reducción que el anillo de pteridina puede presentar. De este modo, el lograr un método de análisis único y reproducible es una tarea difícil, más aun, si además del contenido total de folatos, pretendemos determinar la distribución de los mismos en alimentos. La biodisponibilidad de los folatos, es decir, si los folatos en el alimento van a estar disponibles para ser verdaderamente utilizados por el organismo, va a depender en gran medida de la forma en que se encuentre el ácido fólico en los alimentos.

Entre los métodos existentes para la determinación de los folatos, los más utilizados son: el ensayo microbiológico con *Lactobacillus casei* (62) y el radioinmunoensayo (63). Ambos cuantifican el folato total, pero no proporcionan información alguna sobre la distribución de los distintos folatos.

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo de este proyecto ha sido el mejorar el conocimiento en cuanto al contenido total y la distribución de los folatos en algunos componentes habituales de la dieta, en concreto en la cerveza. Para ello se ha aplicado un método combinado de cromatografía de afinidad y HPLC, ya validado en muestras biológicas, lo que nos permite un análisis cuantitativo del folato total y un análisis cualitativo de la distribución de los diferentes derivados. Con ello, se evalúan las propiedades de los folatos en la cerveza, haciendo énfasis en su distribución, estabilidad y, finalmente, en su verdadera biodisponibilidad.

Por otro lado, mediante estudios en animales de experimentación, se ha estudiado si la cerveza -por su contenido en ácido fólico- puede ejercer un efecto distinto al de otras bebidas alcohólicas en diferentes parámetros de ciclo de la metionina, en concreto, folato, vitamina B6, vitamina B12 y homocisteína y en un período de tiempo prolongado.

Objetivos Específicos

- I Aplicación del método combinado de cromatografía de afinidad, seguido de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permita el análisis cualitativo y cuantitativo de folatos en cerveza.
- II Estudio "in vivo" mediante el empleo de un modelo experimental animal del efecto de la cerveza comparando con el de otras bebidas alcohólicas en relación con algunos marcadores claves del metabolismo del ácido fólico.

1.5.1. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD Y HPLC PARA EL ANÁLISIS DE FOLATOS

Desarrollo de un método combinado de cromatografía de afinidad, seguido de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permita el análisis cualitativo y cuantitativo de folatos en cerveza. Básicamente se ha aplicado el método descrito en las siguientes referencias:

- Varela Moreiras, G; Seyoum, E and Selhub, J (1991). *Combined affinity an ion pair liquid chromatographies for the analysis of folate distrubution in tissues.* J Nutr Biochem 2: 44-53.

- Seyoum, E and Selhub, J (1993) *Combined affinity and ion pair column chromatographies for the analysis of food folate*. J Nutr Biochem 4: 488-494.

En estas referencias se describe el método aplicado a tejidos biológicos y alimentos sólidos. El objetivo del estudio será aplicar la técnica en una bebida como la cerveza.

Fundamento

Este método nos permite medir simultáneamente los diferentes derivados de ácido pteroilglutámico de tejidos o alimentos, usando un procedimiento en el que primero se purifican de los folatos por cromatografía de afinidad usando proteína ligando del folato como inmovilizador. Posteriormente, mediante la técnica de HPLC, se separan los distintos derivados de folato, para luego identificarlos y cuantificarlos con un detector diodo array.

Procedimiento

1. Preparación de las Columnas de Afinidad

1.1 Preparación del gel Sefarosa-Folato

- Se lava la Sefarosa 4B, 400 ml, con 2 litros de agua y se suspende la Sefarosa lavada en 400 ml de agua y se somete a agitación. Es conveniente trabajar en campana de extracción de humos.
- Se adiciona a la suspensión 30 g de bromuro de cianógeno. Durante los 15-30 min siguientes se añade NaOH 5M de forma continua para mantener el pH de la suspensión entre 10 y 11. A su vez, se adiciona periódicamente hielo alrededor de la suspensión para mantener la temperatura entorno a 20° C.
- La activación se considera completa cuando los cristales de bromuro de cianógeno se disuelven totalmente y el pH se estabiliza entorno a pH 10. Llegado a este punto, se filtra a vacío la suspensión activada a través de un embudo con capa porosa de 600 ml y se lava con 1,5 – 2L de NaHCO₃ 0,1M frío (4°C).
- Se disuelve 1,8g de 1,6- diaminohexano en 400ml de NaHCO₃ 0,1M y se ajusta el pH a 9 con NaOH y se deja agitando durante 48h, a 4° C.

- Se filtra a vacío la suspensión activada, se lava con NaHCO_3 0,1M y se resuspende a temperatura ambiente en 400ml de NaHCO_3 0,1M.
- Se suspenden 4g de ácido fólico en 50ml de agua y se añaden unas gotas de NaOH 1M hasta la total disolución del ácido fólico. Se adiciona esta solución a la suspensión de Sefarosa, se agita y se ajusta el pH a 8,5 con NaOH.
- Mientras se agita a temperatura ambiente, se adicionan 4g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhídrico a lo largo de un período de 45min. Se continúa agitando la suspensión durante 3h a temperatura ambiente y posteriormente durante 48h a 4°C.
- Por último, se retira el folato libre, que no se ha unido a la matriz, lavando secuencialmente con 4L de NaCl 2M contenido en un tampón de fosfato potásico 0,05M (pH 7), 2L de agua, 1L de ácido acético y 2L de agua.
- El gel de folato-Sefarosa se suspende y almacena en volumen equivalente de azida sódica 0,3 % (p/v) a 4°C.

El bromuro de cianógeno es un producto extremadamente tóxico, se ha de manipular con sumo cuidado, siempre llevando la protección de guantes y mascarilla. También, se ha de prestar mucha atención para que en ningún momento la matriz se deshidrate, ya que esto supondría su inactivación.

1.2 Purificación de la proteína ligando de folato

Esta proteína se aísla del suero láctico, que es un producto de la leche que se puede obtener en fábricas de productos lácteos. En nuestro caso, lo hemos obtenido por gentileza de RENY PICOT, España.

- Se suspende el contenido de un saco de suero láctico en polvo (25kg) en 40L de agua y se ajusta la suspensión a pH a 7 con NaOH 5M (1L).
- La suspensión, una vez neutralizada, se deja durante una noche a 4°C.
- Se centrifuga la suspensión a 15.000 g durante 10 min a 4°C y se filtra el sobrenadante sobre lana de vidrio. En la realización de este paso no es necesario que se centrifugue la totalidad de la suspensión de suero láctico, ya que, sólo dos terceras partes de la suspensión son líquidas, la última es muy pastosa y no se obtiene apenas sobrenadante. De cada saco de suero se extraen entre 20 y 22 litros de sobrenadante filtrado. Se separa una alícuota del filtrado para medir la actividad de la proteína ligando de folato.

- El gel folato-Sefarosa preparado como se describe en la sección anterior, es añadido al filtrado obtenido y se deja agitando durante una noche a 4°C, tiempo durante el cual la proteína ligando de folato del suero láctico se une al gel folato-Sefarosa.
- El gel de folato-Sefarosa, con la proteína ligando de folato unida, se separa del extracto de suero por filtración a vacío, usando un embudo con capa porosa de 2L. Se separa una alícuota del filtrado para medir la actividad de la proteína. La matriz folato-Sefarosa debe ligar al menos el 70% de la actividad de la proteína proveniente del extracto de suero. La proteína ligando de folato unida al gel se puede almacenar a 4°C en azida sódica al 0,03% durante varios meses.
- Antes de extraer la proteína ligando de la matriz, se lava la misma secuencialmente con 2L de NaCl 1M en HEPES 0,05M y azida sódica 0,03%, posteriormente con 1L de tampón de fosfato potásico 1M (pH7) y por último 2L de agua.
- Se suspende la matriz folato-Sefarosa en un litro de ácido acético 0,1M y se agita durante 2h a 4°C.
- Se transfiere la matriz a un embudo con capa porosa y se eluye la proteína ligando por filtración a vacío. Para extraer la proteína totalmente, se vuelve a suspender el gel en ácido acético 0,1M y se repite el subsiguiente proceso. Esto se realiza al menos tres veces, obteniéndose varios filtrados. Se mide la actividad de la proteína de ligando folato en una alícuota de los filtrados.
- Los filtrados se neutralizan con carbonato potásico y se almacenan.
- Finalmente, la proteína se concentra usando una columna de matriz folato-Sefarosa de 3 x 15 cm, es decir, se vierten en la columna los filtrados neutralizados y se eluye la proteína con ácido acético 0,2M, recogiendo el eluido en fracciones de 20ml. Las fracciones que contienen la proteína ligando se distinguen perfectamente por su color amarillo característico.
- Se mide la actividad de la proteína ligando de folato en alícuotas de las diferentes fracciones. Se liofilizan aquellas que tienen mayor actividad y se almacenan a -70°C.

Para una mejor optimización del proceso, se mide actividad de la proteína ligando de folato en diferentes puntos de la realización del mismo. De este modo, es más fácil controlar la purificación y si en algún momento la actividad medida es más

baja de lo esperado, rectificar el proceso. También, hay que tener en cuenta que no todos los sueros tienen la misma cantidad de proteína ligando de folato.

1.3 Determinación de la actividad de la proteína ligando de folatos

La actividad de la proteína es medida en cada uno de los pasos de la purificación de la proteína ligando de folatos procedente del suero.

- En un tubo de ensayo de 12 x 100mm se mezclan los siguientes componentes: 0,1ml de tampón fosfato potásico 0,1M (pH 7.4), 0,05 ml de ácido fólico [^3H] $1\mu\text{M}$ (26,7 Ci/mmol, conteniendo $0,5\mu\text{Ci/ml}$), 0,1ml de albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v), 0,2 ml de la solución de proteína ligando de folato y agua suficiente para completar a un volumen final de 1ml.
- Se deja 15 min a temperatura ambiente, se adiciona 0,25ml de suspensión de dextrano T20 lavado con carbono activado y se agita durante 30 sec.
- La mezcla se centrifuga a 2.000g durante 10 min y se separan 0,5ml del sobrenadante para analizarlo en el contador de centelleo.
- Se repite el proceso pero sin adicionar la proteína ligando para obtener un blanco.
- Para calcular la actividad de la proteína ligando de folato se aplica la siguiente fórmula:

$$AP = 2,5 (M - B) / V(AS)$$

AP= actividad de la proteína ligando de folato/ml de proteína.

M= dpm de la muestra.

B= dpm del blanco.

V= volumen en ml de proteína ligando de folato añadido a la mezcla.

AS= actividad específica de ácido fólico [^3H] en dpm/ pmol.

Una unidad de AP es la cantidad de proteína capaz de unir 1pmol de ácido fólico.

1.4 Preparación de la matriz Sefarosa-proteína ligando de folato

La capacidad final de unión de la matriz debe ser al menos de 25-50 kilounidades (kU) (30-60nmol) por mililitro de volumen de gel. El suero láctico contiene unas 250U/g, de los cuales el 50% se recupera en la fracción purificada. Por lo tanto, un saco de 25kg de suero suele proporcionar unas 3000kU de proteína ligando purificada.

- Preparación de la proteína ligando de folato. Se suspende la proteína liofilizada en 250ml de NaHCO_3 0,1M.

- Se activa 1ml de Sefarosa 4B por 50-70 kU de proteína, usando las mismas condiciones de activación con bromuro de cianógeno descritas en el apartado "Preparación del gel Sefarosa-Folato".
- Se suspende la Sefarosa activada en 50ml NaHCO_3 0,1M y se mezcla con la solución de proteína ligando de folato. Se agita durante 2h a temperatura ambiente y después 48h a 4°C.
- Se transfiere la matriz de Sefarosa a un embudo con capa porosa y se lava secuencialmente con 2L de NaCl 2M en Tris HCl 0,05M (pH 7,4), 1L de agua, 2L de ácido trifluoroacético 0,02M, 2L de tampón fosfato potásico (pH 7,4) y finalmente 1L de agua.
- Se suspende la Sefarosa en un volumen equivalente de azida sódica 0,3% y se almacena a 4°C.

2. Extracción de Folatos en Alimentos

Antes de proceder a la extracción, los alimentos tienen que ser fraccionados, es decir, se trituran o pulverizan, y los alimentos líquidos se liofilizan.

- Se suspende el alimento en una solución que contiene ascorbato sódico al 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 10mM y tampón Bis-Tris 100mM (pH 7.8) en una proporción de 10ml de solución por 1g de alimento.
- Se hierve esta suspensión durante 15-25 min.
- Se enfría rápidamente el extracto en un baño de hielo y se homogeniza en una homogeneizadora mecánica.
- Finalmente se centrifuga el extracto a 30.000g durante 15 min a 4°C. El folato se mide en la fracción sobrenadante, que se separa y se almacena en tubos a vacío a -20°C.

3. Cromatografía de los Folatos Extraídos

3.1 Preparación de la columna de afinidad

Todo el trabajo, tanto la preparación como el uso de las columnas se ha de realizar a una temperatura estable de 4°C.

- Como soporte de la columna se utiliza una pipeta Pasteur de vidrio con un poco de lana de vidrio en el cuello, para impedir que se pierda la matriz.
- Las columnas de afinidad se preparan transfiriendo 1 ml de Sefarosa-proteína ligando de folato a una columna y permitiendo que la matriz se empaque por gravedad.

- Antes de usarla por primera vez, se lava la columna secuencialmente con 3ml de ácido trifluoroacético 20mM, 10 ml de tampón fosfato potásico 1M (pH 7) y 3ml de agua dos veces.

La matriz no es estable a pH ácido, por lo tanto inmediatamente después de aplicar ácido trifluoroacético, se tiene que lavar la columna con tampón fosfato potásico.

3.2 Purificación de los Folatos por Cromatografía de Afinidad

- Se descongela una fracción de extracto que contenga entre 2 y 15 nmol de folato total. Se mezcla el extracto con 0,2 μ Ci de ácido fólico [3 H] trazador y se mide la radiactividad en una alícuota de la mezcla.
- El resto de la mezcla es aplicado a la columna de afinidad.
- Se lava la columna con 10ml de tampón fosfato potásico 1M (pH 7), y dos veces con 3ml de agua.
- El folato adsorbido a la matriz es eluido con 3ml de ácido trifluoroacético 20mM, que a su vez contiene ditioeritritol 10mM.
- El ácido eluido se neutraliza rápidamente con 60 μ l de piperacina 1M.
- También se tiene que medir la radiactividad de una alícuota de eluido para así obtener la recuperación de la columna. La recuperación tiene que ser mayor de un 85%. Si es menor de este porcentaje, o se ha aplicado mucho extracto a la columna o la columna necesita reemplazarse.
- La columna de afinidad se regenera aplicando 10ml de tampón fosfato potásico 1M (pH 7) y dos veces 3ml de agua. La columna se almacena a 4°C.

Una vez eluido, el folato es inestable y debe ser inmediatamente analizado por HPLC o, en su defecto, se congela para almacenarlo.

3.3 Análisis de la distribución de folatos por HPLC

Para determinar la distribución de los folatos se recurre a la técnica de HPLC con un detector Diodo Array. Se monitoriza la absorción a las siguientes longitudes de onda: 280, 350, y 258nm. Como columna analítica se utiliza una Bio-Sil ODS-5S (150 x 4mm, Bio Rad), con precolumna y como fase móvil, se produce un gradiente de dos soluciones:

La **solución A** contiene tetrabutilamonio fosfato 5mM, ditioeritritol 0,5mM, y NaCl 25mM en agua.

La **solución B** contiene lo mismo que la solución A, pero en una mezcla acetonitrilo:agua 65:35. Antes de usar las soluciones, se filtran y degasifican.

El flujo en el que corre la muestra es de 1ml/min.

Antes de inyectar la muestra, se equilibra la columna en el 90% de la solución A y 10% de la solución B. Tras la inyección, la fase móvil fluye isocráticamente durante 5 minutos con 90% de A y 10% de B. Llegado este momento el porcentaje de la solución B incrementa linealmente hasta alcanzar el 36% a los 15 minutos, el 50% a los 35 minutos y el 60% a los 52 minutos.

3.4 Identificación y Cuantificación

La elución de los folatos a través de la columna de HPLC se produce secuencialmente en grupos (*clusters*) en función del número de restos glutámicos. Cada uno de estos clusters de folatos tiene el mismo número de restos glutámicos.

Para identificar los diferentes folatos de cada grupo se usa una combinación de tiempos de retención y características espectrales. El límite inferior de detección de folatos de un detector Diodo Array se sitúa en los 25 pmol de folato por pico.

Para fijar los tiempos de retención de los diferentes clusters, se utilizó una mezcla de pteroilglutamatos con un número de restos glutámicos comprendidos entre uno y ocho, a una concentración de 5nmol/ml, observándose en el cromatograma una secuencia de picos a tiempos de retención crecientes, que cada uno difiere de su vecino en un resto glutámico (Figura 1. *Anexo de Resultados. Ver página 42 y siguientes*).

Dentro de cada *cluster*, para separar los diferentes derivados de folato, se recurrió a la utilización de diferentes estándares: así, se ha utilizado 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, 5,10-metiléntetrahidrofolato, tetrahidrofolato, dihidrofolato y pteroilmonoglutamato, todos a una concentración de 5nmol/ml. En general, los tiempos de retención de los diferentes derivados dentro de un mismo *cluster* son muy próximos, lo que hace prácticamente imposible su identificación únicamente por este parámetro. Por esta razón, es necesario realizar un análisis espectral de cada derivado (Figura 2).

Además, la absorción se monitoriza a tres longitudes de onda, que aportan información diferente para identificación de los picos. La absorción determinada a 280 nm sirve para determinar la presencia de folatos indiscriminadamente. La monitorización a 350 nm sirve para identificar derivados de dihidrofolato y de pteroilglutamatos, ya que son los únicos folatos que absorben a esta longitud de onda. Por último, los valores de absorción obtenidos a 258 nm sirven para identificar los derivados de 10- formiltetrahidrofolato. El resto de folatos tienen máximos de absorción alrededor de 280-300 nm.

Al mezclar los diferentes estándares se observó que tetrahidrofolato y dihidrofolato tienden a eluir en el mismo pico, presentando características espectrales diferentes a las de los derivados individualizados.

Selhub y col. (1989) muestran que en los *clusters* que contienen mono- y diglutamilo folatos, existe separación entre 10-formil-, tetrahydro- y dihydro- derivados. En *clusters* que contienen mayor número de restos glutámicos, estos tres folatos tienden a eluir en la misma fracción. Del mismo modo, en cada *cluster*, el pteroil- y su correspondiente 5-metiltetrahydro- eluyen en el mismo pico o en picos muy próximos separados de los otros tres folatos.

Los derivados de 5-formiltetrahydrofolato eluyen con sus correspondientes *clusters* en una posición ligeramente anterior a los picos de 5-metiltetrahydrofolato/ pteroilglutamato.

Los picos que eluyen inmediatamente después de cada *cluster* corresponden a p-aminobenzoilglutamatos. Estos picos tienen un máximo de absorción a 270nm e incrementan su concentración cuando no se mantienen unas condiciones anaerobias estrictas.

Para determinar la concentración de folatos de picos correspondientes a un único derivado, se utiliza el área integrada del pico y los coeficientes molares del pico que se reflejan en la siguiente tabla:

Coeficientes molares de los picos de ácido fólico y sus derivados expresado como área integrada del pico^a.

Compuesto	280 nm	350 nm	258 nm
Pteroilglutamato	875	210	472
Dihidrofolato	787 (0,899)	152 (0,173)	321 (0,367)
THF ^b	682 (0,779)	7 (0,008)	266 (0,304)
10-Formil-THF	323 (0,369)	0 (0)	513 (0,586)
5-Metil-THF	787 (0,899)	0 (0)	314 (0,314)
5-Formil-THF	812 (0,928)	0 (0)	323 (0,370)

^a Los datos han sido obtenidos a varias longitudes de ondas usando ácido fólico [³H] antes y después de su conversión a varias de sus formas reducidas. Las alícuotas contenían alrededor de 1, 3, y 10 nmol y fueron analizadas por HPLC en las mismas condiciones anteriormente descritas. Se recogieron fracciones de 0,5 ml de cada uno de los eluidos para determinar el contenido en folatos por conteo de radiactividad. El coeficiente molar del pico (unidad de área/nmol) se calculó a partir de la cantidad de folato eluido y su correspondiente área de pico determinado a la longitud de onda indicada. Cada valor de la tabla representa la media obtenida de tres alícuotas. En todos los casos, el error estándar fue menor del 5%. Los números entre paréntesis representan los coeficientes molares de pico de varios folatos a las longitudes de onda indicadas frente a los coeficientes molares de pico del pteroilglutamato a 280 nm.

^b THF, tetrahydrofolato.

La expresión usada sería la siguiente:

$$[C] = A_{280} / E_{280} \text{ siendo:}$$

- C; concentración del derivado de folato identificado.
- A_{280} ; área integrada del pico a 280 nm.
- E_{280} ; coeficiente molar del pico a 280 nm.

Al monitorizar la absorbancia a 280, 350, y 258 nm, se puede calcular la concentración individualizada de los derivados de folato en el caso de que eluyan en un único pico.

Cuando eluyen juntos tetrahydrofolato (T), dihydrofolato (D) y 10-formiltetrahydrofolato (F) se calcula la concentración con la siguiente expresión:

$$A_{280} = [F]E_{f280} + [T]E_{t280} + [D]E_{d280}$$

$$[D] = A_{350} / E_{d350}$$

$$[F] = A_{258} - ([D]E_{d258} + [T]E_{t258})$$

Donde A_{280} , A_{258} y A_{350} son los valores de la observancia en unidades integradas de área a las longitudes de onda indicadas en los subíndices. E_{t280} , E_{f280} , E_{d280} , E_{d350} , E_{d258} y E_{t258} son los coeficientes molares del pico en unidades de área integradas para el derivado de folato y la longitud de onda indicada en el subíndice.

Para resolver las concentraciones de tetrahydrofolato (T) y 10-formiltetrahydrofolato (F) eluidos en un mismo pico, se procede de la siguiente manera:

$$A_{280} = [T]E_{t280} + [F]E_{f280}$$

$$A_{258} = [T]E_{t258} + [F]E_{f258}$$

Por último, para calcular la concentración de pteroilglutamato (P) y 5-metil-tetrahydrofolato (M) eluidos en un único pico, se utiliza la siguiente expresión:

$$[P] = A_{350} / E_{p350}$$

$$[M] = [A_{280} - ([P]E_{p280})] / E_{m280}$$

1.5.2. CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN DE FOLATOS EN CERVEZA

En nuestro estudio, se han liofilizado distintos tipos de cerveza española para concentrar la muestra y facilitar su manipulación. Se realizó la extracción de los folatos de la cerveza según el protocolo y se prepararon varias columnas de afinidad, lo que nos ha permitido evaluar en las cervezas más comúnmente consumidas en nuestro país tanto el contenido total como la distribución de los folatos de acuerdo con el estado de óxido/reducción del anillo pteridínico y la elongación de la cadena de restos de ácido glutámico, por primera vez, y de acuerdo con la bibliografía actualmente existente.

En el ANEXO correspondiente se muestran, en primer lugar, los cromatogramas obtenidos para diferentes derivados del ácido fólico, y que se consideran como estándares con el objetivo de comparar nuestras muestras de cerveza:

La Figura 1 muestra el patrón obtenido para los diferentes pteroilglutamatos (PteGlu) entre uno (PteGlu1) y ocho (PteGlu8) residuos de ácido glutámico. Así mismo, se muestran los tiempos de retención obtenidos, y las áreas correspondientes. Como se puede observar, la separación de los diferentes glutamatos es muy nítida, lo que nos permite conocer la influencia de la elongación de la cadena de restos de ácido glutámico, factor crítico para la biodisponibilidad de la vitamina.

Además, la puesta a punto de nuestra nueva técnica permite también cuantificar los folatos de acuerdo con la estructura del anillo pteridínico, el segundo factor crítico para conocer la biodisponibilidad, de acuerdo con lo ya explicado en la parte introductoria de este Informe. Así, la Figura 2 muestra los diferentes espectros cromatográficos obtenidos para los derivados del ácido fólico:

- 5,10-metilén tetrahidrofolato (510mthf)
- 5-formiltetrahidrofolato (5forthf)
- 5-metiltetrahidrofolato (5methf)
- dihidrofolato (dhf)
- pteroilmonoglutámico (pte1glu)
- tetrahidrofolato (thf)

Las Figuras 3, 4, 5, 6 y 7 muestran los espectros individuales obtenidos para los diferentes estándares.

La Figura 8 muestra los cromatogramas obtenidos para las diferentes cervezas analizadas. El análisis mediante cromatografía de afinidad y HPLC muestra un patrón bastante parecido para las diferentes cervezas analizadas.

Como se puede observar, la mayoría de los picos correspondientes a los folatos se encuentran en tiempos de retención entre los minutos 16 y 20.

En la Figura 9, se pueden observar los cromatogramas obtenidos a las diferentes longitudes de onda (280, 258 y 350 nm) para la cerveza 1, con sus correspondientes áreas, y que hemos utilizado para cuantificar los folatos de acuerdo con las fórmulas explicadas en el apartado 3.4 *Identificación y Cuantificación*. Del mismo modo, las Figuras 10, 11, 12, y 13, recogen los cromatogramas y áreas correspondientes para el resto de cervezas analizadas.

El resumen de los resultados obtenidos, tanto en el contenido total como en la distribución de los folatos, se encuentra recogido en la Tabla 1 así, se dan los resultados expresados en valores absolutos para los derivados del ácido fólico identificados, así como en forma de porcentaje respecto al total de folatos: la mayor cantidad corresponde al 10-formil tetrahydrofolato (40%), seguido de los tetrahydrofolatos (31.7%) y, ya en mucha menor porcentaje respecto del total, hemos cuantificado 5-metiltetrahydrofolatos (16.7%) y pteroilmonoglutamatos (10.8%). Estas medias, sin embargo, representan diferencias en la distribución de folatos entre cervezas analizadas que pudieran explicarse a las materias primas de origen empleadas para la fabricación.

En cuanto al contenido total, la media obtenida para las cervezas analizadas es de unos 3 microgramos por 100 ml. de cerveza. Lógicamente, la extrapolación en cuanto al aporte va a depender del consumo, pero si consideramos un consumo moderado de unos 30 gramos de etanol/día vía cerveza, representaría un aporte de aproximadamente el 10% de las necesidades para la población adulta, siempre que lógicamente no haya patologías presentes. Nuestros resultados no son comparables a los escasos obtenidos en la bibliografía, ya que la metodología empleada en estos casos era mucho más imprecisa, y de menor fiabilidad. En cualquier caso, la bibliografía muestra valores que oscilan entre 1-1.3 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Maury LA, 1984), y los 10-13 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (Trémolieres, 1975). Por otro lado, los valores encontrados para diferentes cervezas inglesas, de acuerdo con las Tablas de Composición de Alimentos de la Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reino Unido, son los siguientes:

Bitter: 4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$
Brown ale: 4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$
Lager: 4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$
Strong ale (6.6 g alcohol/100ml): 9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$

En una primera aproximación, se planteó un ensayo piloto, utilizando como modelo experimental la rata Wistar. El fin de este estudio fue evaluar la aceptación de las bebidas alcohólicas por parte de los animales y si ello podría afectar a la ingesta sólida. En caso de que esto último se produjera, se podría inducir una deficiencia dietaria en los animales que afectaría a los resultados.

Ensayo Piloto

OBJETIVO

Desarrollar en un modelo experimental animal, un ensayo de aceptación de diferentes bebidas alcohólicas. En este ensayo se estudia en animales de ambos sexos la ingesta líquida, la ingesta sólida y el peso de los animales, pudiendo comparar de este modo si existen diferencias de comportamiento entre grupos de animales que consumen distintas bebidas alcohólicas y entre sexos. Así, se determina si es necesario corregir la ingesta sólida en próximos ensayos.

METODOLOGÍA

Animales y Tratamientos

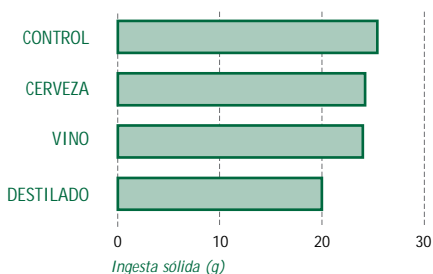
Cuarenta ratas Wistar, con un peso inicial entre 190-220g, se repartieron en ocho grupos experimentales según sexo y bebida alcohólica ingerida. Se diseñaron los siguientes grupos:

- **MACHOS CONTROL:** 5 ratas macho a las que se les administró agua como ingesta líquida.
- **MACHOS CERVEZA:** 5 ratas macho a las que se les administró un 30% de cerveza en su agua de bebida.
- **MACHOS VINO:** 5 ratas macho a las que se les dio un 30% de vino blanco en su agua de bebida.
- **MACHOS DESTILADO:** 5 ratas macho a las que se les suministró un 30% de destilado (whisky) en su agua de bebida.

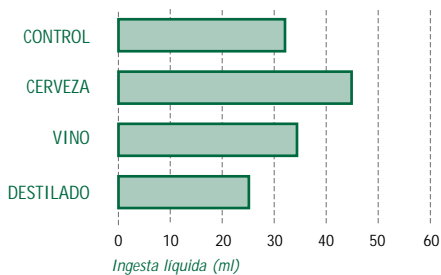
Además, se planificaron otros cuatro grupos de ratas hembras que se distribuyeron de manera equivalente:

- **HEMBRAS CONTROL**
- **HEMBRAS CERVEZA**
- **HEMBRAS VINO**
- **HEMBRAS DESTILADO**

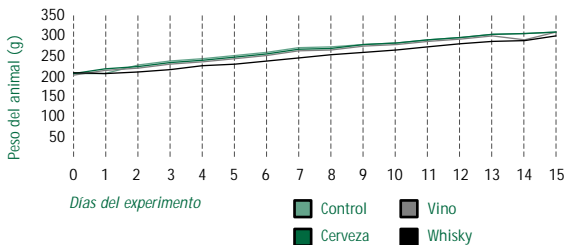
Ingesta Sólida - Ratas Macho



Ingesta Líquida - Ratas Macho



Evolución de Pesos - Ratas Macho



Los animales fueron mantenidos en una habitación con ciclos de luz/oscuridad de 12h, con 20-23°C de temperatura y con una apropiada ventilación. Se les permitió libre acceso a la comida (dieta estándar en pellet) y a la bebida.

Diseño experimental

El ensayo duró 15 días, durante los cuales se pesaron los animales todos los días a la misma hora observando así su evolución de peso. También se realizó diariamente la medida de la ingesta sólida y líquida.

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Tukey. El nivel de significación se establece en $P < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados globales de este ensayo piloto fueron bastante satisfactorios, cumpliéndose los objetivos que se pretendían. La evolución de peso de los animales de los distintos grupos es equivalente: todos los animales tuvieron un incremento de peso constante y similar, no observándose alteraciones en el crecimiento ni existiendo diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, la administración de bebidas con distinto grado alcohólico no altera el desarrollo del animal de una manera significativa.

La ingesta sólida en los animales de los grupos alcohólicos no resultó significativamente diferente del grupo control tanto en machos como en hembras. De ello, se deduce que la ingesta de alcohol en nuestras condiciones experimentales no altera el comportamiento del animal respecto a la ingesta sólida. También se observó que la ingesta de las hembras fue, en general, ligeramente inferior con respecto a la de los machos, y que su evolución diaria fue menos homogénea que en los machos.

La mayor ingesta líquida correspondió al grupo de la cerveza tanto en machos como en hembras, con respecto al resto de grupos. Otro hecho reseñable fue la menor ingesta líquida del grupo destilado respecto al control, aunque no existen diferencias significativas entre grupos. Por lo tanto se podría decir, que las ratas tienen una buena aceptación de la cerveza con respecto al resto de las bebidas alcohólicas incluso mayor que la del agua que es su habitual ingesta líquida.

De este ensayo, se obtuvieron las siguientes conclusiones claras para los posteriores ensayos:

- Los machos son más adecuados para este tipo de ensayo, debido a que su comportamiento es más homogéneo que el de las hembras.
- La cerveza es la bebida alcohólica con mayor aceptación entre las bebidas ensayadas.
- La ingesta sólida no se ve alterada significativamente, por tanto, no sería necesario una corrección de la ingesta sólida en futuros ensayos.

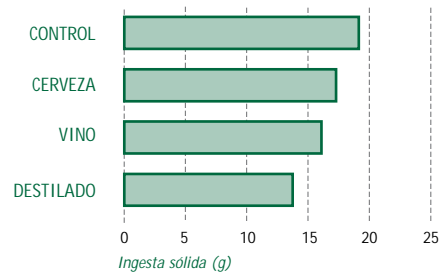
Teniendo en cuenta estas consideraciones, se planteó un nuevo ensayo en animales de experimentación.

Ensayo definitivo

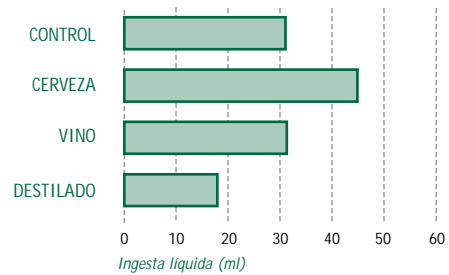
Se realizó un segundo ensayo con el objetivo de estudiar si la cerveza, por su contenido en ácido fólico, puede ejercer un efecto distinto al de otras bebidas alcohólicas en diferentes parámetros de ciclo de la metionina, en concreto, folato, vitamina B6, vitamina B12 y homocisteína y en un período de tiempo prolongado. A la vista de los resultados del ensayo anterior, se realizaron ciertas variaciones en el planteamiento del ensayo respecto al piloto.

- Se utilizaron únicamente ratas Wistar macho, debido a su mejor comportamiento frente al alcohol.

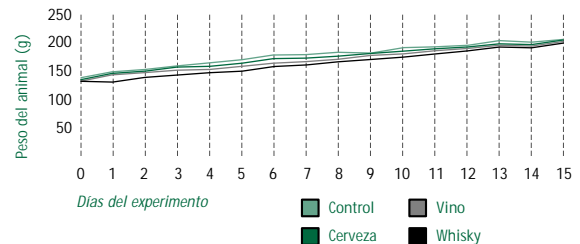
Ingesta Sólida - Ratras Hembra



Ingesta Líquida - Ratras Hembra



Evolución de Pesos - Ratras Hembra



- Esta vez, en lugar de comparar grupos de animales a los que se les da un 30% de bebida con distinta graduación alcohólica, se comparan grupos de animales a los que se les da la misma proporción de alcohol procedente de diferentes bebidas alcohólicas. De este modo, todas las bebidas se equiparan al contenido alcohólico de la cerveza, que es la bebida de menor graduación, y contiene un 5.5% (v/v) de alcohol.
- Se descarta el whisky como bebida alcohólica con la que comparar la cerveza, debido a que en el ensayo anterior se había observado un menor crecimiento, ingesta sólida y líquida, aunque en ningún caso estadísticamente significativo. Se sustituye por etanol al 5,5%.

OBJETIVO

Mediante el empleo de un modelo experimental animal se pretende estudiar si la cerveza, por su contenido en ácido fólico, puede ejercer un efecto distinto al de otras bebidas alcohólicas en diferentes biomarcadores relacionados con ciclo de la metionina, en un período de tiempo prolongado. De este modo, la cerveza es comparada frente al vino y etanol en condiciones isoalcohólicas y frente a un control.

METODOLOGÍA

Animales y Tratamientos

Cuarenta ratas Wistar machos (con un peso inicial de 185 - 195 g) se distribuyeron en 4 grupos:

- GRUPO CONTROL: 10 ratas a las que se les administra agua como ingesta líquida.
- GRUPO CERVEZA: 10 ratas a las que se les administra cerveza con un 5,5% de alcohol como ingesta líquida.
- GRUPO VINO: 10 ratas a las que se les da vino blanco diluido al 5,5% de contenido alcohólico en su agua de bebida.
- GRUPO ETANOL: 10 ratas a las que se les da un 5,5% de etanol en su agua de bebida.

En todos los grupos experimentales, salvo el control, el contenido alcohólico de la bebida es el mismo: 5,5% de etanol. Los animales son mantenidos *ad libitum* con una dieta estandar de laboratorio y en condiciones estandarizadas de temperatura, humedad y luz.

Diseño Experimental

El período experimental consta de 2 días de adaptación a las condiciones experimentales y 35 días de periodo experimental propiamente dicho. Durante el periodo experimental se controló la ingesta sólida, la ingesta líquida y el peso de los animales.

Al finalizar el período experimental, los animales se sacrificaron por decapitación. Se recogió la sangre, separándose por centrifugación el suero y el plasma para posteriormente conservarlos a -20°C hasta su análisis. A su vez, se extrajo el hígado, congelándolo rápidamente a -70°C para su conservación. En dichas muestras se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

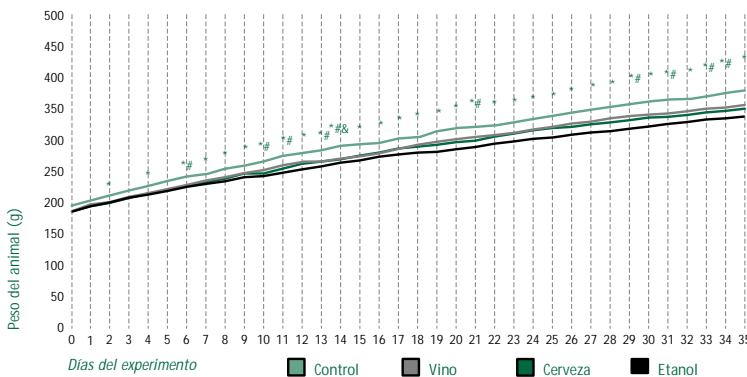
- Concentración plasmática de homocisteína y vitamina B₆ determinado por HPLC, usando un kit comercial de reactivos (Chromsystems, München).
- Concentración sérica de folato y vitamina B₁₂ determinado por quimioluminiscencia.

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Tukey. El nivel de significación se establece en $P < 0,05$.

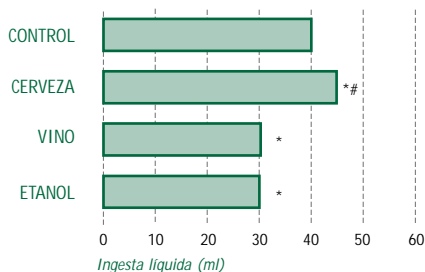
RESULTADOS

Evolución de Peso



Los valores son las medias \pm desviación estándar. * $P < 0,05$ etanol vs. control. # $P < 0,05$ cerveza vs. control. & $P < 0,05$ vino vs. control.

Ingesta Líquida



Los valores son la media ± desviación estandar
 * P<0,01 vs. control
 # P<0,01 vs. vino

En un periodo de tiempo prolongado, como es el caso de este experimento, el tratamiento con bebidas alcohólicas afecta el crecimiento de los animales. Todos los grupos estudiados tienen una menor ganancia de peso con respecto al control, siendo esta diferencia significativa en el caso del grupo etanol y en algunos momentos también para el grupo cerveza.

Como ya sucedió en el ensayo piloto, la mayor ingesta líquida correspondió al grupo de animales que consumía cerveza. Pero al ser este ensayo más largo en el tiempo, estas diferencias se hacen significativas. Ésto refuerza el hecho de que las ratas tienen una mayor afinidad por la cerveza que por otras bebidas alcohólicas, incluso que por el agua.

La ingesta sólida de los grupos tratados fue significativamente menor que el control, siendo el grupo que consumía vino el que mayor ingesta sólida presentaba con respecto al resto de grupos alcohólicos. Se podría decir que, en un ensayo prolongado, la ingesta de bebidas alcohólicas altera la ingesta sólida de los animales.

En cuanto a los parámetros bioquímicos estudiados se pueden aportar los siguientes datos:

	Folato Sérico (ng/ml)		Vitamina B ₁₂ (ng/ml)		Vitamina B ₆ (µg/L)		Homocisteína (µmol/L)	
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Control	35.4	2.9	939.0	16.7	327.5	25.0	11.5	0.8
Cerveza	29.4	3.9	826.2	39.2	316.4	17.6	11.5	0.6
Vino	27.9	2.8	894.6	20.9	300.1	20.0	12.7	0.8
Etanol	31.9	4.1	806.7	78.9	368.7	43.8	12.7	0.8

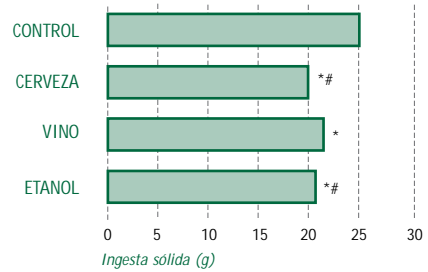
Los valores son la media ± error estándar de 10 animales.

En ninguno de los parámetros estudiados se han observado diferencias significativas entre grupos. De ello se puede deducir, que los tratamientos aplicados en las condiciones del ensayo no han sido suficientes para observar alteración alguna en la concentración de folato, vitamina B₆, vitamina B₁₂ u homocisteína.

De estos resultados, se puede concluir lo siguiente:

- Los tratamientos con bebidas alcohólicas en las condiciones del ensayo no son suficiente para producir alteración en la concentración del folato sérico, vitamina B₆, vitamina B₁₂ y homocisteína.
- La evolución de peso, la ingesta líquida y sólida se ven afectadas por el consumo de bebidas alcohólicas.
 - El consumo de etanol tiene un efecto drástico en la ingesta tanto líquida como sólida y en el aumento de peso, reduciendo significativamente las tres variables.
 - La cerveza tiene un efecto de reducción más moderado en el incremento de peso y en la ingesta sólida, mientras que la ingesta líquida es significativamente más alta que en el resto de los grupos.
 - La ingesta de vino produce el menor efecto, aunque también se reduce la ganancia de peso y la ingesta sólida y líquida.

Ingesta Sólida



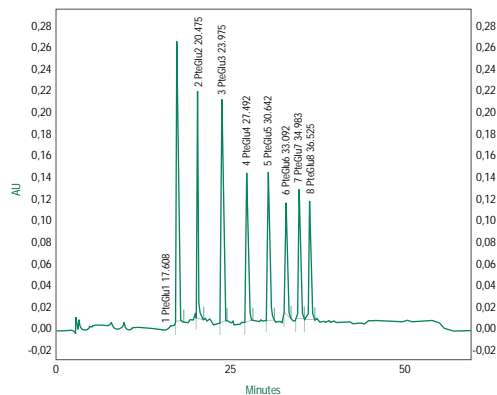
Los valores son la media ± desviación estandar

* P<0,01 vs. control

P<0,01 vs. vino y etanol

Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos alcohólicos se pueden deber a los otros componentes existentes en las distintas bebidas.

Figura 1



Pico	Tiempo	Area
1	17,61	2267380
2	20,48	2474150
3	23,98	3020691
4	27,49	2600696
5	30,64	2841789
6	33,09	2140490
7	34,98	2718918
8	36,53	2657332
Totales		20721446

Figura 2

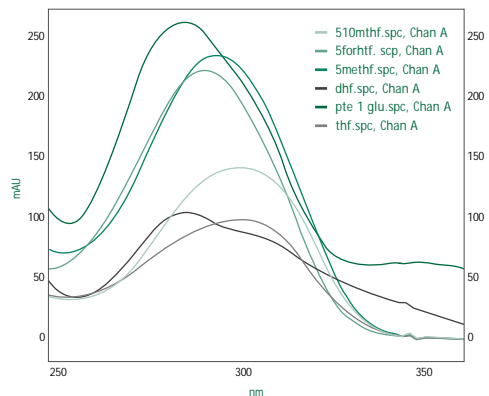


Figura 3

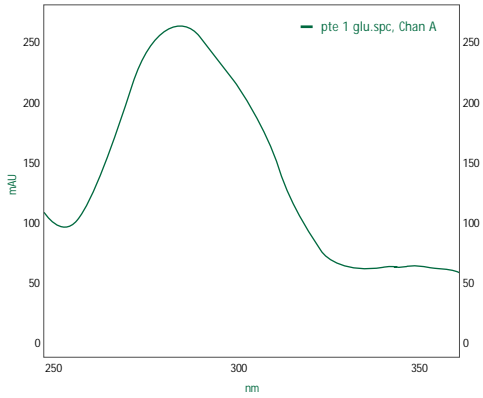


Figura 4

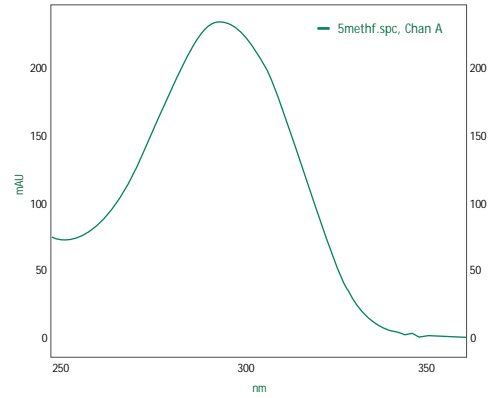


Figura 5

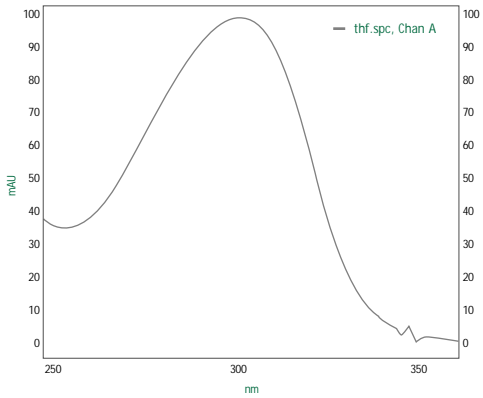


Figura 6

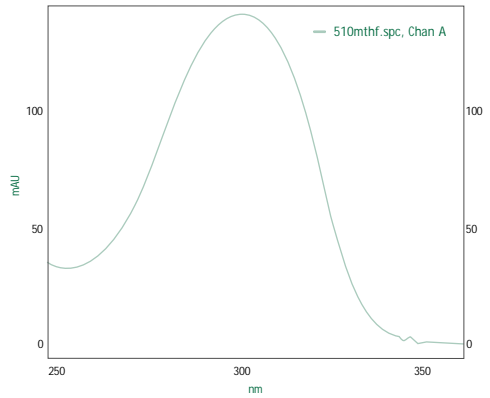


Figura 7

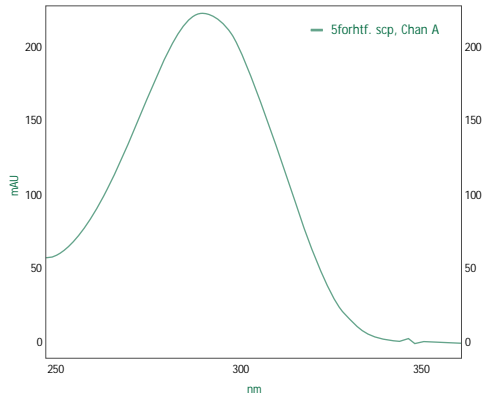


Figura 7b

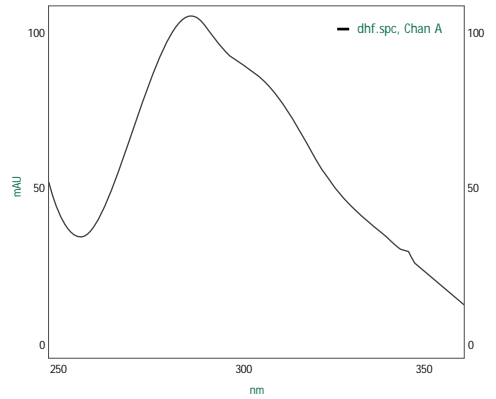


Figura 8

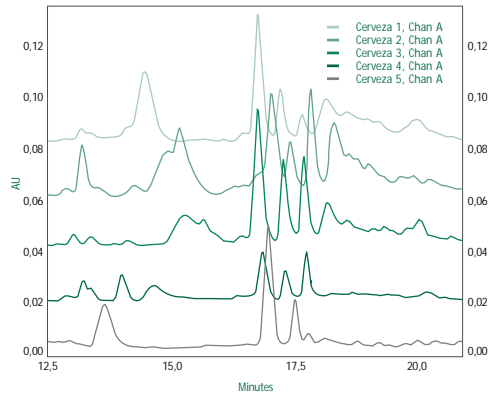


Figura 9a

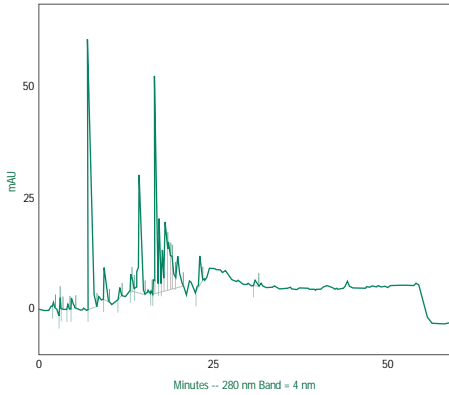
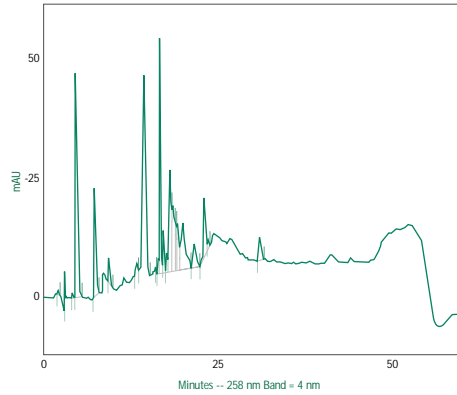


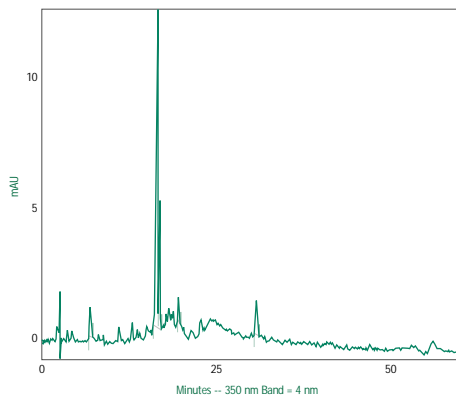
Figura 9b



Pico	Tiempo	Area
1	1,92	10981
2	2,85	22385
3	3,0	8552
4	3,95	11143
5	4,53	45838
6	7,21	1204789
7	9,25	118537
8	11,45	41149
9	13,16	43650
10	13,32	30110
11	14,45	669527
12	16,06	3573
13	16,46	344742
14	16,76	573883
15	17,22	213558
16	17,66	108946
17	18,15	377490
18	18,58	244824
19	18,98	94286
20	19,22	120775
21	20,02	212748
22	23,12	140671
23	31,17	20361
Totales		4352518

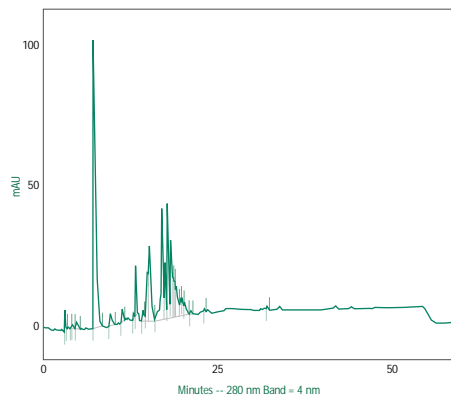
Pico	Tiempo	Area
1	1.92	12174
2	2.85	21562
3	3.95	12236
4	4.53	682489
5	7.21	416894
6	9.24	54076
7	13.36	55995
8	14.45	1047823
9	16.06	5257
10	16.47	35721
11	16.76	550671
12	17.22	86720
13	1767	47159
14	18.14	534028
15	18.57	337854
16	18.98	100263
17	19.22	184661
18	20.02	455989
19	21.62	171937
20	23.12	283116
21	23.68	29447
22	31.17	110317
Totales		5236389

Figura 9c



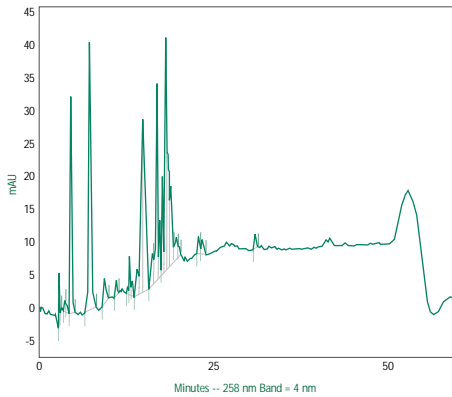
Pico	Tiempo	Area
1	2.85	4014
2	7.22	15988
3	16.76	136179
4	17.22	48464
5	20.00	13190
6	31.17	24244
Totales		242079

Figura 10a



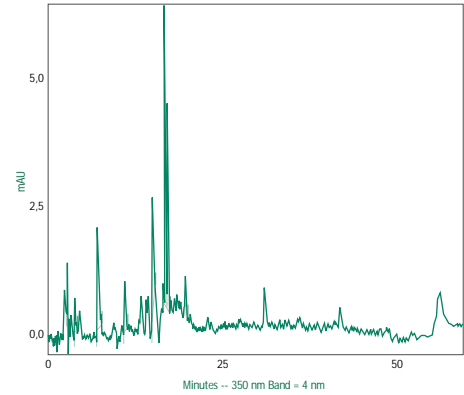
Pico	Tiempo	Area
1	2.86	28017
2	3.07	8414
3	3.72	4396
4	3.94	17465
5	4.55	37528
6	7.22	1950911
7	9.50	98688
8	11.21	66735
9	12.83	17625
10	13.18	174372
11	14.23	56410
12	14.93	341176
13	15.16	560505
14	17.03	772414
15	17.42	229751
16	17.84	420501
17	18.31	471788
18	18.62	146955
19	18.77	140887
20	19.01	245505
21	19.68	90209
22	19.92	95702
23	20.25	95708
24	21.17	14733
25	23.11	5880
26	32.20	9679
Totales		6101954

Figura 10b



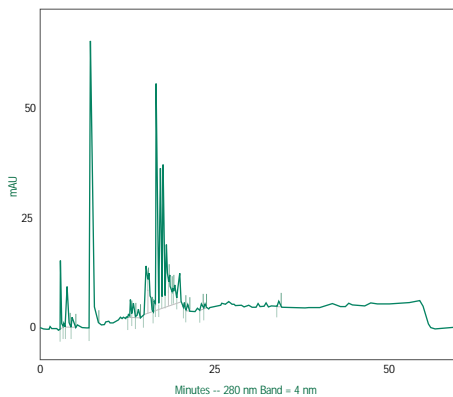
Pico	Tiempo	Area
1	2.86	30773
2	3.08	9661
3	3.72	10961
4	3.96	17478
5	4.55	470974
6	7.22	858156
7	9.50	95369
8	11.18	37686
9	12.85	7408
10	13.18	65195
11	13.48	31572
12	14.24	81880
13	14.91	605780
14	15.13	580395
15	16.45	116964
16	17.02	471687
17	17.42	95590
18	17.84	157262
19	18.31	610825
20	18.61	324468
21	19.01	246905
22	19.92	106837
23	20.24	26061
24	23.13	43080
25	23.57	45025
26	31.30	38549
Totales		5186541

Figura 10c



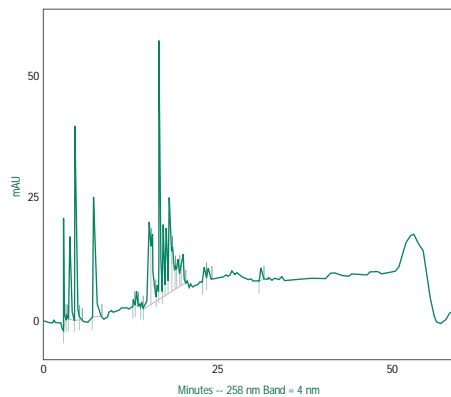
Pico	Tiempo	Area
1	2.85	2282
2	3.92	5544
3	7.22	32963
4	11.16	10390
5	15.16	30301
6	17.02	69902
7	17.42	36433
8	19.90	5975
Totales		193790

Figura 11a



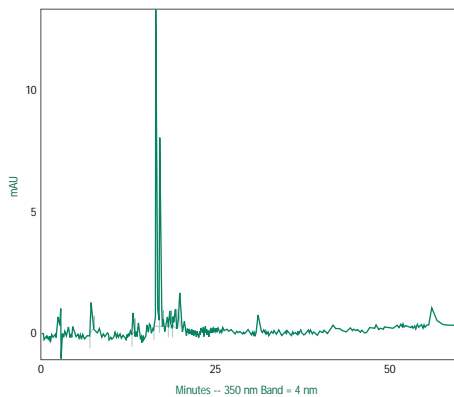
Pico	Tiempo	Area
1	2.85	50353
2	3.28	5565
3	3.75	112507
4	4.52	34196
5	7.22	1244947
6	12.99	49178
7	13.33	45667
8	14.10	32600
9	15.26	305280
10	15.64	145773
11	16.42	22284
12	16.75	622255
13	17.28	321798
14	17.69	321145
15	18.17	270210
16	18.58	148855
17	19.11	40580
18	19.33	74380
19	20.05	123261
20	20.71	9790
21	21.24	17587
22	23.20	19303
23	23.73	13308
24	34.38	20209
Totales		4051031

Figura 11b



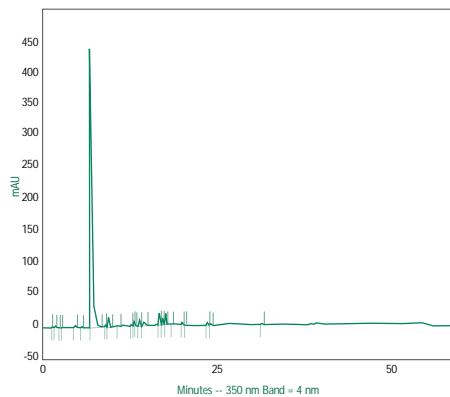
Pico	Tiempo	Area
1	2.85	72775
2	3.30	7352
3	3.75	204385
4	4.53	569265
5	5.22	7890
6	7.22	475108
7	12.98	12632
8	13.34	35208
9	14.08	8592
10	15.24	528993
11	15.64	218723
12	16.41	38744
13	16.75	624431
14	17.28	152582
15	17.70	149446
16	18.17	389653
17	18.58	182107
18	19.12	48134
19	19.33	99913
20	19.79	54182
21	20.05	119118
22	23.19	55503
23	23.72	47303
24	31.36	47080
Totales		4149119

Figura 11c



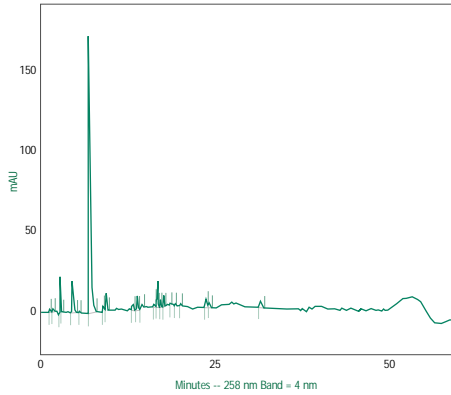
Pico	Tiempo	Area
1	7.23	16786
2	13.33	7693
3	16.75	158737
4	17.27	72629
5	18.58	5068
6	19.31	8714
7	20.07	11499
Totales		281126

Figura 12a



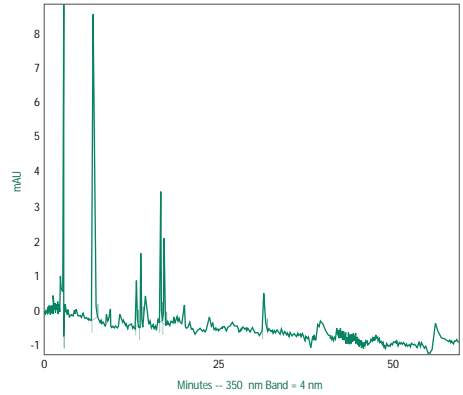
Pico	Tiempo	Area
1	1.34	5101
2	1.81	13994
3	2.37	2396
4	2.83	30086
5	4.71	46013
6	5.61	8983
7	7.05	7347937
8	9.05	13501
9	9.48	174822
10	10.97	19570
11	12.83	22826
12	13.18	70694
13	13.34	40943
14	13.97	103979
15	14.61	112486
16	16.83	187701
17	17.31	94608
18	17.74	144834
19	18.67	4904
20	20.21	27933
21	20.57	2796
22	23.82	42211
23	24.23	19886
24	31.67	12278
Totales		8550482

Figura 12b



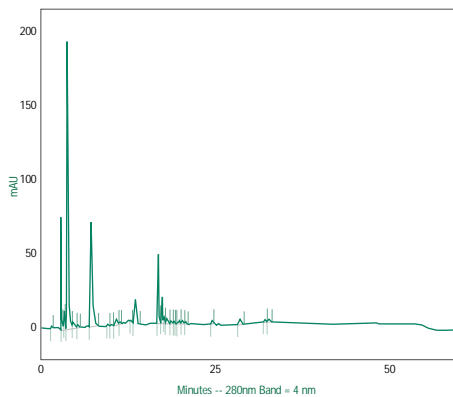
Pico	Tiempo	Area
1	1.34	13163
2	1.83	20966
3	2.83	41379
4	3.17	22321
5	4.53	284947
6	5.60	4585
7	7.05	2798454
8	9.04	29056
9	9.48	134403
10	13.35	48977
11	13.96	91046
12	14.61	40355
13	16.33	17402
14	16.83	168275
15	17.31	38101
16	17.74	54715
17	18.67	3857
18	19.40	2250
19	20.17	15560
20	23.83	81005
21	24.25	42715
22	31.67	69984
Totales		4023516

Figura 12c



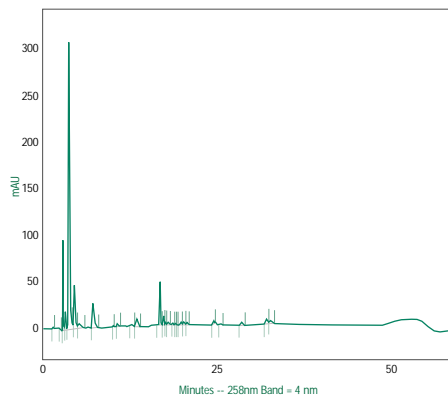
Pico	Tiempo	Area
1	2.83	9889
2	7.06	138768
3	13.34	10329
4	13.98	21023
5	16.83	35687
6	17.30	19701
7	31.64	14336
Totales		249733

Figura 13a



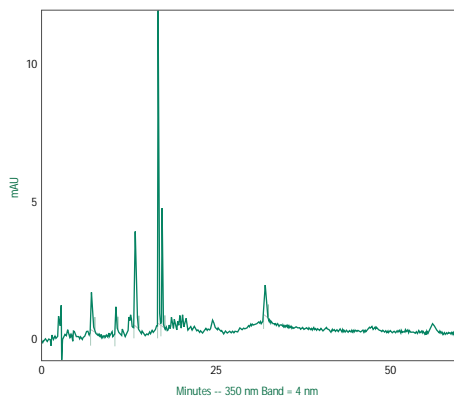
Pico	Tiempo	Area
1	1.46	10037
2	2.88	267374
3	3.28	120374
4	3.78	2098999
5	4.54	94959
6	5.28	29954
7	7.23	1290334
8	9.63	9830
9	10.24	6600
10	10.84	64130
11	11.41	11444
12	12.89	9765
13	13.62	322452
14	16.96	501196
15	17.50	161201
16	17.77	46601
17	18.12	64178
18	18.77	23627
19	19.22	12802
20	19.39	4053
21	19.99	42465
22	20.36	42872
23	20.86	24411
24	24.69	18894
25	28.71	63739
26	32.32	24204
27	32.92	34192
Totales		5400687

Figura 13b



Pico	Tiempo	Area
1	1.46	10392
2	2.43	4563
3	2.88	347748
4	3.28	186913
5	3.78	3315225
6	4.54	663072
7	5.28	147573
8	7.23	486830
9	10.26	5733
10	10.79	34579
11	12.88	23494
12	13.57	160194
13	16.96	499359
14	17.50	65304
15	17.77	16009
16	18.12	29835
17	18.77	10052
18	19.22	9974
19	19.38	3259
20	19.99	47847
21	20.35	40512
22	20.87	23343
23	24.69	41999
24	25.60	14997
25	28.71	54192
26	32.34	102843
27	32.89	79715
Totales		6425556

Figura 13c



Pico	Tiempo	Area
1	7.25	21545
2	10.77	8566
3	13.52	65533
4	16.96	123265
5	17.50	37749
6	32.36	20469
Totales		277127

Contenido Total y Distribución de Folatos en Cervezas de Consumo Frecuente en España

	Tetrahydrofolato		10-formiltetrahydrofolato		Pteroilglutamato		5-metiltetrahydrofolato		Folato total
	ng/100ml*	%del total	ng/100ml*	%del total	ng/100ml*	%del total	ng/100ml*	%del total	µgr
Cerveza 1	487.25	22,54%	1152.39	53.31	305.00	14.11%	217.11	10.04%	2.16
Cerveza 2	1566.47	52.91%	458.79	15.50%	283.30	9.57%	652.01	22.02%	2.96
Cerveza 3	1567.88	41.70%	1196.51	31.82%	438.14	11.65%	6557.21	14.82%	3.76
Cerveza 4	881.75	24.95%	1041.13	29.46%	561.08	15.88%	1049.90	29.71%	3.53
Cerveza 5	354.10	16.77%	1512.53	71.65%	65.27	3.09%	178.08	8.44%	2.11

* La recuperación media obtenida tras paso por columna de cromatografía de afinidad fue del 92%.

CONCLUSIONES

4

- La cerveza no se puede considerar como una bebida alcohólica "más", ya que presenta características específicas en su composición y funcionalidad que la diferencian del resto de bebidas alcohólicas.
- Tradicionalmente, entre los componentes nutritivos presentes en la cerveza se había considerado la presencia de algunas vitaminas, entre ellas el ácido fólico. Sin embargo, las dificultades para disponer de un método fiable y preciso para su determinación, hacía que finalmente no se le diera importancia al aporte de esta vitamina vehiculizada a través de la cerveza.
- El ácido fólico, además de su bien conocida función en la prevención de la anemia, es un ejemplo de "nuevas funciones" de las vitaminas, más allá de su papel en la prevención de las enfermedades carenciales o deficitarias.
- Las nuevas funciones del ácido fólico, para las que existe acuerdo entre la comunidad científica, son la prevención de los defectos del tubo neural en el nacimiento, así como en la disminución de un nuevo factor de riesgo cardiovascular, la homocisteína.
- El renovado interés por la vitamina hace que sea imprescindible conocer las fuentes del ácido fólico en la dieta, no sólo en cuanto al contenido total en los alimentos o bebidas, sino también en la distribución de los derivados del ácido fólico, en definitiva, aquellos vitámeros que tengan mayor o menor biodisponibilidad o rendimiento final en nuestro organismo.
- La aplicación de un método combinado que emplea cromatografía de afinidad seguida de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha permitido, por primera vez, de acuerdo con la bibliografía existente, la determinación del contenido total de folatos y la distribución de los mismos según la estructura del anillo pteridínico y la elongación de la cadena de restos de ácido glutámico. Las determinaciones se han llevado a cabo en las cervezas más consumidas en España.
- Los resultados obtenidos muestran que el contenido medio de ácido fólico es de 3 microgramos por 100 ml. de cerveza. Si se considera que en personas adultas sanas, sin patologías, el consumo de 600-700 ml. de cerveza/día está den-

tro de los límites de consumo moderado y responsable, esta cantidad supondría un aporte de aproximadamente el 10-12% de las necesidades diarias de la vitamina.

- Por primera vez, se han obtenido datos sobre la distribución de los derivados del ácido fólico: la mayor cantidad presente es la correspondiente al 10-formil tetrahidrofolato (40%), seguido de los tetrahidrofolatos (31.7%), y en un porcentaje mucho menor se encuentran los 5-metiltetrahidrofolatos (16.7%), y pteroilmonoglutamatos (10.8%). Este patrón de distribución nos permite considerar como satisfactoria la biodisponibilidad potencial de la vitamina contenida en la cerveza.
- Ante la posibilidad de que el etanol presente en la cerveza pudiera interferir con el metabolismo del ácido fólico, se ha empleado un modelo experimental animal que permite conocer si se comporta igual la cerveza frente a otras bebidas alcohólicas en diferentes marcadores claves de la vitamina.
- La cerveza, en cantidades isoalcohólicas, fue la bebida más aceptada, al ser la ingesta líquida significativamente superior frente a otras bebidas alcohólicas incluso cuando se comparó con el agua que es su habitual ingesta líquida.
- Los tratamientos aplicados en las condiciones del ensayo en animales no dieron lugar a alteraciones significativas en la concentración de folato, vitamina B₆, vitamina B₁₂ u homocisteína.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- 1 Varela-Moreiras, G ; Seyoum, E ; Selhub, J. (1991). Combined affinity and ion pair liquid chromatographies for the analysis of folate distribution in tissues. *J Nutr Biochem* 2 :44-53.
- 2 Angier, RB ; Boothe, JH ; Hutchings, BL ; Mowat, JH ; Semb, J ; Stokstad, ELR ; Subba Row, y ; Waller, CW ; Cosulich, DB ; Fahrenbach, MJ ; Hultquist, ME ; Kuh, E ; Northey, EH ; Seeger, DR ; Sickles, JP ; Smith, JM. (1945). Synthesis of a compound identical with the L. casei factor isolated from liver. *Science* 102 :227-8.
- 3 Mitchell, HK ; Snell, EE ; Williams, RJ. (1941). The concentration of "folic acid". *Am Chem Soc* 63 :2284.
- 4 Selhub, J; Rosenberg, IH. (1996). Folic acid. En: Present knowledge in nutrition. 7ª edición. Ziegler, EE; Filer, LJ, eds. ILSI Press, Washington, DC, EEUU. pp :206-19.
- 5 Blakey, RL. (1986). Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. Recommendations 1986. *Eur J Biochem* 168 :251-3.
- 6 Le Grusse, J ; Watier, B. (1993). Vitamine B9. Acide Folique. En : Les Vitamines. Données biochimiques, nutritionnelles et cliniques. Centre d'étude et d'information sur les vitamines. Neuilly-sur-Seine Cedex, Francia. pp :233-253.
- 7 Rosenberg, IH. (1976). Absorption and malabsorption of folates. *Clinics in Haematology* 5 :589-618.
- 8 Halsted, CH. (1979). The intestinal absorption of folates. *Am J Clin Nutr* 32 :846-55.
- 9 Combs, GF. (1992). Folate. En : The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. Hartcourt Brace Jovanovich, eds. Academic Press, INC, San Diego, EEUU. pp :357-375.
- 10 Shane, B. (1995). Folate chemistry and metabolism. En: Folate in health and disease. Bailey, LB, ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EEUU. pp :1-22.
- 11 Varela-Moreiras, G ; Selhub, J.(1992). Long term folate deficiency alters folate content and distribution differentially in rat tissues. *J Nutr* 122 :986-91.
- 12 Alpers, DH ; Clouse, RE ; Stenson, WF. (1990). Folacinas. En: Manual de Terapéutica Nutricional. Salvat editores, S.A. Barcelona, España. pp :25-31.
- 13 Alonso-Apperte, E ; Úbeda, N ; Martín, JC ; Pérez de Miguelsanz, J ; Mato, JM ; Varela-Moreiras, G. (1996). Effects of valproic acid, folinic acid and S-adenosylmethionine on the methylation cycle during gestation in rats. En: III Workshop on Methionine Metabolism. Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Mato, JM ; Caballero, A, eds. CSIC, España. pp :225-32.
- 14 Varela-Moreiras, G ; Ragel, C ; Pérez de Miguelsanz, J. (1995). Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats. *J Am Coll Nutr* 14(5) :480-5.

- 15 Alonso-Aperte, E ; Varela-Moreiras, G. (1996). Brain folates and DNA methylation in rats fed a choline deficient diet or treated with low doses of methotrexate. *Internat J Vit Nutr Res* 66 :232-6.
- 16 Varela-Moreiras, G ; Ragel, C ; Ruiz-Roso, B. (1993). Effects of prolonged aspirin or acetaminophen administration to rats on liver folate content and distribution. Relation to DNA methylation and S-adenosylmethionine. *Internat J Vit Nutr Res* 63 :41-6.
- 17 Alonso-Aperte, E ; Úbeda, N ; Achón, M ; Pérez de Miguelansanz, J ; Varela-Moreiras, G. (1998). Impaired methionine synthesis and DNA hypomethylation in rats exposed to valproate during gestation. *Neurology* (en revisión).
- 18 Kirke, PN, Molloy, AM; Daly, LE; Burke, H; Weir, DG; Scott, JM. (1993). Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 86: 703-8.
- 19 Daly, LE; Kirke, PN; Molloy, A; Scott, JM. (1995). Folate levels and neural tube defects: implications for prevention. *JAMA* 274 :1968-702.
- 20 Werler, MM; Shapiro, S; Mitchell, AA. (1993). Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 269 :1257-61.
- 21 Shaw, GM; Schaffer, D; Velie, EM; Morland, K; Harris, JA. (1995). Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 6 :219-26.
- 22 Czeizel, A; Toth, M; Rockenbauer, M. (1996). Population based case control study of folic acid supplementation during pregnancy. *Teratology* 53 :345-51.
- 23 MRC Vitamin Study Research Group. (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338 :131-7.
- 24 Czeizel, A; Dudás, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327 :1832-5.
- 25 Czeizel, A. (1995). Nutritional supplementation and prevention of congenital abnormalities. *Curr Opin Obstet Gynaecol* 7 :88-94.
- 26 Boushey, CJ ; Beresford, AA ; Omen, GS ; Motulsky, AG. (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intake. *JAMA* 274 :1049-57.
- 27 Green, R ; Jacobsen, DW. (1995). Clinical implications of hyperhomocysteinemia. En: *Folate in Health and Disease*. Bailey, LB, ed. Marcel Dekker, Inc, New York, EEUU. pp 75-122.
- 28 Ubbink, JB. (1994). Vitamin requirements for the treatment of hiperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 124 :1927-33.
- 29 Deulofeu, R ; Giralt, M ; Aibar, C ; Bauchet, C ; Varela-Moreiras, G ; Casals, F ; Chamorro, A ; Vila, N ; Díaz Cremades, J ; Ballesta, AM. (1996). Determinación de homocisteína en plasma

- por cromatografía líquida de alta resolución. Aplicación al estudio de enfermos afectados de enfermedad vascular cerebral y periférica. *Química Clínica* 15(2) :77-84.
- 30 Brattström, LE ; Israelsson, B ; Jeppsson, JO ; Hultberg, BL. (1988). Folic acid - an innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 48 :215-21.
 - 31 Ubbink, JB ; Vermaak, WJH ; Merve, van der A ; Becker, PJ. (1993). Vitamin B12, vitamin B6 and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 57 :47-53.
 - 32 Selhub, J ; Jacques, PF ; Wilson, PWF ; Rush, D ; Rosenberg, IH (1993). Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270 :2693-2727.
 - 33 Verhoef, P ; Stampfer, MJ ; Buring, JE ; Gaziano, JM ; Allen, RH ; Stabler, SP ; Reynolds, RD ; Kok, RJ ; Hennekkes, CH ; Willet, WC. (1996). Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12 and folate. *Am J Epidemiol* 143 :845-59.
 - 34 Giles, WH ; Kittner, SJ ; Anda, RF ; Croft, JB ; Casper, ML. (1995). Serum folate and risk for ischemic stroke. First national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *Stroke* 26 :1166-70.
 - 35 Morrison, HI ; Schaubel, D ; Desmeules, M ; Wigle, DT. (1996). Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA* 275 :1893-96.
 - 36 Mason, JB. (1995). Folate status: effects on carcinogenesis. En: *Folate in health and disease*. Bailey, LB, ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EEUU. pp :361-78.
 - 37 Moreiras, O ; Carbajal, A ; Cabrera, L. (1996). *Tablas de composición de alimentos*. 2ª edición. Ediciones Pirámide, Madrid, España.
 - 38 Food and Nutrition Board. (1989) *Recommended dietary allowances*. 10ª edición. National Academy of Sciences, Washington, DC, EEUU.
 - 39 de Bree, A ; van Dusseldorp, M ; Brouwer, IA ; van het Hof, KH ; Steegers-Theunissen, RPM. (1997). Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 51 :643-60.
 - 40 Centers for Disease Control. (1991). Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects-1983-91. *MMWR* 40 :513-6.
 - 41 Expert Advisory Group. (1992). *Folic acid and the prevention of neural tube defects*. London, Department of Health.
 - 42 Health Council / Food and Nutrition Council. (1993). *Follow up report of the relationship between folic acid intake and neural tube defects*. The Hague.
 - 43 Butterworth, CE ; Tamura, T. (1989). Folic acid safety and toxicity: a brief review. *Am J Clin Nutr* 50 :353-8.

- 44 Dickinson, CJ. (1995). Does folic acid harm people with vitamin B12 deficiency? *Q J Med* 88 :357-64.
- 45 Milunsky, A; Jick, H; Jick, SS; Bruell; CL; MacLaughlin, DS; Rothman, KJ; Willett, W. (1989). Multivitamin/Folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 262 :2847-52.
- 46 Department of Health and Human Services: Public Health Service. (1992). Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR* 41(RR-14) :1-7.
- 47 National Health and Medical Research Council. (1992). Statement on the relationship between dietary folic acid and neural tube defects such as spina bifida 113th Session Australia; National Health and Medical Research Council.
- 48 Health and Welfare Canada. (1993). Issues: folic acid, the vitamin that helps protect against neural tube (birth) defects. Ottawa: Health Protection Branch.
- 49 Food and Drugs Administration. (1993). Food labeling: Health claims and label statements; folate and neural tube defects. *Fed Regis* 58(197) :13254-95.
- 50 Food and Drugs Administration. (1994). Food labeling: Health claims and label statements; folate and neural tube defects. *Fed Regis* 59(2) :433-7.
- 51 Ubbink, JB ; Merve, van der A ; Vermaak, WJH ; Delpport, R. (1993). Hyperhomocysteinemia and the response to vitamin supplementation. *Clin Invest* 71 :993-8.
- 52 Den Heijer, M ; Brouwer, IA ; Blom, HJ ; Gerrits, WBJ ; Bos, GMJ. (1995). Lowering of homocysteine blood levels by means of vitamin supplementation. *Ir J Med Sci* 164(suppl 15) :7 (abstract).
- 53 Food and Nutrition Board. (1991) Folato. En : Raciones dietéticas recomendadas. 1ª edición española de la 10ª edición original de : Recommended dietary allowances. Ediciones Consulta, Barcelona, España. pp :145-152.
- 54 Colman, N ; Green, R ; Metz, J. (1975). Prevention of folate deficiency by food fortification. II. Absorption of folic acid from fortified staple foods. *Am J Clin Nutr* 28 :459-64.
- 55 Tamura, T ; Stockstad, ELR. (1973). The availability of food folate in man. *Br J Haematol* 25 :513-32.
- 56 Cravo ML, Glória LM, Selhub J, et al. (1996). Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitaminB12, and vitaminB6 status. *American Journal of Clinical Nutrition* 63 :220-224.
- 57 Stampfer M & Willett W (1993). Homocysteine and marginal vitamin deficiency. The importance of adequate vitamin intake. *JAMA* 270 :2727.

- 58 Boushey CJ, Beresford S, Omenn G & Motulsky A (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intake. *JAMA* 274 :1049-1057.
- 59 FDA (Food and Drug Administration) (1994). Notice. Food labelling: Health claims and label statements; Folate and neural tube defects. *Fed Regist* 59 :433-436.
- 60 Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush & Rosenberg IH (1993). Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteine in an elderly population. *JAMA* 270 :2693-2726.
- 61 McNulty H (1995). Folate requirements for health in different population groups. *Br J Biomed Sci* 52 :110-119.
- 62 Tamura T (1990) Microbiological assay of folates. In: *Folic Acid Metabolism in Health and Diseases*. Wiley-Liss, Inc. :121-137.
- 63 Shane B, Tamura T, Stokstad ELR (1980) Folate assay: A comparison of radioassay and microbiological methods. *Clin Chim Acta* 100 :13-19.

