

UNIVERSIDAD CEU SAN PABLO

FACULTAD DE FARMACIA

**Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la
Alimentación**



TESIS DOCTORAL

**VALORACIÓN DE LA FORTIFICACIÓN CON ÁCIDO FÓLICO EN ESPAÑA:
BASE DE DATOS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS FORTIFICADOS,
ANÁLISIS DE ÁCIDO FÓLICO Y FOLATOS Y ESTIMACIÓN DE SU
CONTRIBUCIÓN A LAS INGESTAS DE REFERENCIA.**

FOLIC ACID FOOD FORTIFICATION IN SPAIN: FOOD COMPOSITION DATABASE, FOLIC
ACID AND FOLATE ANALYSIS AND PREDICTED CONTRIBUTION TO DIETARY REFERENCE
INTAKES

Memoria que presenta

M^a DE LOURDES SAMANIEGO VAESKEN

Para optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad CEU San Pablo

Directores:

Dr. GREGORIO VARELA MOREIRAS

Dra. ELENA ALONSO APERTE

Madrid, 2012



CEU

*Universidad
San Pablo*

D. **Gregorio Varela Moreiras**, Catedrático de Nutrición y Bromatología del Departamento del CC Farmacéuticas y de la Alimentación y Dña. **Elena Alonso Aperte**, profesora Agregada del Departamento de CC Farmacéuticas y de la Alimentación de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU- San Pablo.

HACEN CONSTAR:

Que Dña. **M^a de Lourdes Samaniego Vaesken** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “VALORACIÓN DE LA FORTIFICACIÓN CON ÁCIDO FÓLICO EN ESPAÑA: BASE DE DATOS DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS FORTIFICADOS, ANÁLISIS DE ÁCIDO FÓLICO Y FOLATOS Y ESTIMACIÓN DE SU CONTRIBUCIÓN A LAS INGESTAS DE REFERENCIA”, con objeto de obtener el Grado de Doctor Internacional; y que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Madrid, a 20 de septiembre de 2012

D. Gregorio Varela Moreiras

Dña. Elena Alonso Aperte

***A mi familia
A Luis***

*“Nada es veneno, todo es veneno: la diferencia está en la dosis”
Paracelso*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a los Directores de este trabajo, los Doctores Gregorio Varela Moreiras y Elena Alonso Aperte, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme y dedicarme a la investigación en Nutrición y Tecnología de los alimentos, aportándome su valiosa experiencia en estos campos. Por el apoyo y ánimo brindado y cómo no, por el valioso tiempo dedicado a la dirección del este trabajo. Gracias a ambos por haber creído y confiado en mí a lo largo de estos años. Sois sin duda un ejemplo de perseverancia y profesionalidad.

A la universidad CEU San Pablo, por haberme concedido, además de una excelente formación durante los años de mi carrera, la Diplomatura en Nutrición Humana y Dietética, la primera beca para la iniciación en investigación.

A la Secretaría de Estado de Educación y Universidades por la confianza depositada, al concederme una beca FPU gracias a la que me fue posible continuar mi andadura en la investigación y la docencia, y sin la cual no hubiese sido posible la realización del presente trabajo.

Al Dr. Gaspar Ros Berrezuelo y a Paul Finglas quienes me recibieron en sus respectivos grupos de investigación y cuyos equipos, de gran calidad humana me enseñaron mucho. Especialmente a Darío, en Murcia, a Mr. y Mrs. Wright, a María, Jenny y Wendy. I will never forget the great Norwich experience: ¡A very big thank you!.

A mis compañeros de laboratorio y departamento: Ana, Ángela, María A., María S., Vanesa, Elizabeth, Esther, Violeta, Natalia, Purification, Rosalía y Teresa, por brindarme siempre su ayuda. En especial a la Dra. Póo-Prieto por su inestimable y constante apoyo en todo lo referente a metodología analítica. Cada una de vosotras me habéis enseñado muchísimo. Sin olvidar a Emma, Teresa y Susana, por su ayuda y apoyo en todo momento. Al personal de mantenimiento, servicios y administración de la Universidad, por su valiosa y constante ayuda en distintos aspectos relacionados con el desarrollo de este trabajo.

Por último, a las personas más importantes: mi familia y amigos. Muchísimas gracias por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos, por la paciencia y por ser un grandísimo apoyo durante todos estos años. Muy en especial a mis padres, darles las gracias es insuficiente dado el constante e incondicional cariño y el apoyo mostrado en todas mis decisiones. A Diego y Ale, mis hermanitos, gracias por aguantarme y ayudarme chicos. También a Jovita, cómo no, nuestra querida segunda madre. A los que están en la distancia, en Asunción y Berlín: siempre los tengo muy presentes: mis queridos tíos, mis primos... ¡les quiero y extraño!

ÍNDICE

	Página
Índice de Tablas y Figuras	i
Abreviaturas	xiii
I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	7
1. La fortificación de los alimentos	7
1.1. Perspectiva histórica	7
1.2. Definición y conceptos	8
1.3. Políticas y estrategias actuales de fortificación alimentaria	11
2. Fortificación de alimentos con ácido fólico	13
2.1. Intervenciones nutricionales para la mejora del estatus en folatos	13
2.2. Políticas y niveles de fortificación con ácido fólico a nivel mundial	16
2.3. El ácido fólico y los folatos	19
2.3.1. Descubrimiento, definición y estructura química	19
2.3.2. Absorción, metabolismo y biodisponibilidad	22
2.3.3. Fuentes de folatos y ácido fólico en los alimentos	25
2.3.4. Métodos de análisis de folatos	27
2.4. De las funciones clásicas del ácido fólico a la promoción de la salud	30
2.4.1. Funciones clásicas	30
2.4.2. Papel en la prevención de los defectos del tubo neural	31
2.4.3. Metabolismo de la homocisteína y enfermedad cardiovascular	32
2.4.4. Prevención potencial del desarrollo de neoplasias	33
2.4.5. Influencia en el mantenimiento de la función neurocognitiva	34
2.4.6. Recomendaciones dietéticas de folatos	35
2.5. Riesgos potenciales asociados a la ingesta excesiva	39
3. Datos de consumo alimentario	44
4. Las Bases de Datos de composición de alimentos	46
5. Marco legal aplicable a la fortificación con ácido fólico en Europa y España	49
5.1. Legislación vigente	
5.2. Tipología de las declaraciones del etiquetado de los alimentos	51
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Desarrollo, seguimiento y actualización de una Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico	55
1.1. Diseño, estructura y actualización de la Base de Datos	55
1.2. Inventario de productos fortificados con ácido fólico	56
1.3. Estudio del etiquetado nutricional y los tipos de alegaciones en el	60

etiquetado de los alimentos fortificados con ácido fólico	
2. Análisis de folatos en alimentos fortificados con ácido fólico. Comparación de métodos	61
2.1. Adquisición y procesado de muestras	61
2.2. Métodos de análisis de alimentos fortificados con ácido fólico	62
2.2.1. Introducción	62
2.2.2. Extracción trienzimática del ácido fólico y los folatos de la matriz de alimentos fortificados	63
2.2.3. Cromatografía de afinidad	67
2.2.4. Análisis del ácido fólico y el 5-metiltetrahydrofolato por HPLC en fase inversa	77
2.2.5. Ensayo microbiológico con <i>L. casei var. rhamnosus</i> cloranfenicol resistente (NCIB 10463)	80
2.2.6. Concordancia de los métodos analíticos para la cuantificación de folatos y ácido fólico	87
2.2.7. Comparación de los datos analíticos con los valores declarados por el fabricante en el etiquetado	88
2.2.8. Inclusión en la Base de Datos de los resultados analíticos	89
3. Estimación de la ingesta de ácido fólico a través de los alimentos fortificados: modelos de simulación incluyendo alimentos fortificados con ácido fólico	90
3.1. Modelos de simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico	90
3.1.1. Simulación de ingesta mediante el diseño de desayunos que incluyen alimentos fortificados con ácido fólico	90
3.1.2. Simulación de ingesta mediante la utilización de datos de consumo de alimentos en población española	91
3.2. Evaluación de la adecuación de la ingesta de ácido fólico a los valores de referencia de ingesta para distintos grupos de población	95
IV. RESULTADOS	
1. Desarrollo, seguimiento y actualización de una base de datos de alimentos fortificados con ácido fólico	97
1.1. Actualización del diseño y estructura de la Base de Datos	97
1.2. Inventario de alimentos fortificados con ácido fólico	98
1.3. Grupos de alimentos y nivel de fortificación con ácido fólico	99
1.3.1. Distribución de grupos de alimentos	99
1.3.2. Fortificación con ácido fólico y fortificación conjunta con B ₆ y B ₁₂	104
1.4. Estudio de los grupos de alimentos y los niveles de fortificación con ácido fólico de acuerdo a las marcas	106
1.5. Grupos de población diana para los alimentos fortificados con ácido fólico	110

1.6. Estudio del etiquetado nutricional y los tipos de alegaciones en el etiquetado de los alimentos fortificados con ácido fólico	113
1.7. Alimentos fortificados con ácido fólico que dejan de comercializarse o que sufren reformulación o eliminación de el contenido en ácido fólico	118
2. Análisis del contenido en ácido fólico y folatos en alimentos fortificados. Comparación de métodos	120
2.1. Precisión, exactitud y repetibilidad del método de cromatografía de afinidad con Proteína Ligando de Folato y cuantificación de ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato por HPLC	120
2.1.1. Límite de detección	128
2.1.2. Recuperación	128
2.2.3. Linealidad	129
2.2.4. Precisión intra- e inter -ensayo	130
2.2. Precisión, exactitud y repetibilidad del método microbiológico	131
2.2.1. Recuperación	131
2.2.2. Linealidad	131
2.2.3. Precisión intra- e inter -ensayo	132
2.3. Ácido fólico, 5-metiltetrahidrofolato y Folato total en distintos grupos de alimentos fortificados	134
2.3.1. Justificación de la elección de los grupos de alimentos	134
2.3.2. Grupo 1: Cereales y derivados	135
2.3.3. Grupo 2: Leche y derivados	140
2.3.4. Grupo 3: Bebidas no lácteas	145
2.4. Concordancia entre los métodos utilizados	147
2.5. Análisis de los datos de alimentos fortificados con ácido fólico obtenidos frente a los niveles declarados en el etiquetado nutricional	151
2.5.1. Ácido fólico obtenido por cromatografía de afinidad-HPLC frente a valores declarados en el etiquetado nutricional	151
2.5.2. Distribución de grupos de alimentos analizados según niveles de fortificación con ácido fólico y grupos de población diana frente a valores declarados en el etiquetado nutricional	156
2.6. Inclusión de resultados analíticos en la Base de Datos	159
3. Estimación y evaluación del aporte de ácido fólico a partir de los alimentos fortificados analizados a las recomendaciones de ingesta de folatos para distintos grupos de población mediante escenarios de simulación	160
3.1. Modelos de desayuno y escenarios de simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico para distintos grupos de población	160
3.1.1. Edad Infantil y adolescente	162
3.1.2. Mujeres en edad fértil (16 a 49 años)	183
3.1.3. Gestación	185

3.1.4. Lactancia	187
3.1.5. Mujeres y hombres: adultos y personas mayores	189
a. Hombres entre 16 y 49 años	189
b. Hombres entre 50 y 59 y mayores de 60 años	192
c. Mujeres entre 50-59 y mayores de 60	195
3.2. Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población infantil y adolescente española: Estudio enKid.	198
3.2.1. Cereales y derivados	198
3.2.2. Lácteos y derivados	201
3.3. Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población adulta de la Comunidad de Madrid: Estudio ENUCAM.	209
3.3.1. Cereales y derivados	209
a. Mujeres en edad fértil (18-44 años)	209
b. Mujeres y hombres: adultos y personas mayores	214
3.3.2. Lácteos y derivados	220
a. Mujeres en edad fértil (18-44 años)	220
b. Mujeres y hombres: adultos y personas mayores	232
V. DISCUSIÓN	
1. Desarrollo, seguimiento y actualización de una base de datos de alimentos fortificados con ácido fólico	249
1.1. Consideraciones previas	249
1.2. Actualización del diseño y estructura de la Base de Datos	250
1.3. Inventario de alimentos fortificados con ácido fólico	253
1.4. Grupos de alimentos y nivel de fortificación con ácido fólico declarado	254
1.5. Estudio de los grupos de alimentos y los niveles de fortificación con ácido fólico de acuerdo a los tipos de marcas comerciales	259
1.6. Grupos de población diana para los alimentos fortificados con ácido fólico	263
1.7. Estudio del etiquetado nutricional y los tipos de alegaciones en el etiquetado de los alimentos fortificados con ácido fólico	266
2. Análisis del contenido en ácido fólico y ácido 5-metiltetrahidrofólico en alimentos fortificados	269
2.1. Consideraciones previas	269
2.2. Ácido fólico, 5-metiltetrahidrofólico y Folato total en distintos grupos de alimentos fortificados	271
2.2.1. Justificación de la elección de los grupos de alimentos	271
2.2.2. Cereales y derivados	272
2.2.3. Leche y derivados	275

2.2.4.	Bebidas no lácteas: cacao y café soluble y zumos y néctares	277
2.3.	Concordancia entre los métodos utilizados	278
2.4.	Ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC en alimentos fortificados: diferencias frente a valores declarados en el etiquetado nutricional	279
2.5.	Distribución porcentual de los grupos de alimentos analizados según niveles de fortificación y grupos de población diana frente a valores declarados	283
3.	Estimación y evaluación de la contribución de los alimentos fortificados a las recomendaciones de ingesta de folatos y ácido fólico para distintos grupos de población mediante escenarios de simulación	287
3.1.	Modelos de desayuno y escenarios de simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico para distintos grupos de población	287
3.1.1.	Consideraciones previas	287
3.1.2.	Edad infantil y adolescente	289
3.1.3.	Mujeres en edad fértil (16 a 49 años)	291
3.1.4.	Gestación y Lactancia	292
3.1.5.	Adultos y personas mayores	294
3.2.	Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población infantil y adolescente: Estudio enKid.	296
3.3.	Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población adulta: Estudio ENUCAM	299
VI.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	309
VII.	SUMMARY	317
1.	JUSTIFICATION OF THE RESEARCH	317
2.	AIMS	318
3.	MATERIALS AND METHODS	319
4.	RESULTS	320
5.	CONCLUSIONS	323
VIII.	ANEXOS	325
1.	Sistema EuroFIR/LanguaL para la clasificación de alimentos	325
2.	Publicaciones derivadas del trabajo de investigación	328
2.1.	Publicaciones en revistas científicas	328
2.2.	Contribuciones a congresos	375
IX.	BIBLIOGRAFIA	377

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

TABLAS

Número	Página
1. <i>Ejemplos de programas de fortificación con micronutrientes en el mundo a lo largo del siglo XX.</i>	8
2. <i>Análisis comparativo de las estrategias para aumentar la ingesta de ácido fólico.</i>	15
3. <i>Políticas actuales de fortificación con ácido fólico en el mundo.</i>	17
4. <i>Revisión de los principales métodos analíticos de folatos y ácido fólico en alimentos.</i>	29
5. <i>Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR), Ingestas Recomendadas (IR) y Niveles Máximos Tolerables (NMT) de Ingesta: valores para EE UU-Canadá y España.</i>	38
6. <i>Beneficios y riesgos potenciales de la ingesta de ácido fólico en distintos grupos de población.</i>	44
7. <i>Revisión de Estudios de Consumo de Alimentos en la población Europea y Española.</i>	46

FIGURAS

Número	Página
1. <i>Estructura del ácido fólico y los poliglutamiltetrahidrofolatos.</i>	21
2. <i>Esquema simplificado del metabolismo de los folatos en el organismo.</i>	23
3. <i>Interpretación de las Ingestas Dietéticas de Referencia.</i>	36

III. MATERIAL Y MÉTODOS

TABLAS

Número	Página
8. <i>Datos de los productos fortificados con ácido fólico recogidos en el inventario en superficies de venta y criterios de clasificación.</i>	56
9. <i>Criterio de clasificación para los alimentos fortificados con ácido fólico de la Base de Datos de acuerdo a la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) que aportan por ración.</i>	57
10. <i>Curva patrón para el ensayo microbiológico.</i>	82
11. <i>Vitámeros analizados en los alimentos fortificados con ácido fólico y equivalencias.</i>	87
12. <i>Revisión de Estudios de Consumo de Alimentos en la población Europea y Española.</i>	92
13. <i>Grupos de población estudiados en los modelos de simulación de ingesta.</i>	94

FIGURAS

Número	Página
4. Esquema del análisis de ácido fólico y folato total en alimentos fortificados.	60
5. Secuencia de purificación y concentración de la Proteína Ligando de Folato (PLF).	69
6. Esquema del equipamiento y las columnas de afinidad-PLF para la purificación de folatos.	73
7. Placa 1: curva de calibrado de 9 puntos y control de calidad.	82

IV. RESULTADOS

TABLAS

Número	Página
14. Estudio de mercado para la actualización de la Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico.	98
15. Criterio de clasificación para los alimentos fortificados con ácido fólico de la Base de Datos de acuerdo a la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) que aportan por ración declarada.	101
16. Valores de ácido fólico declarados para Fórmulas infantiles y de continuación.	103
17. Contenido en ácido fólico y fortificación conjunta con vitaminas B ₆ y B ₁₂ de los alimentos fortificados con ácido fólico declarados por el fabricante por 100 g de producto.	105
18. Alegaciones de salud en los productos fortificados con ácido fólico aprobadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Reglamento (UE) N° 432/2012 [11].	116
19. Precisión del método de cromatografía de afinidad-HPLC: coeficiente de variación intra- e inter-ensayo y contenido en ácido fólico y 5-metiltetrahydrofolato del material estándar de referencia SRM 1846 ^o .	130
20. Precisión del método microbiológico con <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463): coeficiente de variación intra- e inter-ensayo y contenido en folato total del material estándar de referencia SRM 1846 ^o .	133
21. Grupos y subgrupos de alimentos fortificados con ácido fólico analizados por el método microbiológico y cromatografía de afinidad-HPLC.	134
22. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463) en cereales de desayuno.	136
23. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463) en galletas.	139
24. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463) en leche y batidos lácteos.	141
25. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463) en preparados lácteos.	143

TABLAS (continuación)

Número	Página
26. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463) en yogures y leches fermentadas.	144
27. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463) en Cacao y Café soluble y Zumos y néctares.	146
28. Grupos de edad empleados en la simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico en el desayuno.	160
29. Modelos de desayuno y escenarios para la simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico.	161

FIGURAS

Número	Página
8. Pantalla de Access 2000: relaciones de la Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico.	97
9. Distribución en grupos de los alimentos fortificados con ácido fólico que conforman la Base de Datos.	99
10. Distribución de subgrupos de alimentos dentro del grupo de cereales y derivados fortificados con ácido fólico que conforman la Base de Datos.	99
11. Distribución de los niveles de fortificación que presentan los alimentos fortificados con ácido fólico.	100
12. Distribución de los Niveles de fortificación con ácido fólico en los grupos de alimentos de la Base de Datos.	101
13. Distribución de los grupos de alimentos fortificados de acuerdo a los niveles de fortificación con ácido fólico.	102
14. Distribución de los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico de acuerdo al tipo de marca bajo el cual se comercializa.	106
15. Marcas de distribución vs. Marcas del fabricante: distribución del nivel de fortificación de los alimentos con ácido fólico.	107
16. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en Cereales y derivados, según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.	108
17. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en leche y derivados, según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.	108
18. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en Productos para usos nutricionales especiales, según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.	109
19. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en Bebidas (no lácteas), según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.	110

FIGURAS (continuación)

Número	Página
20. Distribución grupos de población diana a los que van dirigidos los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico.	111
21. Distribución grupos de población diana a los que van dirigidos los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico.	112
22. Distribución de los tipos de Alegaciones Nutricionales declaradas en el panel frontal de los alimentos fortificados con ácido fólico (n=375) de acuerdo al Reglamento (CE) nº 1924/2006 [1].	114
23. Distribución de los alimentos que presentan declaraciones nutricionales de contenido en vitaminas (n=247).	114
24. Grupos de alimentos fortificados con ácido fólico que hacen mención específica de su contenido en el panel frontal del etiquetado.	115
25. Estudio del Nivel de Fortificación declarado y la presencia de Alegaciones Nutricionales de contenido en vitaminas, ácido fólico y otros nutrientes en el etiquetado.	115
26. Estudio del Nivel de Fortificación declarado y la presencia de Alegaciones de Salud en el etiquetado.	117
27. A. Cromatograma de una muestra de Material Estándar de Referencia: Preparado Lácteo infantil en polvo (SRM 1846): 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.	121
28. A. Cromatograma de una muestra de Cereales de desayuno con trozos de frutas rojas: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.	122
29. A. Cromatograma de una muestra de Cereales de desayuno azucarados y chocolateados: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.	123
30. A. Cromatograma de una muestra de leche desnatada: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.	124
31. A. Cromatograma de una muestra de preparado lácteo: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.	125
32. A. Cromatograma de una muestra de galletas: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.	126
33. A. Cromatograma de una muestra de cacao soluble instantáneo: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.	127
34. Linealidad del método expresada como área del pico de absorbancia de UV vs. nmol de ácido fólico en 1,8 ml de eluido de la columna de afinidad e inyectado en el HPLC.	129
35. Linealidad del método expresada como área del pico de fluorescencia vs. nmol de 5-metiltetrahidrofolato en 1,8 ml de eluido de la columna de afinidad e inyectado en el HPLC.	129

FIGURAS (continuación)

Número	Página
36. Repetibilidad del método de cromatografía de afinidad-HPLC utilizando material estándar de referencia SRM 1846 ^o .	130
37. Linealidad del método microbiológico con <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463).	131
38. Control de calidad y repetibilidad del método microbiológico con <i>L. rhamnosus</i> (NCIB 10463) a distintas concentraciones de folato total.	132
39. Repetibilidad del ensayo microbiológico utilizando material estándar de referencia SRM 1846 ^o .	133
40. Comparación de la concentración de folato total en 154 muestras de alimentos fortificados con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.	147
41. Comparación de la concentración de folato total en cereales de desayuno fortificados con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.	148
42. Comparación de la concentración de folato total en galletas fortificadas con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.	148
43. Comparación de la concentración de folato total en leche y derivados fortificados con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.	149
44. Comparación de la concentración de folato total en bebidas (no lácteas) fortificadas con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.	149
45. Resultados de la regresión del método de Bland-Altman que compara los métodos microbiológico (MA) y cromatografía de afinidad-HPLC (HPLC) para el análisis de folato total en 154 alimentos fortificados con ácido fólico.	150
46. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en cereales de desayuno.	151
47. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en galletas.	152
48. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en leche.	153
49. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en preparados lácteos.	154
50. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en yogures y leches fermentadas.	154
51. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en bebidas (no lácteas).	155
52. Niveles de fortificación con ácido fólico: valores obtenidos de forma analítica frente a valores declarados por el fabricante según el grupo de alimentos.	156
53. Niveles de fortificación con ácido fólico obtenidos analíticamente para los grupos de población diana, comparación con los valores declarados por el fabricante.	157
54. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.	162

FIGURAS (continuación)

Número	Página
55. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	163
56. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	164
57. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	165
58. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	166
59. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.	167
60. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	168
61. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	169
62. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	170
63. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	170
64. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.	171
65. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	172
66. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	172
67. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	173
68. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.	174
69. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.	175

FIGURAS (continuación)

Número	Página
70. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	176
71. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	176
72. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	177
73. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	178
74. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	179
75. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	180
76. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	180
77. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	181
78. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	182
79. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	182
80. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	183
81. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	184
82. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	184
83. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	185
84. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	186

FIGURAS (continuación)

Número	Página
85. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	186
86. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	187
87. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	188
88. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	189
89. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	190
90. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	191
91. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	192
92. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	193
93. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	193
94. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	194
95. <i>Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.</i>	195
96. <i>Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	196
97. <i>Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.</i>	196
98. <i>Cereales de desayuno, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	198
99. <i>Cereales de desayuno, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	199
100. <i>Cereales de desayuno, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	200

FIGURAS (continuación)

Número	Página
101. <i>Cereales de desayuno, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	201
102. <i>Leche, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	202
103. <i>Leche, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	203
104. <i>Leche, Nivel 4 de fortificación: Niveles Máximos Tolerables de Ingesta de ácido fólico alcanzados en población infantil y adolescente, estudio enKid [19].</i>	204
105. <i>Yogurt, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	205
106. <i>Yogurt, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	206
107. <i>Yogurt, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	206
108. <i>Yogurt, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].</i>	207
109. <i>Yogurt, Nivel 4 de fortificación: Niveles Máximos Tolerables de Ingesta de ácido fólico alcanzados en población infantil y adolescente, estudio enKid [19].</i>	208
110. <i>Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 1, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	209
111. <i>Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 2, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	210
112. <i>Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 3, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	211
113. <i>Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 4, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	211
114. <i>Galletas, Nivel de fortificación 1, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	212
115. <i>Galletas, Nivel de fortificación 2, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	213
116. <i>Galletas, Nivel de fortificación 3, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	213
117. <i>Cereales de desayuno, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	214
118. <i>Cereales de desayuno, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	215
119. <i>Cereales de desayuno, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	216
120. <i>Cereales de desayuno, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	217

FIGURAS (continuación)

Número	Página
121. <i>Galletas, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	218
122. <i>Galletas, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	219
123. <i>Galletas, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	220
124. <i>Leche desnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	221
125. <i>Leche entera, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	222
126. <i>Leche semidesnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	222
127. <i>Leche desnatada, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	223
128. <i>Leche entera, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	224
129. <i>Leche semidesnatada Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	224
130. <i>Yogurt desnatado, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	225
131. <i>Yogurt entero, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	226
132. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	226
133. <i>Yogurt desnatado, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	227
134. <i>Yogurt entero, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	228
135. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	228
136. <i>Yogurt desnatado, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	229
137. <i>Yogurt entero, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	229
138. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	230
139. <i>Yogurt desnatado, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	231

FIGURAS (continuación)

Número	Página
140. <i>Yogurt entero, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	231
141. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp , Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].</i>	232
142. <i>Leche desnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	233
143. <i>Leche entera, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	234
144. <i>Leche semidesnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	235
145. <i>Leche desnatada, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	236
146. <i>Leche entera, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	237
147. <i>Leche semidesnatada, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	238
148. <i>Yogurt desnatado, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	239
149. <i>Yogurt entero, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	239
150. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	240
151. <i>Yogurt desnatado, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	241
152. <i>Yogurt entero, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	242
153. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	242
154. <i>Yogurt desnatado, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	243
155. <i>Yogurt entero, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	243

FIGURAS (continuación)

Número	Página
156. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	244
157. <i>Yogurt desnatado, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	245
158. <i>Yogurt entero, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	246
159. <i>Yogurt fermentado con Bifidus Lactobacillus spp, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].</i>	246

ABREVIATURAS

AF: Ácido fólico

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (siglas del inglés: Centers for Disease Control)

CDR: Cantidad Diaria Recomendada

EDF: Equivalentes Dietarios de Folatos

EFSA: Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (siglas del inglés: European Food Safety Authority)

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

FEN: Fundación Española de la Nutrición

FNB: Food and Nutrition Board

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IA: Ingesta Adecuada

IDR: Ingestas Dietéticas de Referencia

ILSI: Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (siglas del inglés International Life Sciences Institute)

IR: Ingestas Recomendadas

IS: Estándar internacional (siglas del inglés: International Standard)

DTN: Defectos del tubo neural

DRV: Valores Dietéticos de Referencia (siglas del inglés: Dietary Reference Values)

LC/MS/MS: Cromatografía Líquida asociada a Espectrometría de Masas en tándem (siglas del inglés: Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry)

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

MDD: Marca del distribuidor

MDF: Marca del fabricante

NFD: Nivel de fortificación declarado

NHANES: Encuesta Nacional de Examen Salud y Nutrición de los EE UU (siglas del inglés, *National Health and Nutrition Examination Surveys*)

NMT: Nivel Máximo Tolerable de Ingesta

OMS: Organización Mundial de la Salud

PLF: Proteína ligando de folato

RME: Requerimiento Medio Estimado

SRM: Material Estándar de Referencia (siglas del inglés: Standard Reference Material)

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde mediados del siglo pasado, la fortificación de alimentos con diversos nutrientes, vitaminas y minerales, ha supuesto una herramienta fundamental: efectiva y a bajo coste, en materia de nutrición y salud pública. En un principio fue una de las estrategias diseñadas para solucionar las deficiencias nutricionales que aquejaban a distintos grupos de población a nivel mundial. En este sentido, gracias a la adición de vitaminas y minerales a los alimentos de consumo básico como las harinas y la sal, desaparecieron enfermedades endémicas tales como el bocio [4].

El ejemplo de la fortificación de alimentos con ácido fólico es uno de los más representativos de los últimos 20 años. Desde 1992 se sabe que la fortificación periconcepcional disminuye el riesgo de padecer un embarazo afectado por Defectos del Tubo Neural [5]. En la actualidad, son más de 58 los países que a nivel mundial se han adherido a la implementación de la fortificación obligatoria de harinas con ácido fólico [6].

A pesar del gran volumen de publicaciones relacionadas con el ácido fólico y su papel en la etiología de diversas enfermedades, pocos estudios abordan la problemática que supone el análisis de estos vitámeros. Si bien es conocida la inestabilidad de los folatos naturales y se ha estudiado su contenido en alimentos como verduras, hortalizas, legumbres, etc.

El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, siglas del inglés *International Life Sciences Institute*) [7], la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, siglas del inglés *European Food Safety Authority*) [8] y otras agencias científicas han puesto de manifiesto la necesidad de disponer de datos de composición de los alimentos fortificados que se comercializan, dado su actual consumo y aceptación por parte de la población.

El interés por los estudios que evalúan los datos de consumo de alimentos fortificados y su potencial implicación en la ingesta de vitaminas de la población española son muy recientes [9]. La mayoría de estos trabajos utilizan los valores de las vitaminas declarados por el fabricante en el etiquetado de los productos. En España no

existe ninguna publicación o trabajo que evalúe la ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico a partir de datos analíticos de los mismos. Además, diversos estudios plantean que los alimentos fortificados con ácido fólico pueden presentar niveles mayores a los declarados por los fabricantes, lo cual complica aún más si cabe la estimación de la ingesta.

Los métodos para el análisis de folatos en alimentos han sido puestos “en entredicho” por los expertos [10]. En la actualidad, sólo existe un método de referencia (ensayo microbiológico, AOAC [11]), el cual no es válido para obtener las distintas formas de folatos presentes en las matrices alimentarias. De esta forma, los métodos de análisis de folatos y ácido fólico en alimentos no están del todo definidos ni estandarizados. Cada uno presenta limitaciones y ventajas, lo cual hace que los valores de folatos en los alimentos sean en ocasiones dispares o simplemente existan alimentos que no se hayan analizado e incluido en las Tablas de Composición de Alimentos. Éstos son justamente aquellos alimentos novedosos en el mercado, pero que cada vez tienen mayor representación en el mismo.

En el trabajo presentado para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados (DEA) en 2007 [12] se diseñó una Base de Datos pionera en España para la recopilación de datos de ácido fólico y folatos en los alimentos. Ésta incluyó los datos derivados de un inventario de alimentos fortificados con ácido fólico y de una recopilación de Tablas de Composición de alimentos españolas: en las cuales se observó que no existen datos analíticos para alimentos fortificados y se encuentran como tales en número reducido. Asimismo, se puso a punto las técnicas para el análisis de folatos en los alimentos basada en el método microbiológico de referencia y se analizaron muestras de cereales de desayuno fortificados con ácido fólico. La principal limitación de dicho trabajo fue la dificultad de obtener los datos del ácido fólico sintético contenido en estos alimentos, ya que, como se ha mencionado, el método microbiológico de referencia cuantifica el contenido total de folatos. Basándose en este hecho, la tesis doctoral de la Dra. Poó-Prieto, integrante de nuestro grupo de investigación, constituyó la base para llevar a cabo el presente trabajo. De este modo, se realizó la puesta a punto de las técnicas desarrolladas en Estados Unidos por la Dra. Poó-Prieto

para el análisis de alimentos fortificados con ácido fólico de este país en los laboratorios de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo.

Nuestra hipótesis de trabajo fue la siguiente: *En el mercado español se comercializa un importante número de alimentos fortificados de forma voluntaria con ácido fólico, con distintos niveles añadidos de esta vitamina lo cual puede implicar un aporte importante y/o beneficioso para las ingestas de determinados grupos de población pero puede constituir un riesgo potencial de ingesta excesiva para otros subgrupos.*

En base a todo lo expuesto nos planteamos como objetivo principal estudiar el mercado de los alimentos fortificados de forma voluntaria con ácido fólico en España. Para ello se llevaron a cabo los siguientes sub-objetivos:

1. Actualizar la Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en el mercado español, previamente diseñada y desarrollada en nuestro Departamento.
2. Armonizar los contenidos de esta Base de Datos de acuerdo a los criterios del proyecto EuroFIR para permitir el intercambio de datos.
3. Analizar los grupos mayoritarios de alimentos fortificados con ácido fólico mediante la aplicación de los métodos desarrollados y validados en nuestro Departamento (cromatografía de afinidad-HPLC) en paralelo al método microbiológico de referencia actualizado y validado.
4. Plantear posibles escenarios de simulación del consumo de alimentos fortificados con ácido fólico y estimar su impacto en las Ingestas Recomendadas para la población española y los Niveles Máximos Tolerables de Ingesta de esta vitamina para distintos grupos de población.

5. Estimar la contribución a los requerimientos de ácido fólico, utilizando por una parte datos de consumo de alimentos de dos estudios en población española: adultos y edad infantil, y por otra, los niveles de fortificación encontrados en los alimentos analizados.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. La fortificación de los alimentos

1.1. Perspectiva histórica

La historia de la evolución de la alimentación del hombre en el siglo XX, desde las sociedades agrarias hasta las industrializadas, se encuentra profundamente ligada a cambios en los hábitos y patrones alimentarios. Dichos cambios, le han llevado a adaptarse al medio y mejorar sus condiciones de vida, pero en muchas ocasiones también a desarrollar deficiencias nutricionales específicas. Estas deficiencias podían deberse a una ingesta dietética insuficiente, o a una inadecuada utilización biológica de los nutrientes (baja biodisponibilidad), pero asimismo a un aumento en las necesidades fisiológicas (crecimiento) o a un incremento debido a pérdidas (enfermedad). Las deficiencias o carencias nutricionales por las cuales la falta de uno o más nutrientes daba lugar a la aparición de diversas enfermedades, fueron encontrando solución a partir de mediados del siglo XX. Así, uno de los descubrimientos determinantes en el mundo de la nutrición, fue el de las vitaminas y su papel esencial en el correcto desarrollo y el mantenimiento de la salud.

A finales del siglo XIX se creía que una dieta estaba completa con cantidad suficiente de proteínas, hidratos de carbono, grasas, sales inorgánicas y agua. Entre 1880 y 1912, Lunin, Pekelharing y Hopkins observaron en animales alimentados con mezclas purificadas de alimentos, que los animales ralentizaban su crecimiento, perdían peso e incluso perecían [13]. Únicamente lograban solucionar esta situación mediante la adición a la dieta de pequeñas cantidades de leche, sugiriendo la necesidad de “factores accesorios alimentarios” para normalizar el crecimiento [13]. La deficiencia de estos factores, denominados “vitaminas” por Funk, sería más tarde reconocida como responsable de enfermedades carenciales como el beriberi, el escorbuto, el raquitismo y la pelagra [14].

Con el descubrimiento de las vitaminas y su posterior síntesis química y disponibilidad, la fortificación o enriquecimiento de alimentos, entendida como la adición de vitaminas y/o minerales a matrices alimentarias que carecían de los mismos o bien los contenían en bajas concentraciones. En la **Tabla 1** se resumen las principales

estrategias de fortificación adoptadas a lo largo del siglo XX, que consiguieron con éxito erradicar y/o prevenir enfermedades en muchas zonas del mundo y que se continúan utilizando en el presente. Igualmente, se incluye el ejemplo de fortificación más reciente, con ácido fólico y cantidades superiores del mismo, para la prevención de los Defectos del Tubo Neural (DTN).

Tabla 1. Ejemplos de programas de fortificación con micronutrientes en el mundo a lo largo del siglo XX.

Año y país de implantación	Nutriente y nivel de fortificación	Prevención de Enfermedad	Matriz Alimentaria
1920 Dinamarca [15]	Vitamina A	Ceguera nocturna, xeroftalmia y xerosis	Margarina
1924 Michigan, EE UU [16]	Iodo (Ioduro Sódico 0.01 g/100 g de sal)	Bocio (Hiperplasia glándula tiroides)	Sal
1931 EE UU [17]	Vitamina D	Raquitismo (Malformaciones en los huesos por defecto en su formación)	Leche y derivados
1938 EE UU [18]	Niacina (adición de levadura alta en vitaminas y leche en polvo)	Pelagra (Dermatitis, diarrea, inflamación Membranas, demencia y muerte)	Pan
1940 EE UU [19, 20]	Tiamina, niacina, riboflavina y hierro	Beri-Beri, Pelagra, queratitis y anemia	Harinas
1998 EE UU y Canadá [19, 21]	Ácido Fólico (140 µg/100 g de alimento)	Defectos del Tubo Neural (Espina bífida, anencefalia, muerte perinatal)	Harinas y derivados de cereales

1.2. Definición y conceptos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la *fortificación de alimentos* como “la práctica por la cual se incrementan los niveles de uno o más nutrientes esenciales en un alimento, como vitaminas y minerales, con objeto de mejorar su calidad nutricional y proporcionar así un beneficio a la salud pública, minimizando los riesgos para la misma” [22]. De acuerdo a la OMS “la fortificación de alimentos con minerales y vitaminas es considerada en la actualidad, una de las principales medidas

para mejorar las ingestas de las poblaciones” [22]. Si bien los beneficios de la fortificación se han demostrado en numerosos grupos de población a nivel mundial, las sociedades occidentalizadas actuales se enfrentan a nuevos retos nutricionales: dietas energéticamente densas y paradójicamente escasas en micronutrientes y en otros compuestos no nutritivos esenciales y que pueden dar lugar a serios desequilibrios nutricionales. Estas “nuevas deficiencias” pueden corregirse mediante la utilización de alimentos fortificados y/o suplementos farmacológicos, los cuales están siendo elementos clave en la mejora del estatus nutricional [9].

De acuerdo con Dary [15], para que la implantación de un programa de fortificación sea efectivo a nivel nacional debe reunir los siguiente requisitos:

- a.** La matriz alimentaria a fortificar debe consumirse de forma regular, no debe presentar cambios organolépticos frente al producto no fortificado y el nutriente debe presentarse en su forma más biodisponible y en suficiente cantidad;
- b.** Los productos fortificados deberían proporcionar como mínimo un 15% de las Ingestas Diarias Recomendadas para el grupo diana (i.e. individuos que consuman los niveles más bajos de alimento fortificado);
- c.** La fortificación voluntaria de los alimentos debería estar regulada/legislada para evitar el consumo excesivo de un determinado nutriente;
- d.** Los países vecinos deberían armonizar los estándares técnicos, facilitar su cumplimiento y minimizar los conflictos asociados a las leyes de comercio e intercambio;
- e.** Debe instaurarse un sistema práctico/eficaz y fiable de monitorización;
- f.** Las actividades de “marketing social” deberían ser permanentes y orientadas a la industria, las autoridades y los consumidores;

- g.** La fortificación de alimentos debería complementarse con otras estrategias (i.e. la suplementación) para cubrir los requerimientos de aquellos grupos que no puedan hacerlo únicamente mediante la fortificación.

Resulta de gran importancia conocer el estado nutricional de los distintos subgrupos de población, dado que sus requerimientos varían con la edad, género y situación fisiológica [23]. En la actualidad se discute que estos datos pueden ser en muchos casos insuficientes o poco representativos dada la variabilidad a la que están sujetos los métodos para su evaluación [24]. Además, el envejecimiento progresivo y fisiológico de la población hace que aumente la proporción de individuos que presentan estatus inadecuado de nutrientes, ya sea por deficiencias en la dieta o por síndromes de malabsorción [25]. El panorama es complejo, ya que en la práctica nos encontramos con grupos de población con distintas situaciones fisiológicas y requerimientos, como mujeres gestantes y madres en periodo de lactancia, y grupos potencialmente susceptibles de ingestas insuficientes, como pueden ser los niños y las personas mayores.

La necesidad de la fortificación de alimentos ha sido cuestionada en ocasiones a lo largo de los años, ya que son muchos los autores que señalan que las cantidades necesarias de todos los nutrientes podrían ser alcanzadas y mantenidas mediante una dieta variada, equilibrada y moderada, del tipo de la Dieta Mediterránea [26]. Otros, sin embargo, han comprobado que los patrones alimentarios actuales son insuficientes para cubrir las necesidades de determinados nutrientes (vitamina D, hierro, etc.) y pueden, por otro lado, resultar excesivos en algunos casos (grasas saturadas, sodio, etc.) [27]. Numerosos estudios en Europa y España ponen de manifiesto la existencia de subgrupos de población que no alcanzan las Ingestas Recomendadas (IR) para varios nutrientes [28, 29]. A modo de ejemplo, en España, país que hasta hace pocos años era modelo de dieta óptima, las mujeres en el rango de edad entre 20 y 39 años únicamente alcanzan el 53% de sus IR de ácido fólico [27, 28].

Considerando todo lo anterior, la fortificación se plantea como una herramienta efectiva para aumentar el valor nutricional de los alimentos y mejorar el estatus de nutrientes específicos en aquellos subgrupos de población que de lo contrario no podrían alcanzarlo. En la actualidad, unos 67 países aplican políticas de fortificación de alimentos de consumo básico como las harinas y la leche, con diversas vitaminas y minerales [6].

La fortificación de alimentos con la vitamina hidrosoluble del grupo B, conocida como ácido fólico o B₉, es uno de los ejemplos más representativos de cómo un hallazgo científico fue traducido posteriormente a política nutricional de fortificación [30]. Su papel en la prevención de los Defectos del Tubo Neural (DTN) mediante la suplementación periconcepcional de las madres gestantes, se conoce desde 1991 [21]. En el caso de la fortificación con ácido fólico nos encontramos ante un escenario complicado: por una parte, contamos con la evidencia científica de su papel en la prevención de los DTN. Además, existe un gran volumen de estudios que en los últimos 10 años vienen asociando, la ingesta “mayor a la recomendada u óptima” con un papel potencial en la prevención de la enfermedad cardiovascular [31]. Sin embargo, no son todavía bien conocidos los efectos derivados de una ingesta excesiva, y a largo plazo de la vitamina en los denominados grupos vulnerables de población [32, 33].

1.3. Políticas y estrategias actuales de fortificación alimentaria

En los países industrializados existe en la actualidad una gran disponibilidad de alimentos procesados y modificados en su composición en nutrientes, para los cuales se acunaron diversas definiciones y terminología. Una revisión de la literatura nos indica que a día de hoy podemos encontrar publicaciones que emplean indistintamente el término de alimento “*fortificado*” y “*enriquecido*” a la par que “*funcional*”. Si bien hemos definido los alimentos fortificados de acuerdo a la OMS, el límite entre estos conceptos es difuso y muchas veces en un mismo alimento se combinan prácticas de fortificación, enriquecimiento y “*funcionalidad*”. Así, el enriquecimiento hace referencia a la adición de micronutrientes a un alimento que de por sí no los contiene de forma natural [24]. Por otro lado, un alimento funcional es “*aquel que haya demostrado satisfactoriamente su capacidad de modificar de forma*

beneficiosa una o más funciones diana en el organismo, más allá de su efecto puramente nutricional, y de forma relevante para la salud, bienestar y/o reducción del riesgo de enfermedad” [34]. De esta forma quedarían también incluidos los alimentos “naturales”, así como los procesados con adición, eliminación o remplazo de uno o más de sus componentes, alimentos mejorados por biotecnología, condiciones de cultivo o aumento de la biodisponibilidad de sus componentes, o bien combinación de estos [34]. En el presente trabajo se hará referencia a los alimentos fortificados con ácido fólico como aquellos a los que se ha añadido, durante el procesado, la forma sintética de la vitamina en concentraciones superiores a las que cabría esperar de folatos naturales en la matriz alimentaria. Cuando se pretende aumentar y/o adecuar el consumo de folatos, ya sea en su forma natural o ácido fólico sintético; o de cualquier otro nutriente con riesgo de deficiencia en la población, existen básicamente cuatro estrategias:

- a. La educación nutricional de los distintos grupos de población, que debe ser la base de toda intervención que favorezca y promueva modificaciones en los hábitos alimentarios y la dieta. Así, se debe potenciar el conocimiento de una dieta equilibrada y la motivación del aumento de consumo de aquellos alimentos ricos en folatos naturales. Las autoridades, medios de comunicación y profesionales sanitarios son de gran importancia en este sentido.
- b. La recomendación de suplementación farmacológica con ácido fólico a poblaciones diana, como son las mujeres que desean quedarse embarazadas (etapa periconcepcional), ya sea por prescripción médica o autoprescripción.
- c. La adición de nutrientes a los alimentos procesados, denominada fortificación, ha demostrado ser de gran valor para la adecuación a los requerimientos de folatos. Cuando nos referimos a la fortificación obligatoria, hablamos de políticas implementadas por los gobiernos como medidas preventivas de salud pública, de acuerdo a la evidencia científica disponible. Tal es el caso de la fortificación con ácido fólico, iniciada en 1998 en los EE.UU y Canadá para la prevención de los DTN [19]. En la actualidad son hasta 54 los países que aplican la fortificación

obligatoria de harinas con ácido fólico [6] pero este número podría alcanzar los 60 dependiendo de la fuente consultada [35].

- d. La fortificación voluntaria se basa en la libre adición de la vitamina a diversos productos de acuerdo a los criterios establecidos por la industria alimentaria y la legislación nacional o europea para la libre circulación de productos. En este caso el objeto de la fortificación es dar un valor añadido al producto para su comercialización [36].

2. Fortificación de alimentos con ácido fólico

2.1. Intervenciones nutricionales para la mejora del estatus en folatos

Una vez definidas las estrategias que se utilizan para mejorar el estatus nutricional de las poblaciones, es necesario revisar las ventajas e inconvenientes asociadas a cada una de ellas (**Tabla 2**). No existe una intervención nutricional óptima y la experiencia de muchos países apunta a que una combinación correctamente planificada de estas estrategias tiene mayores índices de éxito [37].

La educación nutricional, por ejemplo en forma de campañas de salud pública, es compleja en su diseño e implementación. Muchas veces resulta poco eficaz por ausencia de implantación o por la poca motivación de las poblaciones diana [36]. Las autoridades, medios de comunicación y profesionales sanitarios son de gran importancia en este sentido ya que pueden transmitir importantes mensajes a la población. Además, es importante considerar que los alimentos naturalmente ricos en folatos son limitados, siendo necesaria en muchas ocasiones la ingesta de cantidades mayores. Muchos estudios afirman que es virtualmente imposible alcanzar las recomendaciones de folatos a través de la dieta [36]. Por otro lado, estudios recientes de consumo en la población española nos indican que varios segmentos de edad realizan un bajo consumo de las principales fuentes de folatos [38].

La suplementación con ácido fólico ha sido recomendada a nivel mundial, tanto para las mujeres en edad periconcepcional (400 µg/ día) como para aquellas que ya han tenido un embarazo afectado por NTD (4 mg/ día) [19, 36]. Entre las fortalezas destaca una mayor especificidad en la intervención y un mejor ajuste de dosis. Sin embargo, teniendo en cuenta que más de un 50% de los embarazos no son planificados [36], es necesario un cierto nivel de educación y concienciación por parte de las consumidoras diana. Además, podría verse aumentado el riesgo de autoprescripción, derivando en consumo excesivo y una potencial toxicidad [39]. Por último, implica un mayor coste y una baja adhesión al tratamiento a largo plazo [40].

La fortificación de los alimentos, definida en el apartado anterior, puede implementarse de forma *obligatoria* o *voluntaria*. La primera implica la universalidad de la ingesta sin imprimir cambios drásticos en los hábitos de la población. Por el contrario, diversas autoridades señalan que la fortificación voluntaria, al depender de criterios “no nutricionales”, debe controlarse para evitar ingestas excesivas de nutrientes [41, 42], ya que el consumidor medio no siempre tiene el conocimiento suficiente para realizar la elección correcta de los alimentos que adquiere [36]. En este sentido, una futura legislación europea que establecerá mínimos y máximos de adición de vitaminas, será de utilidad en el control que requiere este tipo de fortificación [43]. Si bien la integración de todas estas estrategias parece ser la opción más adecuada para subsanar las deficiencias nutricionales de folatos en la población, investigadores de países como EE UU donde conviven la fortificación obligatoria, la voluntaria y la suplementación farmacológica, subrayan la importancia de la monitorización de las mismas [39]

Tabla 2. Análisis comparativo de las estrategias para aumentar la ingesta de ácido fólico.

Estrategias y ámbitos de aplicación			Fortalezas	Debilidades
Educación Nutricional y Consejo Dietético	Australia y Nueva Zelanda, EE UU, Canadá y Sudamérica, entre otros [30]	Europa	Mejora global del estatus nutricional de la población [44]	Dificultad para el cambio de hábitos alimentarios y mantenimiento a largo plazo [46]
			La dieta variada, equilibrada y moderada debería proporcionar todos los nutrientes necesarios [45]	Biodisponibilidad y estabilidad de los folatos en los alimentos “cuestionada” [47, 48]
Suplementación Farmacológica			Especificidad en poblaciones diana [49] Mejor dosificación	Embarazos no planificados Baja adhesión
			No implica cambio de hábitos alimentarios	Dependencia estatus socio-económico [40]
				Mayor riesgo potencial al combinarse con otras prácticas de fortificación [39]
Fortificación Voluntaria			Información nutricional al consumidor [50]	Ingesta excesiva o insuficiente de acuerdo a patrones de consumo [52] [53]
			Consumo por elección	Niveles de fortificación dependen del tipo de producto, población al que van dirigidos y cantidades añadidas por el fabricante [51]
			Marketing de producto hacia la población diana [51]	Productos más caros
			Mejora del estatus en vitaminas y minerales	
Fortificación Obligatoria			Niveles de fortificación regulados por las autoridades [19]	Dosis función de cantidad de alimento [54]
			Alcance universal: no implica cambio de hábitos alimentarios drásticos (harinas y derivados de cereales)	Riesgo de ingestas excesivas Baja especificidad: alcance universal
			Mejora en la relación coste-beneficio (?) [19, 48]	Prácticas y legislación difieren según países [37]
Combinación de estrategias			Mejora del estatus general en vitaminas y minerales [55]	Mayor probabilidad de ingestas excesivas en segmentos determinados de la población [56, 57]

2.2. Políticas y niveles de fortificación con ácido fólico a nivel mundial

De acuerdo con los últimos datos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, siglas del inglés *Centers for Disease Control*, EE UU), en la actualidad, de los 63 países que aplican políticas de fortificación de alimentos, unos 54 países aplican la fortificación obligatoria con ácido fólico, principalmente en harinas y derivados de cereales, como medida de salud pública para la prevención de los DTN [6, 30]. Esta cifra puede variar de acuerdo con la fuente consultada. Recientemente, Australia se ha incorporado a la práctica de fortificación obligatoria (año 2009, [58]) con niveles entre 200 y 300 μg de ácido fólico por 100 g de harina panificable. En la mayor parte de Europa existe aún una gran reticencia a la implantación de esta medida, derivada en parte del desconocimiento de las consecuencias de una ingesta elevada y a largo plazo en grupos vulnerables de población [59]. La fortificación voluntaria con ácido fólico se practica de forma común en la UE bajo el Reglamento 1925/2006/EC [60] sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias a los alimentos. Esta regulación permite la fortificación de todos los alimentos con excepción de los no procesados y las bebidas alcohólicas. La fortificación voluntaria con ácido fólico está muy extendida en el mercado europeo [41, 61], con excepción de Suecia donde la fortificación voluntaria no se practica y Bélgica, Dinamarca, Holanda y Noruega donde se aplican restricciones y/o se requiere aprobación específica para la fortificación voluntaria. Por ejemplo, hasta el año 2007, Holanda prohibía la fortificación voluntaria con ácido fólico, pero dada la libre circulación de alimentos en la UE tuvo que adaptar su legislación [62]; así, en la actualidad, se permite la fortificación voluntaria en un máximo de 100 μg de ácido fólico por cada 100 kcal que aporte el producto (100 $\mu\text{g}/100$ kcal). Se encuentran una gran variedad de productos fortificados de forma voluntaria incluyendo lácteos, cereales de desayuno, barras de cereales, zumos de fruta, grasas untables, pan y bebidas. En el Reino Unido, se ha recomendado y considerado seriamente la implantación de la fortificación obligatoria con ácido fólico, pero hasta la fecha no ha sido aprobada [42]. En la **Tabla 3** se resumen las políticas aplicadas en diferentes países, así como los vehículos y niveles de fortificación disponibles en cada uno. Los niveles máximos de adición de ácido fólico a los alimentos aún no están establecidos en la regulación europea.

Tabla 3. Políticas actuales de fortificación con ácido fólico en el mundo.

País	Política fortificación	Alimentos y nivel de fortificación
Norteamérica		
Canadá	Obligatoria	150 µg/100 g en harina de trigo refinada 200 µg/100 g en pasta fresca (se estima que aporta 150 µg/100 g pasta cocida)
Estados Unidos	Obligatoria	140 µg/100 g en cereales tal y como se consumen (harina, pan, galletas, pasta)
	Voluntaria	150 – 220 µg/100 g en harina de maíz
Australia y Nueva Zelanda		
Australia	Obligatoria	Harina de trigo panificable (200 µg/100 g, se estima que aportara 120 µg/ 100 g de pan)
Nueva Zelanda	Voluntaria	
Caribe y Sudamérica		
Chile	Obligatoria	220 µg/100 g en harinas
Argentina Brasil Bolivia Colombia Costa Rica Republica Dominicana Ecuador El Salvador Guatemala Honduras México Nicaragua Panamá Paraguay	Obligatoria	150 µg/100 g en harina de trigo y maíz
Barbados Belice Guadalupe Guyana Perú, Puerto Rico San Vicente y Granadinas Surinam, Trinidad y Tobago	Obligatoria	Entre 40 y 300 µg/100 g. Harina de trigo (también harina de maíz, arroz y leche en algunos países)
Europa		
España	Voluntaria	Cereales de desayuno, barras de cereales, galletas, leche, yogures, batidos, etc. 30 - 300 µg/ 100 g o ml
Bélgica	Voluntaria con restricciones	Alimentos y suplementos alimentarios. Para que aparezca en el etiquetado como “fortificado con ácido fólico” la ración debe proporcionar entre el 15 y el 200% de 200 µg
Dinamarca	Voluntaria con restricciones	Requiere aprobación. Galletas tipo “crackers” y zumo de naranja. Hasta un máximo de 23 µg/100 kcal de alimento

Tabla 3. Políticas de fortificación con ácido fólico en el mundo (Continuación).

País	Política fortificación	Alimentos y nivel de fortificación
Europa (continuación)		
Francia	Voluntaria	Cereales de desayuno: solo fortificados si van a ser consumidos por niños o mujeres (varios niveles). Leche de cabra: 4.5 µg /100 ml
Alemania	Voluntaria	Cereales de desayuno, barritas de cereales, bebidas y sal (varios niveles)
Grecia	Voluntaria	Detalles no disponibles
Hungría	Voluntaria	En 1998 se introdujo un pan para prevenir los defectos del nacimiento, el cual se fortificó con ácido fólico y vitaminas B ₂ , B ₆ y B ₁₂ . No tuvo éxito dado su alto precio. En 2005 un grupo de trabajadores de un molino introdujeron dos harinas fortificadas: 1. Para mujeres que pudieran quedar embarazadas (350 µg de ácido fólico, 10 µg de B ₁₂ , 500 µg de B ₂ y 1600 µg de B ₆ por 100 g de harina) 2. Para prevención de la enfermedad cardiovascular (250 µg de ácido fólico, 10 µg de B ₁₂ , 500 µg de B ₂ , y 1600 µg B ₆ por 100 g de harina)
Holanda	Voluntaria con restricciones	Hasta un máximo de 100 µg/100 kcal de alimento
Islandia	Voluntaria	Cereales de desayuno: 30-700 µg/100 g Harina y arroz: 30-100 µg/100 g
Irlanda	Voluntaria	Varios productos fortificados con la denominación de etiquetado "Folic Acid Flash Labelling Scheme": Leche (70 µg/100 ml); yogurt (36 µg/ 90 g); panes (50-263 µg/100 g); harina para elaboración de pan (140 µg/100 g)
Noruega	Voluntaria con restricciones	Requiere aprobación. Barritas energéticas (78 µg y sustitutivos lácteos (13µg/100 ml de leche)
Reino Unido	Voluntaria	Cereales y otros productos para el desayuno (8-643µg/100g), Grasas untables (1mg/100g)
África y Oriente Medio		
Israel	Obligatoria	Fortifica harina de trigo con ácido fólico y vitamina B ₁₂ (niveles no disponibles)
Arabia Saudí	Obligatoria	Harina de trigo (150 µg/100 g)
Malawi Sudáfrica Zambia	Obligatoria	Harina de maíz (206 µg/100 g) Harina de trigo refinada (136 µg/100 g) Harina de trigo integral (124 µg/100 g) Pan blanco e integral (74 µg/100 g)
Bahréin, Marruecos Nigeria, Omán, Qatar, Yemen	Obligatoria	Alimentos y niveles no disponibles
Asia		
Indonesia	Obligatoria	Harina de trigo (200 µg/100 g)
Kazakhstan y Kyrgyzstan	Obligatoria	Alimentos y niveles no disponibles

Adaptada de varias fuentes: Europa [8] España [51], Holanda [62], América Latina y Caribe [63] EE.UU y Canadá [30] Irlanda [64] Reino Unido [42] [65] Australia [58].

2.3. El ácido fólico y los folatos

2.3.1. Descubrimiento, definición y estructura química

Descubrimiento

En 1931, la investigadora inglesa Lucy Wills, quien estudiaba la anemia macrocítica gestacional en una población de la India, utilizó un extracto de levadura (marmita) para tratar con éxito a las mujeres afectadas [66]. Posteriormente en 1937, comprobó la eficacia de ese extracto para revertir la anemia macrocítica inducida en monos Rhesus alimentados con una dieta similar a la consumida en Bombay. Otros investigadores confirmaron este hecho y denominaron “vitamina M” al factor deficitario en dichas dietas [67]. En 1944, estudios realizados en aves de corral alimentadas con dietas purificadas que contenían todas las vitaminas conocidas hasta el momento, encontraron un retraso en el crecimiento y el desarrollo de anemia macrocítica en las aves. Esta condición podía ser revertida únicamente por medio de la administración de una “Vitamina B_c” aislada como factor de crecimiento de ciertas bacterias [68].

La identificación y síntesis química de la vitamina fue llevada a cabo en los EEUU por el grupo de R. Stokstad, que en 1946 aisló el ácido N-[(6-pteridinil)-metil]-p-aminobenzoico de la espinaca, denominándolo ácido fólico, del latín *folium* (hoja) [69]. Desde entonces, el ácido fólico fue utilizado en la prevención y tratamiento de la anemia macrocítica en humanos. Además, se encontró que el ácido fólico suplementado en altas dosis por vía oral o intravenosa, estimulaba la producción de glóbulos rojos en pacientes con anemia perniciosa [70]; si bien, se pensó que este no podía ser el factor activo presente en los extractos concentrados de hígado que se usaban para ese tratamiento. Hacia 1948 también se encontró que los pacientes tratados con ácido fólico durante varios meses, desarrollaban degeneraciones neurológicas que respondían al tratamiento con los extractos de hígado.

Así, dos moléculas diferentes como el ácido fólico y la vitamina B₁₂ o cianocobalamina tenían la capacidad de revertir la anemia perniciosa. Pero pronto se encontró que sólo la vitamina B₁₂ prevenía el desarrollo progresivo de las complicaciones neurológicas que cursaban con degeneración de la médula espinal en los pacientes con anemia perniciosa y en los vegetarianos. Por este motivo, los suplementos de ácido fólico se vieron como un peligro potencial por enmascarar la deficiencia de vitamina B₁₂ [19].

Estudios bioquímicos posteriores llevaron al conocimiento de que la cianocobalamina tenía un papel esencial en la transferencia de grupos metilo en el ciclo de los folatos. Estos grupos metilo eran utilizados en una sucesión de ciclos para la síntesis del ADN necesario para la continua producción de células sanguíneas [70]. Otro efecto de la deficiencia conjunta de estas vitaminas es el aumento en la concentración de homocisteína (Hcy) en sangre, siendo este otro aspecto de interés dado que los individuos con altos niveles de este compuesto en sangre son más propensos al desarrollo temprano de arteriosclerosis [71]. Sin embargo, la relación causa/efecto de la elevación de Hcy y un mayor riesgo cardiovascular, no está bien establecida [72].

En la primera mitad de siglo XX, se llevaron a cabo trabajos de identificación y síntesis de las distintas formas de la vitamina para el tratamiento de la anemia. A partir de la segunda mitad y hasta nuestros días, la investigación se ha centrado en el estudio de los procesos de absorción, metabolismo y, especialmente, en las nuevas funciones potenciales de la vitamina [73]. Cabe resaltar que el conocimiento científico, si bien ha realizado grandes avances, aun dista de elucidar grandes incógnitas respecto al uso de esta vitamina y sus posibles riesgos. Por tanto, en este apartado se revisará la evidencia hasta ahora acumulada.

Definición y estructura química

En la actualidad, existe consenso para utilizar el término *folatos* al referirnos a los diversos vitámeros del complejo hidrosoluble B que presentan la actividad biológica del ácido pteroilmonoglutámico o ácido fólico, cuya molécula está constituida por un anillo de pteridina unido por un puente metileno al ácido p-aminobenzoico que, a su vez, se une por un enlace amida a un residuo de ácido glutámico [74] (**Figura 1**). Desde el punto de vista químico, el ácido fólico es la forma sintética, totalmente oxidada y más estable de la vitamina, que se utiliza en la fortificación de alimentos y en la industria farmacéutica [75]. Es la forma que se absorbe con mayor facilidad por el organismo humano al ser monoglutámica y no necesitar acción de las enzimas. Sin embargo, no se encuentra de forma natural en los alimentos. Los folatos son los vitámeros reducidos que encontramos en la naturaleza, es decir, en los alimentos, que derivan del tetrahydrofolato unido a uno o más residuos glutámicos, el 5-metiltetrahydrofolato es la forma mayoritaria [75]. En la bibliografía podemos encontrar que los términos folatos, ácido fólico, folacina y vitamina B₉ se emplean indistintamente [76], si bien en el presente trabajo utilizaremos los términos tal como los hemos definido.

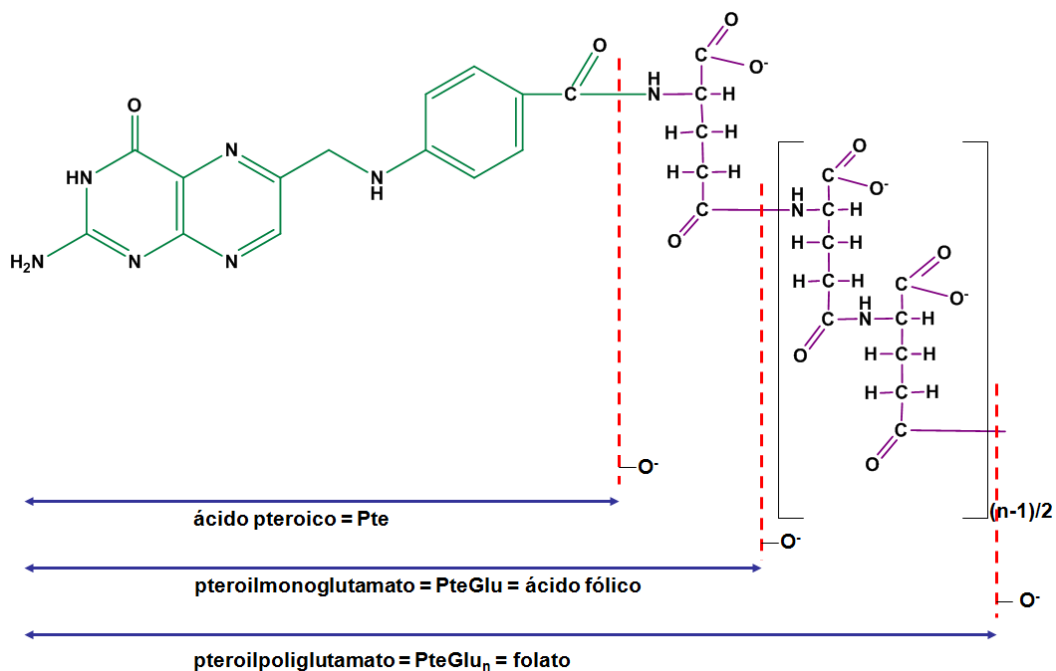


Figura 1. Estructura del ácido fólico y los poliglutamiltetrahydrofolatos.
Adaptado de Kariluoto [77]

2.3.2. Absorción, metabolismo y biodisponibilidad

Absorción y metabolismo

Los folatos de la dieta se encuentran en su mayor parte como poliglutamatos o poliglutamiltetrahydrofolatos unidos a proteínas, de las cuales son liberados por acción de las proteasas digestivas. Posteriormente, deben ser hidrolizados a monoglutamatos por una enzima deconjugasa presente en las microvellosidades intestinales [78]. A lo largo de los últimos años, en diversos estudios se ha establecido que la absorción de los folatos naturales es inferior a la de la forma sintética, debido a este paso previo de deconjugación, a los efectos de la matriz alimentaria y a la presencia de inhibidores de la deconjugasa en algunos alimentos [19, 47, 74, 79]. La absorción de los monoglutamatos tiene lugar principalmente en el intestino delgado proximal (yeyuno) por medio de un mecanismo de transporte activo, saturable, dependiente de mediador, energía y pH. Se ha visto que a altas concentraciones puede también tener lugar una difusión pasiva [80]. El ácido fólico proveniente de alimentos fortificados y suplementos puede ser reducido antes de pasar la barrera intestinal. Si bien, la dihidrofolato reductasa intestinal tiene una capacidad limitada y el ácido fólico puede atravesar intacto la barrera intestinal pasando a circulación portal [81]. Para ser utilizado a nivel celular, debe ser reducido a tetrahydrofolato (THF) por la dihidrofolato reductasa (DHFR).

En condiciones normales, el 5-metiltetrahydrofolato, folato natural mayoritario absorbido, es la única forma presente en el plasma y se transporta unido a proteínas. La asimilación por los diferentes tejidos se realiza mediante un transportador y/ o a través de proteínas ligantes de folatos [82]. El hígado constituye la “primera barrera” donde una importante proporción del ácido fólico absorbido es retirado de la circulación. En este sentido, se ha visto que dicho órgano tiene mayor afinidad por el ácido fólico que por el 5-metiltetrahydrofolato [81]. En hígado, la dihidrofolato reductasa también tiene una capacidad limitada (se ha visto que es 5 veces menor que en la rata) para metabolizar el ácido fólico, por tanto podría ser saturada con facilidad [83].

En los tejidos y células, los folatos son retenidos como poliglutamatos y sus distintos derivados pueden ser interconvertidos mediante reacciones de metilación, como la del ADN [33], y la síntesis de ciertos aminoácidos. Así, el 5-metiltetrahydrofolato, participa como cofactor en la remetilación de homocisteína a metionina, reacción donde la vitamina B₁₂ actúa como cofactor de la enzima metionina sintasa (MS). En la **Figura 2** se esquematizan estas interacciones. La metionina es un aminoácido esencial, precursor de la S-adenosilmetionina, principal donante de grupos metilo en un importante número de reacciones de metilación biológicas [61].

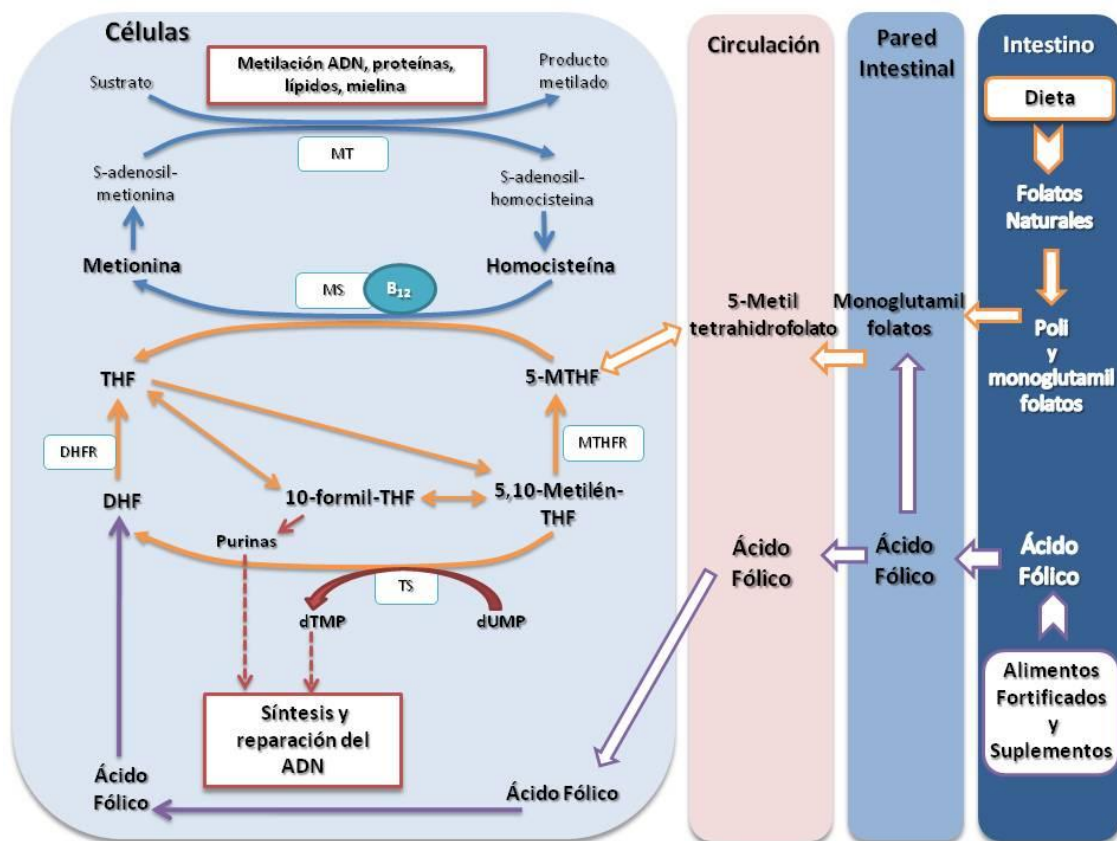


Figura 2. Esquema simplificado del metabolismo de los folatos en el organismo.
Adaptado de Scott, 2009 en: [61]

5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato; 5,10-Metilén-THF: 5,10-Metiléntetrahydrofolato; THF: tetrahydrofolato; DHF: dihydrofolato; 10-formil-THF: 10-formiltetrahydrofolato; dUMP: desoxiuridina; dTMP: desoxitimidina; MS: metionina sintasa; MT: metil transferasas; MTHFR: metiléntetrahydrofolato reductasa; DHFR: dihydrofolato reductasa; TS: timidilato sintasa.

La conversión de desoxiuridina (dUMP) a desoxitimidina (dTMP), precursor para la síntesis de ADN, es catalizada por la enzima timidilato sintasa (TS), que utiliza como cofactor otro derivado reducido de los folatos, el 5,10-metiléntetrahydrofolato (**Figura 2**). Si la ingesta de folatos es insuficiente, la

actividad del ciclo de la metilación y de la biosíntesis de ADN se verá reducida, con la consiguiente elevación de la homocisteína sérica y alteración en la división celular respectivamente [82]. La presencia de ácido fólico sin metabolizar en plasma, tras un periodo de ayuno, se considera anómala ya que como se ha comentado, la forma principal que circula en sangre es el 5-metiltetrahidrofolato.

Biodisponibilidad

La biodisponibilidad de un nutriente puede definirse como la proporción del mismo que se encuentra disponible para su utilización en funciones biológicas, y que depende de procesos pre y post-absortivos, y de factores propios del individuo (genéticos, estatus nutricional, sexo, cantidad ingerida) [47]. También se ha estudiado la biodisponibilidad de las distintas especies de folatos en sus formas naturales frente a las formas sintéticas [47]. Diferentes estudios han establecido una mayor biodisponibilidad en el hombre para el ácido fólico, dada su forma de monoglutamato que no necesita transformación para ser absorbido, frente a los folatos endógenos de los alimentos [19, 47, 74, 79].

La Academia Nacional de las Ciencias (EE UU) adoptó el término “*Equivalentes Dietarios de Folatos*” (EDF) dada la mayor biodisponibilidad del fólico sintético [19], y en las tablas de composición de alimentos de este país se presentan los datos de composición de alimentos indicando la diferencia entre folatos y ácido fólico y se calcula el valor de los EDF [84]. Además, muchos estudios de los EE UU evalúan la ingesta de folatos de la población también mediante los EDF [85]. Sin embargo, recientes estudios, utilizando las distintas formas de folatos marcadas con isótopos estables, encontraron que existe similar biodisponibilidad entre el ácido fólico y el 5-metiltetrahidrofolato [86, 87] por lo que se plantea la duda de si en el contexto global de la dieta tiene relevancia hacer esta distinción en la biodisponibilidad de las distintas procedencias de los folatos. En Europa, hasta el momento no se ha adoptado esta nomenclatura [88].

2.3.3. Fuentes de folatos y ácido fólico en los alimentos

Las principales fuentes de *folatos naturales* en los alimentos son los vegetales de hoja verde: espinaca, acelgas, coles de Bruselas, col verde y espárragos (>100 µg/100), las legumbres (33-400 µg/100 g) y los frutos secos (50-110 µg/100 g) [89-91]. Otros vegetales, hortalizas y frutas que contienen cantidades significativas son el brócoli, la coliflor, el repollo o col, la lechuga y las naranjas (50-100 µg/ración). Además, los folatos se encuentran en concentraciones elevadas en hígado (110-192 µg/100 g) y en el extracto de levadura (2300 µg/100 g), mayoritariamente como poliglutamatos [84, 91, 92]. Los alimentos que contribuyen en mayor proporción a la ingesta de folatos en la población española (hombres y mujeres de 20-39 años) son, de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario del MAGRAMA y la Fundación Española de la Nutrición (FEN) [27], las verduras y hortalizas (39%), frutas (18%) y leche y derivados (11%).

Los valores de contenido en folatos naturales por 100 g de alimento varían de acuerdo a la fuente bibliográfica consultada, tal como se comprobó en el trabajo presentado para optar al Diploma de Estudios Avanzados en 2007 [12]. Los principales factores que pueden influir en las discrepancias entre fuentes son los distintos métodos de recopilación de datos, el origen y variedad geográfica de las muestras analizadas, la metodología de muestreo y análisis, entre otras [93].

El contenido en vitaminas y su retención en los alimentos es susceptible de pérdidas o destrucción, durante los procesos tecnológicos o de cocción a los cuales se someten. Aquí entran en juego numerosos factores: la solubilidad en agua o lixiviación de las vitaminas del grupo B; que también son termo- y fotolábiles [94, 95]. Las pérdidas dependen del tipo de alimento y el proceso aplicado, y en el caso de los folatos pueden alcanzar el 100% cuando coinciden simultáneamente varias condiciones desfavorables (pH del medio, presencia de oxígeno y temperatura) [96]. Todos los folatos son además sensibles a la luz. Sin embargo, la susceptibilidad a la degradación oxidativa es mayor en las formas reducidas [97], dando lugar a compuestos biológicamente inactivos [74]. La degradación de los folatos también depende del pH, temperatura, tipo de tampón de las muestras y la presencia de

catalizadores (elementos traza) y antioxidantes. Dependiendo del pH de las soluciones, pueden darse además reacciones de interconversión entre vitámeros [97].

Si hablamos de los alimentos fortificados con ácido fólico, se ha visto que su estabilidad es elevada para distintas matrices [19, 79], es decir, esta forma sintética es resistente a diversas condiciones adversas. En el caso de los alimentos fortificados listos para consumir, tales como cereales de desayuno y galletas, estos también contienen folatos naturales, en su mayoría en forma de 5-metiltetrahidrofolato, y las pérdidas son claramente inferiores ya que no es necesario someterlos a procesos de cocción. En estos alimentos los folatos naturales suponen un 5-10% de los folatos totales ya que el ácido fólico es mayoritario. En el mercado español existe cada vez un mayor número de productos procesados con vitaminas y otros nutrientes añadidos que al ser “listos para el consumo” no van a estar expuestos a la pérdida de folatos [9].

Los datos de las Tablas de Composición de Alimentos y Bases de Datos presentan distintas nomenclaturas para los folatos (i.e. ácido fólico, folatos, folatos total) [88]. La mayor parte de las Tablas y Bases de Datos de composición de alimentos carecen de valores actualizados de los alimentos fortificados con ácido fólico [20, 98], y son justamente las herramientas básicas a partir de las cuales se realiza la evaluación de la dieta y el estatus nutricional de la población en los diversos estudios epidemiológicos. Además, el número de alimentos es limitado y los datos de composición de folatos dependen del método analítico utilizado [88].

En las Tablas de Composición de Alimentos frecuentemente utilizadas en España por ejemplo, encontramos que los datos referentes a alimentos fortificados, expresados como “ácido fólico” se obtienen del etiquetado de los productos, es decir, los declarados por el fabricante [91]. En la reciente Base de Datos Española de Composición de alimentos (BEDCA) [89] se recopilan diversas referencias bibliográficas para los distintos alimentos y los valores de folatos vienen expresados como “folatos, total”.

2.3.4. Métodos de análisis de folatos

No cabe duda de la importancia que tiene poder realizar el análisis de folatos, tanto en sus formas naturales como el ácido fólico en los alimentos, como en tejidos y muestras biológicas. En el presente apartado se revisan prioritariamente los métodos aplicados al análisis de alimentos fortificados y naturales. En la **Tabla 4** se presentan las principales características, así como ventajas y desventajas de la aplicación de cada uno. Existe variación entre los resultados obtenidos mediante los distintos métodos analíticos. Esto se ha comprobado en estudios de comparación inter-laboratorio, donde se ha visto una mayor discrepancia a concentraciones bajas y altas de folatos en los alimentos [42, 99]. El ensayo trienzimático es el método preparativo de las muestras para separar los folatos de las matrices amiláceas y proteicas del alimento. En la literatura se encuentran diversas variaciones de dicho método en cuanto a tipos de tampón de extracción, tiempos de incubación, orden de adición de enzimas, etc. [79].

La cuantificación de folatos para la obtención de los “folatos totales”, es decir, la suma de vitámeros contenidos en el extracto, puede realizarse mediante métodos microbiológicos [100] o enzimáticos con proteínas ligando en placas [79]. Son métodos rápidos, simples y eficaces dependiendo de las matrices utilizadas y los objetivos del estudio. Sin embargo, en muchos casos interesa conocer de forma individualizada el contenido en ácido fólico y de los diferentes vitámeros naturales en los alimentos, siendo ésta la principal limitación de los citados métodos.

La cromatografía de afinidad con proteína ligando de folatos (PLF) es un método de concentración y purificación de muestras que permite posteriormente identificar y cuantificar los vitámeros de los folatos de forma independiente [76]. Si bien se ha comprobado su eficacia tanto en alimentos [101] como en muestras biológicas [76], su utilización en el laboratorio conlleva su aislamiento a partir de concentrado de proteínas lácteas, al no estar disponible de forma comercial en las cantidades necesarias para su uso [101]. La alternativa a la utilización de la PLF es la extracción en fase sólida mediante el uso de cartuchos de intercambio aniónico, disponibles de forma comercial [79].

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección por ultravioleta (UV), diodo-array (DAD) o fluorescencia se ha utilizado ampliamente en la separación y cuantificación de ácido fólico y de los vitámeros de folatos [101-103]. Más recientemente, la cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) al tener mayor sensibilidad y especificidad, ha sido recomendada en un Informe publicado en 2009 por la Agencia de Estándares Alimentarios del Reino Unido (FSA, siglas del inglés *Food Standards Agency*) [10] como método de referencia, tanto en alimentos como en muestras biológicas. Sin embargo, cuando la evaluación coste-beneficio no lo permita, recomienda el ensayo microbiológico que incluya el análisis de estándares internacionales de referencia y que aplique métodos adecuados para el control de calidad de los ensayos.

Tabla 4. Revisión de los principales métodos analíticos de folatos y ácido fólico en alimentos.

Método	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Alimentos
Extracción Trienzimática	Pre-tratamiento de la muestra incubando con 3 enzimas [104] Necesario en la mayoría de análisis con independencia del método de detección.	Libera folatos atrapados por matriz alimento y deconjugua los poliglutamatos. Aumenta porcentaje de folatos recuperables	Pérdida de formas lábiles Elevado tiempo consumido	De origen cereal [101], Lácteos y derivados [105] Legumbres y vegetales[106].
Ensayo Microbiológico	Cuantificación crecimiento del microorganismo dependiente de la concentración de folatos [100]	Económico Viable en laboratorio Sensibilidad optima [10]	No diferencia vitámeros Material estéril en el caso de la cepa ATCC 7469	Harinas fortificadas [107] Cereales de desayuno fortificados [108]
Ensayo enzimático de proteína ligando (EPBA) o competitivo (RPBA)	Determinación de la actividad enzimática midiendo la conversión de sustrato en producto. Competición entre folatos marcados de kit comercial con los folatos de la muestra [79]	Kits comerciales disponibles Viable en laboratorio	No diferencia vitámeros Diversa afinidad de vitámeros a la proteína ligando Menor reproducibilidad y sensibilidad	De origen cereal, fortificados [109]
Cromatografía de afinidad con proteína ligando de folatos (PLF) - cromatografía líquida del alta eficacia (HPLC)	Purificación extractos mediante proteína (PLF) que por afinidad bio-específica une diversos vitámeros de folatos [76] Detección por UV, DAD o Fluorescencia	Identificación vitámeros especificidad y sensibilidad [76]	PLF comercial de elevado precio Diversa afinidad de los vitámeros	De origen cereal, fortificados [101]
Extracción en fase solida acoplada a HPLC (SAX-HPLC)	Purificación extractos en columnas con fases que interaccionan reteniendo el analito en función de sus propiedades químicas [79]. Detección por UV, DAD, Fluorescencia o LC-MS-MS.	Columnas comerciales de diversos formatos disponibles	Insuficiente especificidad/sensibilidad	Lácteos y zumos fortificados [102] Tomates [110] Vegetales [103]
Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS)		Identificación vitámeros Mayor especificidad y sensibilidad [10]	Alto precio Equipos Personal cualificado	Harinas fortificadas [111]

2.4. De las funciones clásicas del ácido fólico a la promoción de la salud

2.4.1. Funciones “clásicas”

La deficiencia severa de folatos produce un tipo específico de anemia denominada megaloblástica y macrocítica. Esta afección puede deberse también al déficit en vitamina B₁₂ y otras causas como leucemia, mielofibrosis, ciertos trastornos hereditarios o medicamentos que afectan a la síntesis del ADN [73]. En situación de deficiencia, existe un deterioro general de la división celular relacionada con el papel de los folatos en la síntesis de ácidos nucleicos, el cual repercute especialmente en células de división rápida como las del sistema hematopoyético. Si la anemia se instaura de forma crónica, aparecen de forma progresiva signos generales, como astenia y anorexia, y neuropsiquiátricos como trastornos del sueño y la memoria, irritabilidad y convulsiones. En casos más avanzados se puede producir neuropatía periférica, depresión y demencia [112].

De acuerdo con los resultados del estudio realizado por Ganji y col. [113] sobre la población adulta (n=26.596) de la Encuesta Nacional de Examen Salud y Nutrición de los EE UU (NHANES, siglas del inglés, *National Health and Nutrition Examination Surveys*), la prevalencia de anemia ha disminuido significativamente en las mujeres en la era post-fortificación obligatoria con ácido fólico (1999-2004) con respecto a la pre-fortificación (1988-1994), lo cual puede atribuirse entre otras causas a la mejora en el estatus de folatos y el uso de suplementos vitamínicos y minerales. Se desconoce el motivo por el cual esta disminución no se observó en hombres y personas mayores, aunque en estas poblaciones sí se observó un aumento del volumen corpuscular medio, efecto que los autores asocian a una posible deficiencia en B₁₂ [113].

2.4.2. Papel en la prevención de los defectos del tubo neural

Los defectos del tubo neural (DTN) son un conjunto de malformaciones incapacitantes y muchas veces incompatibles con la vida, resultantes del cierre inadecuado del tubo neural, siendo la espina bífida y la anencefalia las manifestaciones más comunes [114]. Estudios epidemiológicos han demostrado que los factores medioambientales asociados a periodos de escasez y hambre, incrementaban la prevalencia de estos defectos [82]. La reducción del riesgo de DTN mediante suplementación con ácido fólico ha sido confirmada mediante ensayos de intervención controlada [115], aunque el mecanismo subyacente no es aún bien conocido.

Se ha demostrado el efecto protector de la suplementación periconcepcional con ácido fólico, es decir, durante la fase de desarrollo embrionario coincidente con el cierre del tubo neural, aproximadamente en la cuarta semana de gestación [19]. En consecuencia, las autoridades sanitarias, tanto a nivel europeo como en EEUU, han establecido recomendaciones para que todas las mujeres en edad fértil o que pretendan quedarse embarazadas consuman 400 µg de ácido fólico/ día, adicionales a los folatos procedentes de una dieta variada [19, 116]. Sin embargo, el hecho de que aproximadamente un 50% de los embarazos no son planificados y de que la suplementación con ácido fólico pueda prevenir hasta en un 70% la incidencia de DTN en recién nacidos [5, 21], suscitó en varios países la necesidad de implementar políticas de fortificación con esta vitamina. Las autoridades estadounidenses implantaron, a partir de 1998, la fortificación obligatoria con ácido fólico de los alimentos derivados de cereales [19]. Mediante esta estrategia se pretendía asegurar que todas las mujeres en edad fértil aumentaran su ingesta en aproximadamente 130-170 µg de fólico al día.

Para la población española, las recomendaciones dirigidas a las mujeres embarazadas (primera y segunda mitad de la gestación) y para las que se encuentran en periodo de lactancia las se incrementan desde los 400 µg de ácido fólico de las mujeres en edad fértil a 600 µg y 500 µg de ácido fólico al día respectivamente [23].

2.4.3. Metabolismo de la homocisteína y enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen el grupo de enfermedades crónico-degenerativas con mayor prevalencia en los países desarrollados de acuerdo a los datos de la OMS [117]. Estudios observacionales apuntan a que las concentraciones elevadas e incluso moderadas de homocisteína en plasma son un factor de riesgo independiente y modificable para dichas enfermedades [118-120]. Se desconoce su mecanismo de acción y por tanto si la homocisteína es el determinante de estas patologías vasculares o sólo un marcador de las mismas [121].

Los folatos, en forma de 5-metil-tetrahidrofolato, actúan como co-sustrato necesario en la conversión de la homocisteína en metionina mediante la metionina sintasa. Por tanto, una deficiencia en folatos resulta en un incremento de las concentraciones séricas de homocisteína [82]. Se ha sugerido que alrededor de dos tercios de la prevalencia de hiperhomocisteinemia puede ser debida a niveles dietéticos insuficientes de folatos y/o de las vitaminas B₆ y B₁₂, implicadas en el ciclo de la metionina [122], pero existen también factores de tipo genético, hormonal, metabólicos o tóxicos asociados a este incremento [71].

Los meta-análisis realizados por Bazzano y cols. [123] y Miller y cols. [124], de ensayos clínicos publicados desde 1966 apuntan a que la suplementación con fólico no ha demostrado reducir el riesgo de mortalidad por ECV o infarto en individuos con historia previa de enfermedad vascular [123], es más, sugieren que incluso sería de riesgo en pacientes con niveles base elevados de homocisteína [124] ya que el ácido fólico estimula la proliferación celular y podría promover la progresión de la arteriosclerosis. No obstante, la evidencia disponible hasta el momento indica que los suplementos con ácido fólico pero también la fortificación de los alimentos, como medida de prevención primaria de la ECV, pueden disminuir las concentraciones de homocisteína plasmática en la población sin historia previa de patología vascular [31, 71, 121, 125].

2.4.4. Prevención potencial del desarrollo de neoplasias

Uno de los aspectos más estudiados de las funciones potenciales de los folatos y el ácido fólico es la relación inversa, observada en diversos estudios epidemiológicos, entre el estatus en folatos y el riesgo de cáncer [126]. El papel de los folatos como agentes preventivos podría explicarse por su función en la síntesis y replicación del ADN [33]. La deficiencia en folatos en los tejidos con rápida división celular podría dar lugar a una síntesis de ADN inadecuada, y es ésta la razón por la que la quimioterapia utilizada en el tratamiento del cáncer, hace uso de fármacos antifolato. En las células neoplásicas la división ocurre de forma acelerada, por lo que una deficiencia de folatos podría inhibir su crecimiento y el desarrollo tumoral, mientras que la suplementación la potenciaría, esto se ha observado en modelos animales con neoplasias pre-existentes [127]. En estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales se ha visto que en los tejidos sanos o normales, la deficiencia en folatos parece por el contrario predisponer a la aparición de tumores y la suplementación suprime y/o previene el desarrollo de los mismos [128].

El papel de los folatos ha sido ampliamente estudiado en relación al cáncer colorectal [32, 33, 126, 129, 130], y entre las conclusiones más significativas que se extraen de los modelos animales, se ha visto que la dosis de folatos y el momento de la intervención son críticas para la prevención. Nuestro grupo de investigación viene trabajando igualmente en esta línea de investigación, fundamentalmente en lo que se refiere al estado en la mucosa colónica dañada de marcadores del metabolismo de la metionina/metilación, e igualmente en la validación de éstos a nivel sistémico, ya que podrían reflejar el estado en el colon [129, 131].

Si la intervención de suplementación con folatos se inicia antes del establecimiento de la neoplasia en intestino, ésta suprime el desarrollo del cáncer, y a la inversa, si se inicia después de la aparición al parecer se observa el efecto contrario. Esta dualidad beneficio/ riesgo, no exenta de controversia, ha sido revisada por numerosos autores y organismos oficiales, ya que los estudios no son concluyentes [42, 61, 132]. Datos de la OMS publicados en 2008, indican

que el cáncer colorectal presenta una elevada incidencia y mortalidad en los países desarrollados (Europa ocupa el tercer lugar) [133]. Además, un elevado porcentaje de la población europea puede presentar neoplasias malignas no diagnosticadas [133].

2.4.5. Posible influencia en el mantenimiento de la función neurocognitiva y en enfermedades neurodegenerativas

El ácido fólico juega un papel esencial en la neuroplasticidad y el mantenimiento de la integridad neuronal [73]. Las alteraciones en el ciclo de regeneración de la homocisteína a metionina, de la cual es cofactor, pueden dar lugar a daño del ADN, incorporación errónea de uracilo, así como a patrones de metilación del ADN anómalos [73]. El bajo estatus en folatos que puede derivar en elevadas concentraciones de homocisteína aumenta también la generación de especies reactivas de oxígeno y contribuye a disfunciones mitocondriales que pueden llevar a apoptosis celular [134]. Existe suficiente evidencia experimental y epidemiológica que relaciona estos sucesos con enfermedades cerebrovasculares, neurodegenerativas y neuropsiquiátricas tales como la isquemia cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y depresión, entre otras [128, 135] aunque no existe evidencia científica suficiente que permita afirmar que las dichas enfermedades neurodegenerativas se pueden prevenir a través de la ingesta de ácido fólico. Estas enfermedades representan la tercera causa de enfermedad en Europa, de acuerdo con los datos de la OMS [117]. Si bien la evidencia procedente de ensayos clínicos es escasa, la suplementación con vitaminas del grupo B y la reducción de la homocisteína podrían influir en la prevención primaria de infartos cerebrales y demencia y, a su vez, como complemento a los fármacos antidepresivos [136].

2.4.6. Recomendaciones dietéticas de folatos

Los requerimientos de ácido fólico para mantener un correcto estatus nutricional de folatos han sido establecidos y revisados en varias ocasiones, tal como se describirá a continuación [19]. Sin embargo, no existen recomendaciones de niveles más elevados para la prevención de enfermedades, a excepción de los DTN, mientras no se establezca claramente una relación causa/ efecto [59].

Las Ingestas Recomendadas (IR), que constituyen la base científica para las recomendaciones de energía y nutrientes dirigidas a la población norteamericana (EEUU y Canadá), se establecieron por primera vez en 1941. Posteriormente, en 1993, el Panel de Alimentación y Nutrición (*Food and Nutrition Board*, FNB, EE UU) inicia una revisión de estas recomendaciones, que culminó con la publicación de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR), con objeto de remplazar a las IR. Las llamadas IDR abarcan una serie de valores de referencia de nutrientes para la población sana, teniendo cada uno de ellos un uso determinado y que se refieren a la ingesta media diaria del individuo durante un periodo de tiempo [19]. Las IDR se categorizan de la siguiente forma:

- Ingesta Recomendada (IR): nivel de ingesta dietética diaria media suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de aproximadamente el 97,5% de la población, para un grupo de edad y sexo. Se calcula a partir del Requerimiento Medio Estimado (RME).
- Requerimiento medio estimado (RME): cantidad media de un nutriente que se necesita para cubrir las necesidades del 50% de la población.
- Ingesta Adecuada (IA): Se define como la cantidad media de nutriente consumida por grupos de población sanos que no muestran evidencias de insuficiencia del nutriente. En ausencia de datos para establecer el RME, se toma como ingesta de referencia la IA en lugar de la IR.
- Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT): es el nivel más alto de ingesta diaria de un nutriente que no se asocia a efectos negativos para la salud de la mayoría de la población.

En la **Figura 3** se representan de forma gráfica los componentes de las IDR, donde el RME corresponde al nivel de ingesta donde el riesgo de que ésta sea inadecuada para un individuo se aproxima al 50%. En el nivel de las IR el riesgo es bajo, del 2 al 3%, y en los niveles de ingesta entre las IR y el NMT, el riesgo tanto de insuficiencia como de exceso es cercano a cero. Por último, en niveles superiores al NMT el riesgo de efectos adversos puede incrementarse. Debe considerarse que estos niveles de referencia han sido establecidos para adultos jóvenes y personas mayores y, en el caso de los niños, los valores son extrapolados en función del peso corporal medio para cada rango de edad (**Tabla 5**).

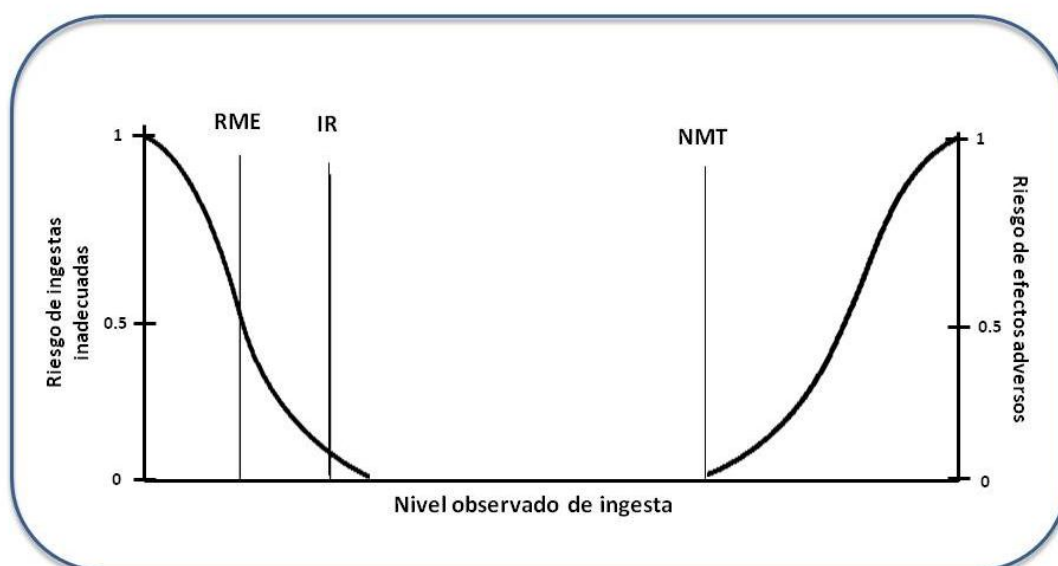


Figura 3. Interpretación de las Ingestas Dietéticas de Referencia.

Adaptado de [19].

En las IDR de folatos para la población norteamericana, donde la fortificación con ácido fólico de alimentos de origen cereal es obligatoria desde 1998, las recomendaciones se establecen mediante los Equivalentes Dietarios de Folatos (EDF) (**Tabla 5, Ecuación 1**) [19], concepto que tiene en cuenta la mayor biodisponibilidad teórica del ácido fólico sintético frente a los folatos naturales de los alimentos [137].

[Ecuación 1]. Cálculo de los Equivalentes Dietarios de Folatos (EDF)

$$\mu\text{g EDF} = \mu\text{g Folatos Naturales} + (1,7 \times \mu\text{g ácido fólico})$$

Hay que resaltar que el NMT se expresa en μg de ácido fólico/ día, debido a que sólo se han observado los efectos adversos (enmascaramiento de la deficiencia en vitamina B₁₂) con la ingesta excesiva de la forma sintética de la vitamina. Concretamente, en adultos, el nivel más bajo para el cual se observaron efectos adversos fue de 5.000 μg / día [19, 78]. Así, el NMT de ingesta de ácido fólico para adultos se ha establecido en 1.000 μg /día, y ha sido calculado aplicando un factor de seguridad de 5 sobre el nivel más bajo para el que se observaron los efectos adversos (5000/5) [19].

Las IDR o Ingestas Recomendadas (IR) para la población española (**Tabla 5**), donde la fortificación de alimentos es voluntaria, se expresan en μg de ácido fólico/ día [138]. En cuanto a los NMT de ingesta para la población europea, fueron establecidos en el año 2000 por el Comité Científico de la Comisión Europea, presentando valores similares a los recomendados para la población estadounidense (**Tabla 5**) [78]. A nivel europeo, la Autoridad de Seguridad Alimentaria (EFSA) se encarga en la actualidad de revisar la evidencia científica de los efectos potenciales beneficiosos y adversos de los nutrientes, para poder así establecer relaciones y asesorar sobre el nivel de ingesta de los mismos y los efectos relacionados con la salud. El papel de la EFSA en materia de asesoramiento para el etiquetado nutricional y de alegaciones de salud es de gran importancia. Un documento de opinión presentado por el Panel sobre Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias (*Dietetic Products, Nutrition, and Allergies*, EFSA, 2010) recoge los Valores Dietéticos de Referencia (*Dietary Reference Values, DRVs*) [139], cuyas definiciones van en concordancia con las establecidos por el FNB para la población Estadounidense [19].

En materia de evaluación y armonización de las recomendaciones de micronutrientes a nivel europeo, cabe señalar igualmente el trabajo de la red de excelencia EURRECA (*EUROpean micronutrient RECommendations Aligned*), en colaboración con la EFSA y el Proyecto EuroFIR, con interés especial en los grupos vulnerables de población [140]. Existe una Base de Datos interactiva y disponible on-line, que recopila las recomendaciones de referencia de

micronutrientes de más de 37 países y permite la comparación entre las mismas [141]. Las recomendaciones de ingesta de ácido fólico recopiladas para el caso de España son las publicadas por Moreiras y cols. [138] y se utilizan como referencia en el presente trabajo.

Tabla 5. *Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR), Ingestas Recomendadas (IR) y Niveles Máximos Tolerables (NMT) de Ingesta: valores para EE UU-Canadá y España.*

	EE UU y Canadá		España	Europa
Edad	IDR (μg EDF/día)	NMT (μg ácido fólico/día) ^b	IR (μg ácido fólico/día)	NMT (μg ácido fólico/día)
Bebés (meses)				
0 a 6	65 ^a	ND ^c	40	ND ^c
6 a 12	80 ^a	ND	60	ND
Niños y niñas (años)				
1 a 3	150	300	100	200
4 a 8	200	400	200	300
Hombres (años)				
9 a 13	300	600	300	400
14 a 18	400	800	400	600-800
19 a \geq 70	400	1000	400	1000
Mujeres (años)				
9 a 13	300	600	300	400
14 a 18	400	800	400	600-800
19 a \geq 70	400	1000	400	1000
Gestación	600	1000	600	1000
Lactancia	500	1000	500	1000

IDR: Ingestas dietéticas de referencia; IR: Ingestas recomendadas; EDF: Equivalentes Dietarios de Folatos; NMT: Nivel máximo tolerable de ingesta.^a IA: Ingesta Adecuada. ^b Los NMT se aplican a las formas sintéticas ingeridas en forma de suplementos y/ o alimentos fortificados. ^c ND: no determinada por falta de datos de efectos adversos en este grupo de edad.

Adaptado de [78, 137, 138].

2.5. Riesgos potenciales asociados a la ingesta excesiva

a. Estatus en vitamina B₁₂, anemia, función neurocognitiva y psiquiátrica

En la actualidad se sabe que un elevado nivel de ingesta de ácido fólico a través de la dieta habitual puede derivar en el enmascaramiento de los signos hematológicos de la deficiencia en vitamina B₁₂, resultando en un diagnóstico erróneo y una posible degeneración de la médula espinal. Tras la implantación de las políticas de fortificación obligatoria se ha visto que es muy raro que esto suceda en la población, quedándose en una mera “hipótesis metabólica” que se explica por la implicación de ambas vitaminas en el ciclo de la metilación [42]. Por otro lado, se plantea la compleja problemática que tal como se expuso en el **Apartado 2.4**, constituye la deficiencia en folatos para distintos grupos de población. Sin embargo, de acuerdo con Smith y cols. [112], lo que preocupa en la actualidad es si las concentraciones elevadas de folatos durante un periodo prolongado pueden llevar a efectos deletéreos en individuos con estatus inadecuado o bajo en B₁₂. En teoría, el exceso de ácido fólico en estos individuos podría dar lugar a la normal síntesis de ácidos nucleicos que a su vez permitiría la continuidad de la división celular en la médula espinal y la producción normal de glóbulos rojos. Como consecuencia, disminuiría el potencial de metilación dada la demanda de las células en división, en detrimento de aquellas células que no sufren división como las del sistema nervioso [112].

En EE UU se han descrito efectos perjudiciales de las elevadas concentraciones de folatos en sangre, derivados de la exposición a la fortificación obligatoria [128]. Se ha visto en un estudio transversal que en personas mayores con bajo estatus en B₁₂ y normal de folatos, el riesgo de deterioro cognitivo aumentaba en un 70%, mientras que aquellos con altos niveles de folatos y bajos de B₁₂ tenían un riesgo aún mayor de deterioro y de anemia que los individuos con niveles de folatos y B₁₂ normales [73]. Por tanto, parece ser que el exceso de fólico sólo constituye un riesgo potencial en aquellos con estatus inadecuado de B₁₂ [128].

b. Folatos y Cáncer

Como se ha expuesto anteriormente, los folatos actúan como cofactores necesarios para la metilación del ADN y son esenciales como donantes de unidades de carbono en la síntesis *de novo* de nucleótidos [130]. Por otro lado, la metilación del ADN constituye un complejo fenómeno epigenético capaz de regular la expresión génica y el mantenimiento de la integridad y estabilidad genómica [142]. Si bien la carcinogénesis está relacionada con una hipometilación global, se ha visto que la hipermetilación de genes específicos (genes supresores de tumores), podría estar implicada en la etiología del cáncer [129] [143].

La evidencia científica que relaciona la ingesta de folatos con el desarrollo de cáncer es contradictoria: se ha postulado un efecto “dual” del ácido fólico, de forma que ingestas elevadas de la forma sintética de la vitamina podrían promover el crecimiento de lesiones neoplásicas malignas pre-existentes, y por el contrario a bajos niveles se podría prevenir la aparición de las mismas [126].

El consumo de ácido fólico podría influir las rutas bioquímicas que promueven la carcinogénesis de forma muy diferente a los folatos naturales, ya que en ningún caso se ha visto que el consumo elevado de folatos a partir de una dieta no fortificada aumente el riesgo de cáncer, sino por el contrario podría reducirlo [144]. Mason y cols. [145] analizaron la tendencia temporal de la incidencia de cáncer colorectal en EE UU y Canadá tras la implantación de la fortificación obligatoria, encontrando un aumento de la incidencia tras décadas de tendencia a la baja. Si bien únicamente hipotetizan acerca de la relación causa-efecto entre ambos sucesos, los autores resaltan la importancia de la monitorización a largo plazo de los programas de fortificación, más aun teniendo en cuenta que el consumo de suplementos farmacológicos con ácido fólico también ha aumentado en los últimos años en estas poblaciones [145]. También en Chile se comparó la incidencia previa y tras la implantación de la fortificación obligatoria, observándose un aumento del riesgo de padecer cáncer colorectal en el grupo entre 45 y 79 años (ratio 2,6, intervalo de confianza del 99%, 2,93–

2,58) [32]. Por el contrario, otros estudios en población americana han encontrado que elevados niveles de folatos provenientes de suplementos y de la fortificación no están asociados a un aumento en el riesgo de este tipo de cáncer [144].

c. Presencia de ácido fólico no metabolizado en la circulación

En los últimos años, se ha planteado el peligro potencial podrían suponer las concentraciones de ácido fólico sin metabolizar en plasma [146], aunque poco se conoce acerca de los efectos biológicos resultantes. En las poblaciones de países que presentan la fortificación obligatoria con esta vitamina, como son los EE UU, se han observado niveles elevados de ácido fólico sin metabolizar en hasta un 40% de la población adulta (≥ 60 años), encontrándose los niveles más significativos en los usuarios de suplementos vitamínicos que a su vez presentaban los niveles más altos de ingesta de fólico a través de los alimentos [56]. También se ha estudiado la presencia en plasma de ácido fólico en países únicamente expuestos a la fortificación voluntaria como Irlanda, donde estudios del grupo de John Scott han señalado la presencia de concentraciones de ácido fólico sin metabolizar y su persistencia en el plasma en ayunas de mujeres que recientemente habían dado a luz y en sangre extraída del cordón umbilical de los recién nacidos [147]. En otro estudio en Irlanda, un seguimiento a largo plazo en humanos que consumían pan fortificado con diversas dosis de ácido fólico, encontró que a partir de la ingesta de 400 μg /día, éste aparece sin metabolizar en plasma después de un periodo de 14 semanas de consumo diario de esta cantidad, adicional a los folatos naturales ingeridos a través de la dieta [52].

d. Alteraciones en la función inmunológica

Las células "*Natural Killer*" (NK) forman parte de la respuesta inmune inespecífica del organismo y pueden destruir una variedad de células normales o infectadas por virus. Además, existe evidencia de que las NK juegan un papel en la destrucción de células tumorales, actuando a modo de primera línea de defensa contra la carcinogénesis [128, 148]. La citotoxicidad de las células NK se utiliza como índice de un correcto estado de la función inmune. En mujeres postmenopáusicas se observó una relación inversa entre la ingesta de folatos y la

función inmune: entre aquellas que tenían ingestas elevadas de folatos y tomaban suplementos, había una mayor reducción en la citotoxicidad de las NK; asimismo, el 78% de ellas presentaba en ayunas niveles de ácido fólico sin metabolizar en plasma, que corroboraba el exceso en la ingesta [148]. Troen y cols. sugirieron que éste sería otro mecanismo por el cual el exceso de ácido fólico en la dieta podría promover el desarrollo de las lesiones pre-malignas y malignas [148]. Si bien se desconoce el mecanismo de acción asociado, existen estudios que sugieren que el exceso de folatos en la ingesta puede dar lugar a condiciones bioquímicas similares a las que acontecen en la deficiencia [55, 149].

e. Interacciones farmacológicas.

Los fármacos diseñados para interferir con las enzimas de las rutas metabólicas de los folatos se utilizan para el tratamiento del cáncer, la artritis reumatoide, infecciones bacterianas, malaria, psoriasis y embarazos ectópicos [150]; por este motivo, se ha postulado que el aumento en el estatus en folatos del individuo podría modificar la eficacia de los antifolatos [128]. La posible disminución de la eficacia de los antagonistas de folatos utilizados en quimioterapia como el metrotexato, se podría deber a que niveles elevados de ácido fólico facilitarían el desarrollo de la resistencia a estos fármacos [151]. A su vez, se ha visto que el metrotexato utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide y la psoriasis, disminuye su eficacia en los pacientes que recibían suplementación con ácido fólico [128]. Se han descrito igualmente efectos neurotóxicos y epileptogénicos del ácido fólico al interferir con la acción de los fármacos anticonvulsivantes [152], una interferencia en la absorción y estatus en zinc [150] y alteración en la utilización metabólica de la proteína dietética en animales de experimentación [153].

Tabla 6. Beneficios y riesgos potenciales de la ingesta de ácido fólico en distintos grupos de población.

Efecto en la salud del ácido fólico y/o los folatos	Grupo de Población	Tipo de datos	Nivel de evidencia	Referencias
Beneficios				
Prevención Defectos del Tubo Neural	Mujeres en edad periconcepcional	Estudios en humanos	Suficiente	MRC Medical Research Group Vitamin Study, 1991[21] Czeizel y Dudas, 1992 [5]
Reducción riesgo nacimiento prematuro	Mujeres embarazadas	Estudios en humanos	Insuficiente	Czeizel y cols., 2009 [154]
Anemia megaloblástica (por deficiencia de folatos)	Individuos con ingesta insuficiente y/o estatus inadecuado de folatos	Estudios en humanos	Suficiente	Wills, 1931 [66] Ganji y cols., 2009 [113]
Reducción de la homocisteína plasmática	Población general	Estudios en humanos y animales	Insuficiente	Selhub y cols., 2006 [121] Varela-Moreiras y cols., SENECA Study, 2007 [25] Hoey y cols., 2007 [53]
Cáncer colorectal: prevención	Población general	Estudios en humanos Meta-análisis	Insuficiente	Kim, 2006 [126] Van Guelpen y cols., 2006 [155] Eussen y cols., EPIC Study, 2010 [156]
Función cognitiva: prevención declive	Personas mayores	Estudios en humanos	Insuficiente	Morris y cols., 2007 y 2010 [73, 146]
Riesgos				
Enmascaramiento deficiencia vitamina B₁₂	Individuos con riesgo de deficiencia en la ingesta de vitamina B ₁₂ (edad avanzada, vegetarianos estrictos)	Estudios en humanos	Suficiente	Institute of Medicine, IOM, 1998 [19] Scientific Committee on Food, 2000 [78] Mills y cols., 2003 [157]
Cáncer colorectal: promoción	Totalidad de la Población	Estudios en humanos	Insuficiente	Kim y cols., 2004 [143] Cole y cols., 2007 [158] Hirsch y cols., 2009 [32]
	Individuos con lesiones neoplásicas pre-existentes o lesiones no diagnosticadas	Estudios en humanos y animales	Insuficiente	Kotsopoulos y cols., 2005 [159] Kim, 2006 [126]
Ácido fólico sin metabolizar en plasma y alteración de la función Inmune	Totalidad de la población Mujeres postmenopáusicas	Estudios en humanos	Insuficiente	Troen y cols., 2006 [148]
Deterioro neurocognitivo y Depresión	Personas mayores	Estudios en humanos y animales	Insuficiente	Morris y cols., 2007 [73]
Interacciones fármacos	Pacientes quimioterapia, artritis reumatoide	Estudios en humanos y animales	Suficiente	Smith 2008 [128]

3. Datos de consumo alimentario

En Europa se ha evaluado el impacto de la fortificación voluntaria en los niveles de ingesta superiores (ingesta en el percentil 90 ó 95), para la mayoría de nutrientes, y se ha encontrado que su influencia es baja debido bien a un consumo limitado de estos alimentos o a una baja cuota de mercado; aun así, los autores previenen que los datos de ingesta de los alimentos fortificados son muy limitados para la mayoría de países [163]. Dada la existencia de un considerable número de alimentos fortificados con ácido fólico y otros nutrientes [164], los estudios que evalúan la ingesta actual de alimentos fortificados en España cobran importancia aunque son aún limitados. Un estudio publicado por la Fundación Española de la Nutrición (FEN) en colaboración con el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), evalúa el consumo de alimentos fortificados y enriquecidos [16] utilizando los datos de composición de los alimentos declarados por los fabricantes en el etiquetado. Entre los resultados más relevantes, se ha visto que el consumo de productos fortificados ha aumentado progresivamente desde el año 2000 al 2005. Las leches enriquecidas y/o fortificadas son los alimentos consumidos en mayor cantidad en el año 2005 (49,61 g/persona y día), seguidas por los yogures enriquecidos y/o fortificados (14,22 g/persona y día). Los estratos sociales alto y medio-alto dado su poder adquisitivo realizan consumos superiores de alimentos fortificados. El tamaño del hábitat >500.000 habitantes está relacionado con un mayor consumo, se desconoce si la mayor disponibilidad de estos productos o las creencias en los beneficios de su ingesta son determinantes. El consumo de alimentos fortificados y enriquecidos también aumenta al hacerlo la edad del responsable de realizar las compras, excepto en el caso de los zumos y los batidos de zumo y leche [16].

Para la evaluación de la dieta habitual de la población española, contamos con estudios de los cuales se derivan los datos de ingesta de folatos. Los Datos del Panel de Consumo Alimentario del MAGRAMA que conjuntamente con la FEN evaluaron la calidad de la dieta de los españoles [21], indican que la dieta española media no aporta más del 50% de las IR de folatos, tanto en mujeres como en hombres adultos. Es importante indicar que en este estudio se utilizan datos de disponibilidad de alimentos, por lo que podrían existir incluso sobre-estimaciones en determinados grupos de población. En la **Tabla 7** se recogen algunos de los principales estudios que evalúan el consumo de alimentos y estatus nutricional de la población española.

Tabla 7. Revisión de Estudios de Consumo de Alimentos en la población Europea y Española.

Nombre y tipo de Estudio	Año	Población (n)	Nivel	Métodos de valoración de la Ingesta	Ingesta media folatos ^a (µg/día)		Autores y Referencias
					R24h	CFCA	
Estudio ENUCAM	2009	N=1553 H/M, >18, ≥65	Comunidad de Madrid	Recuerdo de 24 horas CFCA, Encuesta de salud y hábitos, consumo suplementos	H: 233,2 ± 141,8 M: 234,9 ± 125,1	H: 338,7 ± 148 M: 341,6 ± 143,2	Ruiz-Moreno y cols. [3]
Valoración dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario	2007-2008	N= 8000 hogares H/M,	Nacional	Compra de alimentos en el hogar, encuestas telefónicas	234		Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [27] [28]
Proyecto HELENA Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence (Transversal)	Resultados hasta 2006	N=170 13-16 años	Europeo	R24h auto-administrado	No disponible		De Henaau y cols. [160]
Calidad Nutricional de Mujeres Gestantes (Transversal)	2002-2003	N=103, 19-40 años	Islas Canarias	CFCA	419 ± 159,6 (156,6 – 660,6)		Ortiz-Andrelluchi y cols. [161]
Estudio enKid (Transversal)	1998-2000	N = 3534 H/M, 2-24 años	Nacional	Recuerdo de 24 horas CFCA, Encuesta de hábitos	H: 161,6 ± 42,4 (96,9-232,6) M: 144,9 ± 32,9 (92,7-199,2)		Aranceta Bartrina y cols. [2, 162]
Risk of inadequate intakes of vitamins, Iron and Calcium in the Spanish population aged 4 to 18 (Meta-análisis)	1990-1999	N= 6540 H/M, 4-18 años	Nacional	Recuerdo de 24 horas CFCA, Encuesta de hábitos	H: 4-12 a: 202,8; H: 13-18 a: 249,6 M: 4-12 a: 193,8; H 13-18 a: 210,7		Serra-Majem y cols. [163]
Euronut-SENECA (Longitudinal)	1988-1989 hasta 1998 10 años de seguimiento	Basal N= 2100 Final N= 1072 80-85 años	Europeo	Registro de 3 días CFCA	H, 71-76 a: 217 ± 90 H, 75-80 a: 242 ± 81 M, 71-76 a: 238 ± 111 M 75-80 a: 217 ± 100		Varela Moreiras y cols. [25] Del Pozo y cols. [164]
Proyecto EPIC, European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, Cohorte Española (Prospectivo)	1992-1996	N= 41.440 30-69 años	Asturias, Guipúzcoa, Navarra Granada Murcia	Cuestionarios dietéticos auto administrados de 350 ítems, cuestionarios dietéticos mediante entrevistas CFCA	No disponible		Grupo EPIC, Margetts y cols. [165]
SUN, Seguimiento Universidad de Navarra (Cohorte dinámica abierta)	Seguimiento cada años Reclutamiento desde 1999	N= 9670	Navarra	CFCA	H: 302.8 ± 17,8 - 608,3 ± 150,2 M: 239,1 ± 46,7 – 656,1 ± 137,9		Sánchez-Villegas y cols. 2009 [166]

R24h: Recuerdo de 24 horas, CFCA: Cuestionario de Frecuencia de Consumo de alimentos, N: número de participantes, H/M: hombres/mujeres, ^a Estimación folatos total de la dieta, media ± desviación estándar (límite inferior P5 y superior P95)

4. Las Bases de Datos de composición de alimentos

Es necesario disponer de datos representativos y actualizados de composición de los alimentos con objeto de realizar una adecuada evaluación nutricional de la población [93]. En la actualidad se utilizan cada vez más los soportes informáticos en forma de bases de datos en sustitución de las tradicionales Tablas de Composición de Alimentos, ya que son muchas sus ventajas. A continuación se describen los aspectos más relevantes a considerar en la elaboración y uso de las bases de datos de composición de alimentos.

a. Contenidos y usos: herramientas para la evaluación de la ingesta

Los datos de ingesta de alimentos recogidos mediante diversa metodología en los estudios poblacionales, deben ser convertidos a datos de energía y nutrientes para poder ser evaluados [93]. Las bases de datos de composición de alimentos en soporte informático son una herramienta imprescindible para dicha evaluación, ya que facilitan el procesado y cálculo de numerosos nutrientes en poco tiempo. Sin embargo, estos datos deben presentar una serie de características para que puedan ser comparables entre estudios. En una reciente publicación del grupo EuroFIR, Bouckaert y cols. [88] pusieron de manifiesto la ausencia de datos de alimentos fortificados con ácido fólico, así como la falta de consenso existente entre las distintas tablas y bases de datos de composición de alimentos europeas. Tal es el caso de la nomenclatura utilizada para designar la vitamina B₉ o folatos como folatos totales, ácido fólico, folatos naturales y equivalentes dietarios de folatos (EDF) [88].

b. Diseño

Para el trabajo presentado en 2007 como parte del DEA [12], se diseñó una Base de Datos de los alimentos fortificados con ácido fólico en el mercado español [51]. Asimismo, se recogieron los datos de composición de las Tablas más utilizadas en nuestro país. En éstas se encontraron las discrepancias de nomenclaturas para los folatos que resaltan Bouckaert y cols. [88] y además la ausencia o escasez de datos de alimentos fortificados.

c. Limitaciones

La oferta de alimentos se encuentra en continua evolución y por lo tanto es difícil que las tablas reflejen fielmente la disponibilidad de alimentos de un determinado país o región. En este sentido, el soporte informático que caracteriza a las bases de datos aporta mayor versatilidad al poder actualizar sus contenidos en periodos de tiempo más cortos [167].

d. Red de Excelencia Europea EuroFIR para la estandarización de criterios en la elaboración de bases de datos en Europa

Las bases de datos deben presentar una metodología armonizada y estandarizada entre los distintos países para facilitar el intercambio de información y que sean comparables entre ellas, si bien, la clasificación de los grupos y subgrupos de alimentos puede ser controvertida, por las diferencias en cuanto a hábitos alimentarios y patrones de consumo en los diferentes países [168]. En este sentido, el de la Red de Excelencia Europea EuroFIR ha trabajado para la estandarización en los criterios de elaboración de las bases de datos en Europa. El grupo dirigido por el Dr. Martínez de Victoria y el Dr. Ros [167] se encargan de la gestión y mantenimiento de la Red BEDCA, la Base de Datos española unificada de acuerdo a los criterios EuroFIR [89]. Asimismo, este proyecto ha sentado las bases para la evaluación de la calidad de los datos de composición de ácido fólico disponibles en la literatura, ya que es importante el volumen de datos de composición de alimentos provenientes de estudios publicados en forma de artículos de revisión por fases (*peer-reviewed*).

La descripción estandarizada de los alimentos es otro factor esencial en la elaboración de las bases de datos. LanguaL™ es un tesoro de descripción de alimentos, que proviene de “*Langua aLimentaria*” o “*Lenguaje de los alimentos*”. Es un método automatizado para la descripción, almacenamiento y recuperación de datos de alimentos, de amplio uso en la actualidad [167, 169]. Su desarrollo se inicia a finales de 1970 en el Centro para la seguridad alimentaria y nutrición aplicada (del inglés *Center for Food Safety and Applied*

Nutrition) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, siglas del inglés *Food and Drug Administration*). Desde 1996, el Comité Técnico europeo de LanguaL lleva a cabo la administración del tesoro. Así, proporciona un lenguaje estandarizado para la descripción de los alimentos, partiendo de la base que cualquier alimento se puede describir mediante una combinación de características (origen biológico, procesado, etc.) las cuales están codificadas para poder ser procesadas de forma informatizada e incluirse en las Bases de Datos. A su vez, cada código equivale a una característica o descriptor y se presenta en nueve idiomas, incluyendo el español, con lo que se facilita el intercambio coherente de información entre bases de datos computarizadas.

5. Marco legal aplicable a la fortificación con ácido fólico en Europa y España

5.1. Legislación vigente

El aumento en la disponibilidad de suplementos, alimentos fortificados y funcionales, así como la libre circulación y comercio en la Unión Europea ha propiciado el interés por la armonización de la legislación aplicable a los mismos. Además, se ha considerado esencial la protección e información al consumidor ya que la avalancha de productos y reclamos publicitarios ha generado en muchos casos desconfianza en la industria alimentaria. La fortificación voluntaria con ácido fólico está regulada por el Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor [170] que modifica al Reglamento (CE) 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos [60], a su vez traspuesto a la legislación española mediante el Real Decreto 1669/2009, de 6 de noviembre, por el que se modifica la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios [171], aprobada por el Real Decreto 930/1992 [172]. Se define el etiquetado de propiedades nutritivas como *“toda información que aparezca en la etiqueta en relación con: el valor energético, y los nutrientes siguientes: proteínas, hidratos de carbono, grasas fibra alimentaria, sodio, vitaminas y sales minerales enumeradas en el anexo único”* [172].

En el caso de las vitaminas y minerales, en este Real Decreto se establece que: *“para decidir lo que constituye una cantidad significativa se considera un 15% de la cantidad recomendada especificada en el presente anexo y suministrada por 100 gramos o 100 ml o por envase, si este contiene una única porción”*. En el caso del ácido fólico se establece una Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de 200 µg. Esta CDR viene especificada en el Anexo único del Real Decreto 1669/2009 [171] y se basa en la recomendación de la reunión de consulta de expertos organizada por la FAO y la OMS en Helsinki en 1988. Como ya se expuso, las Ingestas Recomendadas de ácido fólico para un adulto son de 400 µg [138], es decir, el doble del valor de la CDR, con lo cual estas últimas deben ser interpretadas con cautela al referirnos a los requerimientos de la vitamina.

Sin bien no se establecen límites máximos de adición de vitaminas, se está trabajando en una legislación a nivel Europeo (hasta el momento no aprobada) que establezca los criterios necesarios para determinar los niveles mínimos y máximos de adición a los alimentos fortificados de forma voluntaria [43].

Existen también, alimentos denominados “*para usos nutricionales especiales*” que llevan añadidos en su composición vitaminas y minerales como son los productos dietéticos o para regímenes especiales [173], los preparados para lactantes y preparados de continuación [174] y los productos infantiles para lactantes y niños de corta edad a base de cereales [175] los cuales tienen por sus especiales características una legislación específica. Para los preparados para lactantes, el valor de referencia para el etiquetado es de 125 µg de ácido fólico por 100 ml y para los diversos productos que entran en esta clasificación se establecen los límites mínimos y máximos de 10 y 50 µg de ácido fólico por 100 kcal respectivamente [174]. En el caso de los productos infantiles a base de cereales, se toman como valores de referencia para el etiquetado 100 µg de ácido fólico por 100 g o ml, especificando que siempre y cuando el producto tenga $\geq 15\%$ de esta cantidad, podrá ser objeto de declaración. Para los productos dietéticos que se en principio están concebidos como remplazo de una o varias comidas, se establece que deben contener por ración 60 µg de ácido fólico y los productos que sustituyen la dieta diaria deben aportar el 100% de las CDR de ácido fólico (200 µg) [176].

5.2. Tipología de las declaraciones del etiquetado de los alimentos

El Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos [1], surge con el objeto de garantizar una información correcta en el etiquetado de los alimentos, evitando información engañosa o poco clara para el consumidor. Este Reglamento define una *declaración* como *“cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas”*. Son tres los tipos de declaraciones que se contemplan en el Reglamento [1].

1. **Declaración nutricional** será cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas relacionadas con su aporte energético, nutrientes u otras sustancias que contiene en proporciones reducidas o incrementadas o bien que no contiene.

Las condiciones que se aplican a las vitaminas y que vienen recogidas en el Anexo único del reglamento son las mismas que las estipuladas en la Directiva 90/496/CEE, aunque en este Reglamento se establecen las denominaciones que pueden utilizarse de acuerdo a las cantidades añadidas:

- **Fuente de** (nombre de la vitamina) o **Contiene** (nombre de la vitamina): si el producto contiene como mínimo una cantidad significativa definida como $\geq 15\%$ de la CDR por 100 g o ml o envase si éste contiene una única porción.
- **Alto contenido de** (nombre de la vitamina): si el producto contiene como mínimo dos veces el valor establecido para “fuente de”, es decir $\geq 30\%$ de la CDR por 100 g o ml o envase si éste contiene una única porción.

2. Declaración de propiedades saludables: cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud. Recientemente y tras largas revisiones de la evidencia científica por parte de la EFSA, ha sido aprobado y publicado el Reglamento (UE) Nº 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece la lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños [177]. El mismo autoriza las declaraciones relacionadas con los folatos que se detallan a continuación:

- Formación de la sangre
- Metabolismo de la Homocisteína
- Funcionamiento del sistema inmune
- División celular
- Crecimiento de tejidos maternos durante el embarazo
- Contribución al normal funcionamiento psicológico y al rendimiento y salud cognitiva
- Reducción del cansancio y la fatiga
- Contribución a la síntesis normal de aminoácidos

El Panel de la EFSA ha rechazado las siguientes declaraciones al considerar que no queda suficientemente establecida la relación causa-efecto entre la ingesta de folatos y las siguientes funciones:

- Contribución al funcionamiento del metabolismo energético
- Mantenimiento normal de la función visual
- Contribución al funcionamiento de las venas

En el Reglamento se estipula como condición de uso, que para que un alimento sea susceptible de llevar en su etiquetado las declaraciones aprobadas, debe ser una *“fuente de folatos”* de acuerdo a lo establecido en el Anexo del Reglamento (EC) No 1924/2006 ($\geq 15\%$ de la CDR por 100 g, ml o porción). Dichas cantidades deben poder ingerirse fácilmente como parte de una dieta balanceada. La Comisión Europea, con el asesoramiento científico de la EFSA, establecerá unos perfiles nutricionales específicos que deberán cumplir los alimentos o determinadas categorías de alimentos para poder utilizar las declaraciones nutricionales o de propiedades saludables, así como las condiciones de utilización de dichas declaraciones. El último documento de trabajo de la Comisión sobre el establecimiento de los perfiles nutricionales ha sido publicado en febrero de 2009, si bien aún no ha sido aprobado [178].

- 3. Declaración de reducción del riesgo de enfermedad:** cualquier declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana.

Para poder hacer uso de las mismas, la industria deberá presentar una solicitud de autorización a las autoridades nacionales competentes, acompañada de evidencia científica suficiente y contrastada que será evaluada por la EFSA [1].

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DESARROLLO, SEGUIMIENTO Y ACTUALIZACIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE ALIMENTOS FORTIFICADOS CON ÁCIDO FÓLICO

1.1. Diseño, estructura y actualización de la Base de Datos

La Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico se desarrollo y presentó como parte del trabajo de investigación para optar al Diploma de Estudios Avanzados (DEA) [12] cuya estructura y resultados más relevantes fueron publicados en 2009 [51]. Fue oportuno plantear la actualización de sus contenidos dada la continua evolución del mercado de los productos fortificados. Además, se pretendió constatar la posible reformulación o la desaparición de los alimentos ya comercializados, para evaluar de forma objetiva la disponibilidad de alimentos que contienen ácido fólico.

La aplicación informática de elección fue Access 2000® de Microsoft Office® (Microsoft Co., EEUU). En la estructura previamente creada, una Base de Datos relacional integrada por una serie de tablas relacionadas entre sí, se incluyeron los datos provenientes de un Inventario de productos fortificados con ácido fólico que se describe en el **Apartado 1.2** de esta sección.

Cabe destacar que como parte de una estancia de investigación en el grupo dirigido por el Paul Finglas (*Folates Group, Natural Products Programme*) del *Institute of Food Research* (Norwich, UK), se participó en el Proyecto eBASIS cuyo objetivo es la evaluación de la literatura científica para la inclusión de datos de composición de sustancias bioactivas en bases de datos de alimentos (Proyecto EBASIS dentro del Proyecto de la Red de Excelencia Europea EuroFIR [179]). Estos criterios fueron aplicados a la actualización y mejora de la Base de Datos ya citada.

El objetivo principal de la actualización que nos planteamos para la estructura de la Base de Datos, se baso en la armonización y organización de contenidos de composición de los alimentos que permita el intercambio de datos entre bases de

datos (por ejemplo con la Base de Datos española, BEDCA [167]). Así, los cambios/mejoras incluidos fueron:

- Utilización del sistema Langual/EuroFIR para la clasificación y codificación de grupos y subgrupos de alimentos, así como la denominación genérica de los mismos (**Anexo I**) [169]
- Inclusión de los identificadores de componentes para los distintos vitámeros de folatos, de acuerdo con el tesoro EuroFIR [180].
- Traducción de contenidos Español – Inglés
- Utilización de guías armonizadas/estandarizadas para evaluar la literatura científica de datos de composición en folatos recopilada en la Base de Datos [181, 182].

1.2. Inventario de productos fortificados con ácido fólico

Para llevar a cabo la actualización de los contenidos de la Base de Datos en cuanto a los alimentos fortificados con ácido fólico que se comercializan en el mercado, se siguieron las pautas descritas por Samaniego y cols. [51]. Brevemente, se siguieron los siguientes pasos:

- Se acudió a las grandes superficies, supermercados y tiendas de descuento visitados en la última actualización del inventario [51];
- se adquirieron los productos no incluidos previamente en la Base de Datos;
- se recogió la información referente a reformulación en cuanto al contenido de ácido fólico, folacina o vitamina B₉ de los productos ya incluidos en la Base de Datos
- se registró la ausencia de los productos incluidos en el inventario previo (2006-2007).

Todo ello en un formulario prediseñado para facilitar la estandarización en el registro de los datos. En resumen, se realizó un seguimiento de los productos fortificados con ácido fólico comercializados en las distintas superficies de venta.

Los centros visitados se ubicaron en el Municipio de Madrid Capital y el periodo en que se realizaron las visitas que integran el presente estudio se extiende entre diciembre de 2007 y mayo de 2010. Los establecimientos o *“lugares de compra”* seleccionados fueron los 10 más habituales del consumidor medio español para la adquisición de la alimentación *“seca”* (supermercados e hipermercados) de acuerdo con los datos del Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) [183, 184]. Otros datos relevantes como el mayor crecimiento en distribución fueron considerados de interés para la selección de las superficies de venta de alimentos [185].

Se recogieron los datos del etiquetado nutricional de los productos fortificados, incluyendo en su caso las alegaciones nutricionales de contenido en vitaminas y otros nutrientes y las alegaciones de salud, que cuentan con una legislación específica [1] y que son las que llaman la atención del consumidor en cuanto a la composición y beneficios potenciales del producto. También se recogieron los datos del etiquetado general (**Tabla 8**). Todos ellos conformaron la ficha de producto en la Base de Datos, la cual incluyó también una muestra fotográfica del envase.

Los criterios de organización de grupos de alimentos incluidos en la Base de Datos fueron como se expuso anteriormente, los propuestos en LanguaL.

Se incluyeron los relativos a la población diana a los que va dirigido el producto derivada del marketing del envase (**Tabla 8**). Los segmentos de población diana potencial incluidos en la Base de Datos derivaron de las declaraciones del envase:

- Para niños, *“kids”*, *“peques”*, *“crecimiento”*
- *“Mujer”*, *“Mamá”*
- *“Cuida tu línea”*, 0% M.G, *“adelgaza”*

Tabla 8. Datos de los productos fortificados con ácido fólico recogidos en el inventario en superficies de venta y criterios de clasificación.

<p>Etiquetado General^a</p>	<p>Nombre comercial y descripción</p> <p>Marca comercial</p> <p>Código de barras</p> <p>Alegaciones nutricionales de contenido</p> <p>Alegaciones de salud (ambas declaradas en el panel frontal y/o letra tamaño ≥12)</p> <p>Ración de consumo recomendada (g o ml)</p>																																																																
<p>Etiquetado Nutricional^a</p>	<p>Matriz del alimento ≥50% (i.e. trigo integral)</p> <p>Energía (Kcal/100 g o ml)</p> <p>Folatos, ácido fólico, folacina o vitamina B₉ (µg/100 g o ml)</p> <p>Vitamina B₆ (mg/100 g o ml)</p> <p>Vitamina B₁₂ (µg/100 g o ml)</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>INFORMACIÓN NUTRICIONAL</th> <th>POR 100 g</th> <th>POR RACIÓN (40 g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>VALOR ENERGÉTICO</td> <td>1514 kJ 358 kcal</td> <td>606 kJ 143 kcal</td> </tr> <tr> <td>PROTEÍNAS</td> <td>8 g</td> <td>3 g</td> </tr> <tr> <td>HIDRATOS DE CARBONO</td> <td>68 g</td> <td>27 g</td> </tr> <tr> <td>de los cuales:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> Azúcares</td> <td>22 g</td> <td>9 g</td> </tr> <tr> <td> Almidón</td> <td>45 g</td> <td>18 g</td> </tr> <tr> <td>GRASAS</td> <td>6 g</td> <td>2,5 g</td> </tr> <tr> <td>de las cuales:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> Saturadas</td> <td>0,5 g</td> <td>0,2 g</td> </tr> <tr> <td>FIBRA ALIMENTARIA</td> <td>10 g</td> <td>4 g</td> </tr> <tr> <td>Sodio</td> <td>0,55 g</td> <td>0,22 g</td> </tr> <tr> <td>VITAMINAS</td> <td>(% CDR)^{**}</td> <td>(% CDR)^{**}</td> </tr> <tr> <td>NIACINA</td> <td>11,3 mg 63</td> <td>4,5 mg 25</td> </tr> <tr> <td>VITAMINA B6</td> <td>1,3 mg 63</td> <td>0,5 mg 25</td> </tr> <tr> <td>RIBOFLAVINA (B2)</td> <td>1,0 mg 63</td> <td>0,4 mg 25</td> </tr> <tr> <td>TIAMINA (B1)</td> <td>0,5 mg 63</td> <td>0,2 mg 25</td> </tr> <tr> <td>ÁCIDO FÓLICO</td> <td>250 µg 125</td> <td>100 µg 50</td> </tr> <tr> <td>VITAMINA B12</td> <td>0,60 µg 60</td> <td>0,25 µg 25</td> </tr> <tr> <td>MINERALES</td> <td>(% CDR)^{**}</td> <td>(% CDR)^{**}</td> </tr> <tr> <td>hierro</td> <td>8,8 mg 62</td> <td>3,5 mg 25</td> </tr> </tbody> </table> <p><small>* CDR: Cantidad Diaria Recomendada por la UE</small></p>	INFORMACIÓN NUTRICIONAL	POR 100 g	POR RACIÓN (40 g)	VALOR ENERGÉTICO	1514 kJ 358 kcal	606 kJ 143 kcal	PROTEÍNAS	8 g	3 g	HIDRATOS DE CARBONO	68 g	27 g	de los cuales:			Azúcares	22 g	9 g	Almidón	45 g	18 g	GRASAS	6 g	2,5 g	de las cuales:			Saturadas	0,5 g	0,2 g	FIBRA ALIMENTARIA	10 g	4 g	Sodio	0,55 g	0,22 g	VITAMINAS	(% CDR) ^{**}	(% CDR) ^{**}	NIACINA	11,3 mg 63	4,5 mg 25	VITAMINA B6	1,3 mg 63	0,5 mg 25	RIBOFLAVINA (B2)	1,0 mg 63	0,4 mg 25	TIAMINA (B1)	0,5 mg 63	0,2 mg 25	ÁCIDO FÓLICO	250 µg 125	100 µg 50	VITAMINA B12	0,60 µg 60	0,25 µg 25	MINERALES	(% CDR) ^{**}	(% CDR) ^{**}	hierro	8,8 mg 62	3,5 mg 25
INFORMACIÓN NUTRICIONAL	POR 100 g	POR RACIÓN (40 g)																																																															
VALOR ENERGÉTICO	1514 kJ 358 kcal	606 kJ 143 kcal																																																															
PROTEÍNAS	8 g	3 g																																																															
HIDRATOS DE CARBONO	68 g	27 g																																																															
de los cuales:																																																																	
Azúcares	22 g	9 g																																																															
Almidón	45 g	18 g																																																															
GRASAS	6 g	2,5 g																																																															
de las cuales:																																																																	
Saturadas	0,5 g	0,2 g																																																															
FIBRA ALIMENTARIA	10 g	4 g																																																															
Sodio	0,55 g	0,22 g																																																															
VITAMINAS	(% CDR) ^{**}	(% CDR) ^{**}																																																															
NIACINA	11,3 mg 63	4,5 mg 25																																																															
VITAMINA B6	1,3 mg 63	0,5 mg 25																																																															
RIBOFLAVINA (B2)	1,0 mg 63	0,4 mg 25																																																															
TIAMINA (B1)	0,5 mg 63	0,2 mg 25																																																															
ÁCIDO FÓLICO	250 µg 125	100 µg 50																																																															
VITAMINA B12	0,60 µg 60	0,25 µg 25																																																															
MINERALES	(% CDR) ^{**}	(% CDR) ^{**}																																																															
hierro	8,8 mg 62	3,5 mg 25																																																															
<p>Organización Base de Datos</p>	<p>Grupo de alimentos de acuerdo a la clasificación LanguaL/EuroFIR</p> <p>Denominación genérica o subgrupo de alimentos (LanguaL/EuroFIR)</p> <p>Población diana para el consumo del producto</p> <p>Lugar de adquisición</p> <p>Fecha de adquisición (mes/año)</p>																																																																

^a Información disponible en el envase o etiquetado del producto

Para llevar a cabo la clasificación o segmentación de los productos del inventario, se estableció como criterio el Nivel de Fortificación declarado (NFD) de los productos fortificados con ácido fólico, definido como el porcentaje de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de ácido fólico (200 µg) cubierto por ración declarada en el etiquetado, calculado de acuerdo a la Ecuación 2. De esta forma se definieron cuatro grupos de acuerdo al porcentaje de CDR cubierto (**Tabla 9**). De acuerdo con la legislación vigente, el % de la CDR que aporta el producto por ración o 100 g, es el determinante para que se pueda realizar una alegación de contenido en vitaminas [1, 186].

[Ecuación 2]

$$\text{NFD (\%)} = \frac{\mu\text{g de ácido fólico por ración (g)}}{\text{CDR de ácido fólico (200 } \mu\text{g)}} \times 100$$

Tabla 9. Criterio de clasificación para los alimentos fortificados con ácido fólico de la Base de Datos de acuerdo a la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) que aportan por ración.

Nivel	Ácido fólico por ración (µg)	NFD: % de la CDR de ácido fólico por ración recomendada ^A
1	≤ 33	≤ 16 %
2	33,1-51	16,1 – 25,9 %
3	51,1-70	26 – 34,9 %
4	≥ 70,1	≥ 35 %

NFD: Nivel de fortificación declarado. ^A ración recomendada declarada por el fabricante en el etiquetado nutricional

1.3. Estudio del etiquetado nutricional y tipos de alegaciones en el etiquetado de los alimentos fortificados con ácido fólico

A partir de la información recogida en la Base de Datos, se analizó la adecuación del etiquetado nutricional que acompaña a los productos fortificados con ácido fólico de acuerdo con el Reglamento (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos [1] y el recientemente publicado Reglamento (UE) Nº 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños . Las alegaciones impresas en letra con fuente ≥ 12 y ubicadas en el panel frontal del etiquetado de los productos fueron recopiladas en la ficha de producto de la Base de Datos. En adición a la publicidad, estas alegaciones representan la primera información que recibe el consumidor del producto en el anaquel. Si la alegación presentaba un asterisco que refiriese a otra información en otra zona del envase, ésta no se recopilaba.

La evaluación del etiquetado de los productos fortificados se realizó en dos partes:

- De forma general, abarcando todos los productos de la Base de Datos;
- De forma específica, estudiando los productos que declaran una ración recomendada de consumo en el etiquetado, según el nivel de fortificación declarado por el fabricante (NFD) (**Tabla 9**).

2. ANÁLISIS DE FOLATOS EN ALIMENTOS FORTIFICADOS CON ÁCIDO FÓLICO. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

2. 1. Adquisición y procesado de muestras

Las muestras de alimentos fortificados con ácido fólico se adquirieron en superficies de venta de la Municipio de Madrid Capital, seleccionadas al azar entre las visitadas durante el periodo del estudio de mercado ya descrito. Se adquirió de forma aleatoria una unidad de cada producto y marca de acuerdo con Greenfield [93]. Concretamente, las muestras fueron *cereales de desayuno, galletas, leche, yogures y bebidas fermentadas, zumos y néctares y cacao y café soluble*. Todos ellos declaraban estar fortificados con ácido fólico mediante su inclusión en el listado de ingredientes. La mayoría de estos alimentos fortificados se presentaban “*listos para el consumo*”, es decir, no precisan tratamientos posteriores de cocción, únicamente ser conservados según las recomendaciones del fabricante (i.e. ausencia de luz y humedad, temperatura de refrigeración, etc.). Por este motivo, el contenido total del envase de cada muestra se pulverizó en un molinillo para posteriormente separarlo en alícuotas codificadas (1 x 10 g y 4 x 2 g), a las que se añadió nitrógeno gaseoso y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Todo el procesado se realizó bajo luz tenue y minimizando el contacto con el oxígeno. En el caso de alimentos líquidos o semilíquidos, se homogenizó el contenido del envase y se separaron alícuotas codificadas (1 x 10 ml y 4 x 2 ml) y se las sometió a una corriente de nitrógeno gaseoso para su posterior congelación (-20 °C).

En cada muestra de alimento fortificado se analizó el contenido en folato total, mediante el método microbiológico con *L. casei* cloranfenicol-resistente (*L. casei* sp. *rhamnosus* (NCIB 10463)), y el contenido en ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato, mediante cromatografía de afinidad con proteína ligando de folato (PLF) y detección y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El protocolo, materiales y equipos utilizados en cada uno de estos métodos se detalla a continuación.

2.2. Métodos de análisis de alimentos fortificados con ácido fólico

2.2.1. Introducción

De forma resumida, la metodología utilizada, desarrollada por Selhub y cols. [187], Póo-Prieto y cols. y O'Broin y cols. incluyó tres etapas clave:

1. Extracción y deconjugación de los folatos contenidos en las matrices alimentarias (método trienzimático),
2. Purificación y concentración de los mismos mediante cromatografía de afinidad y
3. Análisis y cuantificación de los analitos de interés ya sea en su totalidad, utilizando el método microbiológico o bien la cuantificación de vitámeros específicos con la cromatografía de afinidad acoplada a la detección por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (HPLC).

En la **Figura 4** se presenta el esquema general de los métodos seguidos para el análisis de folatos en los alimentos fortificados con ácido fólico.

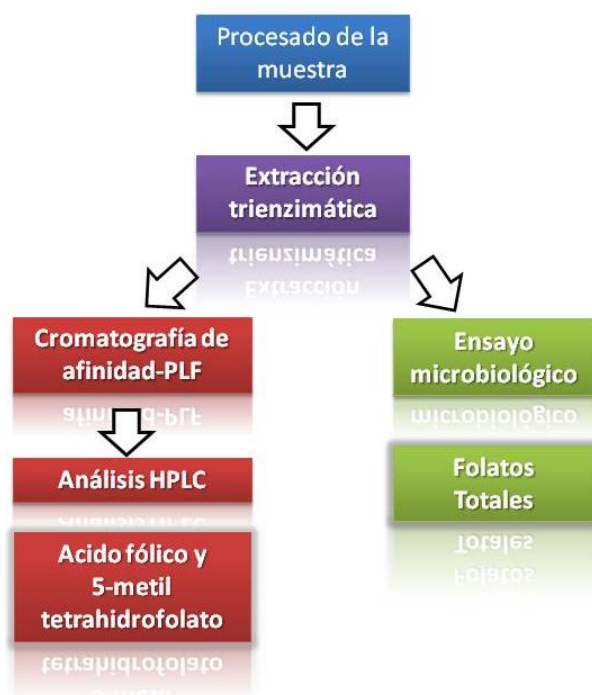


Figura 4. Esquema del análisis de ácido fólico y folato total en alimentos fortificados.

2.2.2. Extracción trienzimática del ácido fólico y los folatos de la matriz de alimentos fortificados

Introducción

De acuerdo con el método propuesto por Martin y cols. en 1990 [104], las muestras de alimentos fortificados con ácido fólico se sometieron a autoclavado para posteriormente incubar los extractos con tres tipos de enzimas: α -amilasa, folato conjugasa y proteasa, las cuales van a liberar y deconjugar los folatos naturales presentes en las matrices alimentarias.

Enzimas

Conjugasa de plasma de rata

Las formas naturales de folatos deben presentarse como monoglutamatos o di - tri glutamatos para ser analizadas y cuantificadas, tanto por HPLC como por el método microbiológico, respectivamente. Sin embargo, los alimentos suelen contener vitámeros con uno o varios restos glutámicos. Se hace, por tanto, necesaria la utilización de una enzima deconjugasa que puede obtenerse de varias fuentes [79]. En este caso, se utilizó la conjugasa extraída de plasma de rata, obtenida de los laboratorios Charles River (Francia) de acuerdo con el método propuesto por Horne y cols. [188]. Para eliminar el folato endógeno, se añadieron 10 g de una resina de intercambio aniónico fuerte (AG1X8, Bio-Rad, España) a 200 ml de plasma y se dejó en agitación durante una noche a 4 °C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3.500 g durante 15 min a 4 °C. Las fracciones sobrenadantes se filtraron y almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Test de eficacia de la Conjugasa de plasma de rata

Se realizó de acuerdo al protocolo de Wright, A.J.A (comunicación personal) con objeto de comprobar la capacidad de deconjugarse de la enzima extraída del plasma, ya que podría encontrarse desnaturalizada e inactiva. Se utilizó para ello un extracto de levadura que contiene una alta concentración de poliglutamatos (Becton Dickinson, España). Brevemente, se prepararon soluciones de extracto de levadura entre 0,125-5,0 g en un volumen total de 100 ml, en agua MiliQ. Se separó 1 ml de este volumen y se añadieron 500 µl de la conjugasa de plasma de rata, completando hasta un volumen total de 5 ml con tampón de extracción Tris-HCl 0,026M (pH 7,4) con ascorbato sódico 1% (p/v) y 2-mercaptoetanol 5mM. Se mantuvo dicha solución en incubación durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente se midió el contenido en folato total de dichos extractos mediante el ensayo microbiológico (**Apartado 2.2.5**) para comprobar la deconjugación de los poliglutamatos contenidos en el extracto de levadura.

α-Amilasa y proteasa

Se utilizaron α-Amilasa de *Bacillus* sp. (EC.3.2.1.1) y proteasa de *Streptomyces griseus* tipo XIV (EC.3.4.24.31) obtenidas de Sigma (Madrid, España). Las soluciones se prepararon a las concentraciones de trabajo en agua MilliQ, se filtraron en condiciones estériles (filtros de jeringa 0,22 µm, Millipore, España) y se almacenaron a -20 °C. Se trabajó con soluciones enzimáticas preparadas semanalmente.

Reactivos

El ácido fólico y el 5-metiltetrahidrofolato se adquirieron a Sigma (Madrid, España) en grado analítico. Tris-HCl (Tris-(hidroximetil)-aminometano, hidrocloreídrico), ascorbato sódico, ácido trifluoroacético, fosfato potásico mono y dibásico y ácido fosfórico concentrado ≥85 %, se adquirieron a Sigma

(España). El ditioeritritiol se obtuvo de Bio-Rad (España) y el acetonitrilo en grado HPLC de Panreac (España). Para determinar la recuperación de los procesos de extracción y purificación, se utilizó como trazador el [3', 5', 7, 9-³H] ácido fólico sal de diamonio (69 Ci/mmol), de Movereck Biochemicals (Brea, CA, EE.UU). El agua utilizada fue de grado MilliQ.

Estándares de folatos

Las soluciones estándar de ácido fólico y el 5-metiltetrahidrofolato se prepararon por separado, como se detalla a continuación:

Solución A: 200 µg/ml (200 mg/L). Se disolvieron 20 mg de ácido fólico con 4 ml de hidróxido sódico 0,1M y se llevaron a 100 ml con agua en matraz aforado. La misma solución se realizó para el 5-metiltetrahidrofolato.

Solución B: 10 µg/ml (10 mg/L). Se disolvió la solución A en tampón fosfato sódico 0,1M pH 7 en proporción aproximada de 12,5 ml/200 ml. Para verificar la concentración del ácido fólico en la solución, se mide en un espectrofotómetro a $\lambda = 282$ nm, utilizando el coeficiente de extinción molar del ácido fólico en álcali 0,1M que es de $27.600 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ a dicha longitud de onda [75]. Si el peso molecular del ácido fólico es de 441.4 (g/l = 1 mol), $E_{\text{max}} 1\text{cm } 1\% (10 \text{ g/l})$ a 282 nm = 625, por tanto = 0,625 para la concentración mil veces más baja de 10 mg/l (10 µg/ml), utilizando como blanco el mismo tampón de dilución.

El coeficiente de extinción molar del 5-metiltetrahidrofolato es de $31.700 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ a una $\lambda = 290$ (Pm = 457,4) [75]. Se realizan alícuotas de 100 x 2 ml de la solución B para cada folato en microtubos de rosca y se congela a -20 °C o bien a -70 °C para su almacenamiento a largo plazo. También se guardan alícuotas del tampón fosfato sódico 0,1M en las mismas condiciones para monitorizar la estabilidad de los folatos. Las soluciones de ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato realizadas a partir de la solución B se prepararon el mismo día de su utilización en ácido ascórbico al 1 %.

Procedimiento de extracción trienzimática

A. Cereales de Desayuno y galletas

Estas muestras contienen alrededor de un 70-80 % de hidratos de carbono, principalmente en forma de almidón (60-70 %), tal como declaran los fabricantes en el etiquetado del envase. Por ello, el proceso de extracción trienzimático se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Martin y cols. [104] con las modificaciones de Póo-Prieto y cols. [101], el cual es frecuentemente utilizado para el análisis de folatos en los alimentos de base hidrocarbonada, tal como se comprobó en la literatura [99, 189-191].

Se descongeló una alícuota codificada procedente de cada muestra, pesando $0,5 \pm 0,01$ g por duplicado y suspendiéndola en 10 volúmenes (p/v) de un tampón de extracción Tris-HCl 0,026M (pH 7,4) que contenía: ascorbato sódico al 1 % (p/v) como antioxidante, 2-mercaptoetanol 5mM como sugieren Horne y cols. [188] y trazador tritiado de ácido fólico 0,02 μ Ci/ml purificado. La suspensión se realizó en tubos de centrifuga de polialómero (Beckman Instruments, Alemania) y se recogió una alícuota para medir la radiactividad de cada una. Los tubos se taparon y autoclavaron a 120 °C (15 psi, 1.034 bares) durante 15 min. Posteriormente se enfriaron en hielo y se homogenizaron durante 40 s a baja velocidad (Diox 600 homogenizer, Helidolph, Alemania).

Los homogenados se sometieron a incubación añadiendo 1,25 ml de una solución 20 mg/ml de α -amilasa y 200 μ l de conjugasa de plasma de rata, durante 4 h en un baño a 37 °C, con agitación y protegiendo los tubos de la luz; seguido por una hora más de incubación en las mismas condiciones y añadiendo 1 ml de una solución 2 mg/ml de proteasa. La actividad de las enzimas añadidas a la suspensión se detuvo colocando los tubos durante 5 min en un baño de agua a 100 °C. Luego se enfriaron en hielo y centrifugaron a 36.000 g durante 20 min a 4 °C. Para finalizar, las fracciones sobrenadantes se filtraron con filtros de jeringa estériles Millex-AA 0.8 μ m (Millipore, España).

De los extractos así obtenidos, se separó una alícuota de 50 μ l para la determinación de la radiactividad y unos 500 μ l para cuantificar el folato total

por el método microbiológico, y se almacenaron a -80 °C. El volumen de extracto restante (≈ 12 ml) se guardó también a -80 °C para su purificación por cromatografía de afinidad y posterior cuantificación de los folatos por HPLC.

B. Lácteos y derivados, zumos, cacao y café soluble

El grupo de *lácteos y derivados*, como *las leches y yogures* analizados, están principalmente compuestos de agua (75-80%) proteína (3-5%) e hidratos de carbono simples (3-15%). El mismo procedimiento llevado a cabo en matrices amiláceas se aplicó a los lácteos y derivados, así como a los zumos, cacao y café soluble, ya que una revisión bibliográfica indicó que no existe mayor liberación de folatos cambiando el orden de las enzimas o los tiempos de incubación de los homogenados. De hecho, Johnston y Tamura [105] subrayan que la fase de autoclavado es suficiente para desnaturalizar y precipitar las proteínas de la leche que puedan interferir en la extracción de los folatos naturales. En el caso de los zumos y néctares, el contenido en antioxidantes del tampón de extracción debería ser suficiente para preservar el contenido en folatos naturales.

2.2.3. Cromatografía de afinidad

Introducción

La metodología de la cromatografía de afinidad, se basa en la purificación de los extractos obtenidos tras aplicar el método trienzimático a los alimentos, mediante columnas que contienen una proteína ligando de afinidad específica para los folatos y el ácido fólico. Así, se logra separar el ácido fólico y vitámeros de folatos de otras impurezas presentes en el extracto y concentrarlos. Éste paso previo necesario para la cromatografía por HPLC, carece de sentido al realizar el ensayo microbiológico debido su alta sensibilidad a los folatos.

El ligando de afinidad es la Proteína Ligando de Folato (PLF) que se extrae, a su vez, a partir de un concentrado de suero lácteo comercial, por cromatografía de afinidad, pero utilizando en este caso ácido fólico como ligando. No es posible adquirir de forma comercial las cantidades necesarias y ya purificadas de la PLF

para nuestros análisis, por lo que el proceso se lleva a cabo de acuerdo a los métodos que han sido previamente desarrollados por el grupo de investigación del Dr. Jacob Selhub y validados para los alimentos fortificados con fólico comercializados en los EE.UU. como parte del trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. Poó-Prieto [101, 192]. Estos métodos fueron puestos a punto en los laboratorios del Dpto. de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación de la Facultad de Farmacia, y se estudió su precisión y exactitud para su aplicación en las matrices de alimentos seleccionadas para este trabajo.

Protocolo de preparación de la cromatografía de afinidad para la purificación de folatos

A. Purificación de la Proteína Ligando de Folato (PLF)

Se utilizó un concentrado de proteína de suero de leche de vaca, Protein 9000 (Protient, Mountain Lake; MN, EE.UU.). El mismo se presenta como polvo blanco y se compone de un 92 % de proteína, 5,5 % de agua, 1,5 % lípidos y < 2 % lactosa. El proceso de purificación de la PLF se basó en la dilución acuosa y neutralización del concentrado, para obtener un líquido claro que posteriormente se hizo pasar por una columna de afinidad de ácido fólico, ya que su especificidad por el mismo nos permite su separación y concentración. Como fase estacionaria se utilizó Affi-Gel 102 de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.), el cual se compone de un gel de agarosa entrecruzada con un grupo amino terminal y un brazo espaciador hidrofílico de seis átomos de carbono, que inmoviliza al ácido fólico al presentar éste grupos carboxilo primarios o terminales. Es necesario un agente condensante tipo carbodiimida (EDAC) para formar el enlace covalente entre ambos.

Reactivos

El N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) se obtuvo de Bio-Rad Laboratories (Madrid, España); el ácido fólico, Tris-HCl (Tris-(hidroximetil)-aminometano, hidrocloreídrico), cloruro sódico, ácido acético, fosfato potásico mono y dibásico, azida sódica, antiespumante antifoam A, hidróxido sódico, carbonato potásico y albúmina de suero bovino se adquirieron a Sigma (Madrid, España) en grado analítico. Para determinar la actividad de la solución

de PLF se utilizó [3', 5', 7, 9-³ H] ácido fólico sal de diamonio (69 Ci/mmol), de Movereck Biochemicals (Brea, CA, EE.UU). El agua utilizada fue de grado MilliQ.

A.1. Preparación de las columnas de afinidad Affi-Gel 102-Ácido Fólico

Se diluyeron 500 ml (peso seco) del Affi-Gel 102 en un volumen equivalente de agua y se agitó lentamente. Además, se prepararon 100 ml de una solución de ácido fólico 0,05 g/ml añadiendo unas gotas de hidróxido sódico 1 M midiendo que el pH no fuese > 8. La solución de fólico se añadió al Affi-Gel 102 junto a 2 g de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) y se midió el pH tal que no fuese < 7,5. La suspensión se mantuvo en agitación lenta durante 1 hr a temperatura ambiente. A continuación se filtró a vacío para drenar el solvente y se lavó de forma secuencial con 4 l de tampón Tris-HCl 0,05 M/ cloruro sódico 1 M a pH 7,4, 2 L de tampón fosfato potásico 1M, 3 l de agua, 1 l de ácido acético 0,2 M y nuevamente 2 l de agua, todo ello para eliminar el ácido fólico no unido a la fase estacionaria. Se obtuvo un gel de color amarillo característico, que se conservó en 500 ml de azida sódica 0,3 % y a 4 °C hasta su posterior utilización en la purificación de la PLF del suero lácteo.

A.2. Proceso de purificación de la PLF

El procedimiento se basó en la repetición secuencial de los siguientes pasos: se suspendieron aproximadamente 300 g del concentrado de proteína en 1 l de agua con la ayuda de una Thermomix® (Vorwerk, España), añadiendo 1 ml de antiespumante. Una vez homogénea, la suspensión se neutralizó con hidróxido sódico 5M y se almacenó a 4 °C. A continuación, se centrifugó a 12.000 g durante 20 min a 4 °C en una ultracentrífuga (Optima L90-K, Beckman Coulter), y las fracciones de sobrenadante se filtraron con lana de vidrio y se midió la actividad de la PLF en una alícuota de este filtrado.

Se utilizaron aproximadamente 400 ml de la matriz de Affi-Gel 102-ácido fólico (200 ml peso seco) empaquetados en una columna de vidrio de 40 x 7 cm tal como se esquematiza en la **Figura 5**. La matriz se lavó secuencialmente con 2 l de tampón fosfato potásico 1 M, pH 7 y 3 l de agua. De acuerdo con el

protocolo desarrollado por la Dra. Poó-Prieto y cols. [192] el proceso de purificación es más rápido y efectivo utilizando dos columnas en paralelo.

Las fracciones de sobrenadante filtradas se añadieron a las columnas mediante un sistema de goteo continuo y a bajo flujo a través de la superficie de la matriz. Dicho flujo se consiguió mediante la utilización de embudos de decantación conectados a la parte superior de las columnas; en los mismos se disponía aproximadamente 1 l de sobrenadante (**Figura 5**).

Cuando el color amarillo característico de la matriz adquiría una tonalidad blanquecina, se consideraba que estaba ya saturada con proteína y se procedía a un lavado secuencial con 1 l de tampón Tris-HCl 0.05 M conteniendo cloruro sódico 1 M, 1 l de tampón fosfato potásico 1 M y 3 l de agua. Para separar la PLF de la matriz, se añadieron a la columna 800 ml de ácido acético 0,2 M; éste eluido se empezó a recoger a la salida de la columna en cuanto presentó un pH ácido. Se separó una alícuota para medir la actividad de la PLF y el resto se neutralizó con carbonato potásico y se almacenó en refrigeración para su posterior concentración.

Tras el paso del ácido, la matriz de la columna de afinidad se regeneró lavándola con 1 L de tampón fosfato potásico 1 M pH 7 y 1 L de agua, dejándola así preparada para una nueva adición de sobrenadante de concentrado de suero.

Se empaquetó también una columna de menor tamaño, que contenía 60 ml (peso seco) de matriz, con objeto de concentrar las fracciones eluidas en las columnas anteriores. Cuando se recogía aproximadamente 1 l de eluido neutralizado, éste se hacía pasar a través de la columna, lavando a continuación con 1 l de agua. Posteriormente, se eluía con 200 ml de ácido acético 0,2M en fracciones de 20 ml cada una para cuantificar la actividad de la PLF. Aquellas que presentaban actividad de menos de 250.000 unidades/ml, eran neutralizadas y reconcentradas con objeto de aumentar su actividad.

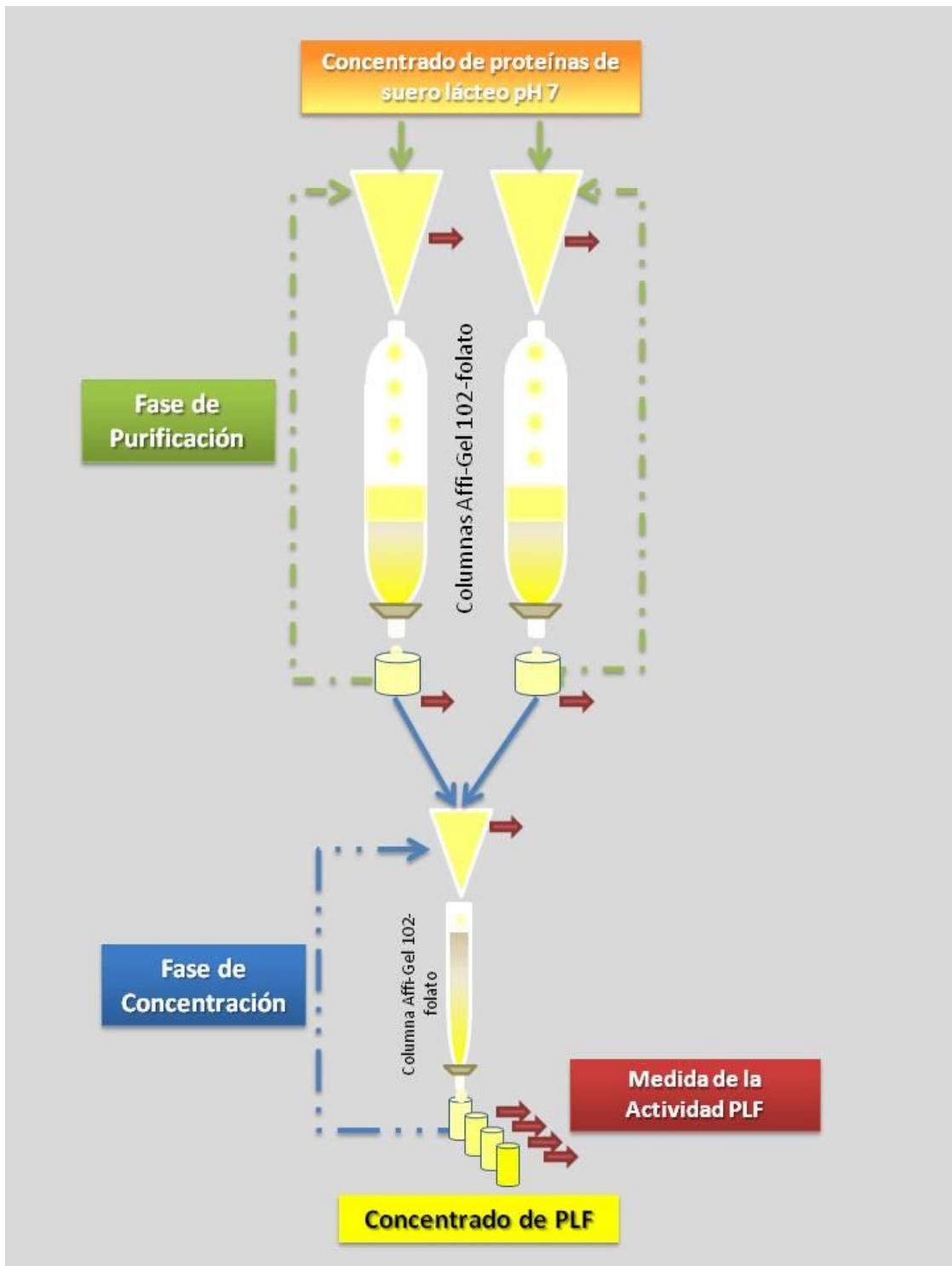


Figura 5. Secuencia de purificación y concentración de la proteína ligando de folato (PLF).

Las líneas discontinuas — · · — indican que los eluidos vuelven a introducirse en las columnas de purificación/concentración. Cada flecha roja → indica la medida de la actividad PLF mediante radiactividad, de los distintos eluidos.

El proceso completo de purificación y concentración (**Figura 5**) se repitió de forma cíclica hasta completar 60 kg de concentrado proteico de suero, de los cuales se obtuvieron aproximadamente 40 ml de solución de PLF con actividad > 250.000 unidades/ml.

A.3. Cuantificación de la actividad de la Proteína Ligando de Folato (PLF)

Se realizaron medidas de la actividad de la PLF en cada etapa del proceso de purificación / concentración descrito tal como se indica, en flechas rojas, en la **Figura 5**. Las alícuotas recogidas se diluyeron en proporción 1:10, 1:100, 1:1000, con albúmina de suero bovino al 0,01 %, en el caso de los eluidos ácidos, y con agua para las fracciones de sobrenadante. Volúmenes de 10 y 25 μ l se añadieron a tubos de vidrio y se completaron con 100 μ l de tampón fosfato potásico 0,1 M. Se prepararon así dos series de diluciones, a las que se añadieron 100 μ l de tampón como blanco y se pipeteó cada tubo con 100 μ l de ácido fólico tritiado (0,5 μ Ci/ml, actividad específica: 69 Ci/mmol). Tras agitar y dejar 5 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de tampón a cada tubo y se dejó nuevamente incubar a temperatura ambiente esta vez durante 20 min. Finalizado este tiempo, el contenido de los tubos se vertió en un sistema de vacío con un filtro de membrana de nitrocelulosa de 2,5 cm y 0,45 μ m de tamaño de poro. La PLF unida al ácido fólico tritiado queda adsorbida a la membrana con una eficiencia del 40 % [187]. Para eliminar el ácido fólico no unido a PLF, se lavaron las membranas dos veces con 15 ml de tampón cada una. Finalmente, los filtros se secaron en una estufa a 100 °C durante 15 min y cada uno se transfirió a un tubo de centelleo al que se añadieron 10 ml de líquido de centelleo (OptiPhase HiSafe-3, Perkin Elmer, España). La radiactividad se contó en desintegraciones por minuto (dpm) en un contador de centelleo (Beckman LS-6500, Beckman Coulter Inc., EE.UU.).

Cálculos de la actividad de la Proteína Ligando de Folato (PLF)

[Ecuación 3]
$$\text{Unidades de PLF por vial (pmol/vial)} = \frac{[\text{muestra (dpm)} - \text{blanco (dpm)}]}{\text{Actividad Específica } [^3\text{H}]\text{FA}}$$

$$(\text{dpm}/\text{pmol})$$

[Ecuación 4]
$$\text{Unidades PLF (pmol/ml)} = \frac{\text{Unidades PLF por vial (pmol/vial)}}{\text{VM (ml/vial)}} \times \text{FD}$$

[Ecuación 5]
$$\text{Unidades PLF (pmol/ml)} = \frac{\text{Unidades PLF (pmol/ml)}}{\text{Eficiencia de la Membrana 40\%}}$$

Donde:

VM = volumen de muestra por vial

FD = factor de dilución

Una unidad de actividad de PLF equivale a la cantidad de PLF que une 1 pmol de ácido fólico.

B. Preparación de la matriz de afinidad Affi-Gel 10-PLF

La matriz de afinidad Affi-Gel 10 de Bio-Rad (España) constituyó la fase estacionaria utilizada para la purificación y concentración del ácido fólico y los folatos de los extractos de alimentos fortificados. La misma ofrece una alta eficiencia para unir covalentemente ligandos que posean grupos aminos primarios como las proteínas.

Reactivos

Tetraborato potásico, bicarbonato de sodio, etanolamina, azida de sodio, ácido trifluoroacético, fosfato potásico mono y dibásico y piperazina se adquirieron a Sigma (Madrid, España). El agua utilizada fue de grado MilliQ (Millipore, España).

B.1. Proceso de unión de la PLF a la matriz Affi-Gel 10

Tal como se describió anteriormente, se obtuvo una solución de PLF en ácido acético 0,2M con una actividad de 267.957 unidades de PLF/ml. Para preparar 50 ml de matriz de afinidad, se necesitan aproximadamente 7×10^6 unidades de PLF [192] (25 ml de la solución ácida de PLF).

La preparación se llevó a cabo disponiendo 25 ml de la solución ácida de PLF en un vaso de 250 ml, donde se añadieron 10 ml de tetraborato potásico 0,1 M, se llevó el pH de la solución a 9,0 y se mantuvo en agitación a 4 °C.

Por otro lado, 100 ml de Affi-Gel 10 (50 ml volumen seco) se transfirieron a un embudo de capa porosa conectado a un sistema de vacío, se dejó drenar el solvente, y el gel se lavó con 500 ml de bicarbonato sódico frío evitando dejar secar el gel.

Seguidamente, la matriz húmeda de Affi-Gel 10 fue transferida al vaso que contenía la solución de PLF a pH 9,0, se tapó y se dejó en agitación en frío durante una noche. Al día siguiente, se añadió 0,1 ml de etanolamina 1 M por ml de matriz y se mantuvo en agitación a 4 °C una hora. A continuación, la suspensión se transfirió al embudo, se dejó drenar el solvente y se lavó secuencialmente con 1 volumen de ácido trifluoroacético 20 mM, 1 volumen de tampón fosfato potásico 1 M pH 7 y 1 l de agua, repitiendo el lavado dos veces. Finalmente, la matriz Affi-Gel 10-PLF fue suspendida en 1 volumen de azida sódica al 0,03 % y conservada a 4 °C hasta su utilización.

B.2. Preparación de las columnas de afinidad para purificación de muestras

Las columnas de afinidad, utilizadas en la purificación de extractos de las muestras de alimentos fortificados, se prepararon añadiendo un volumen de 1 ml de la matriz Affi-Gel 10-PLF a un soporte constituido por pipetas Pasteur de vidrio donde se dejó empaquetar la matriz por gravedad, impidiendo su pérdida mediante la colocación de una pequeña porción de lana de vidrio en el cuello de las pipetas (**Figura 6**). Toda la preparación y el uso de las columnas de afinidad se realizaron a 4 °C, en una nevera de uso industrial (Radiber S.A., España).

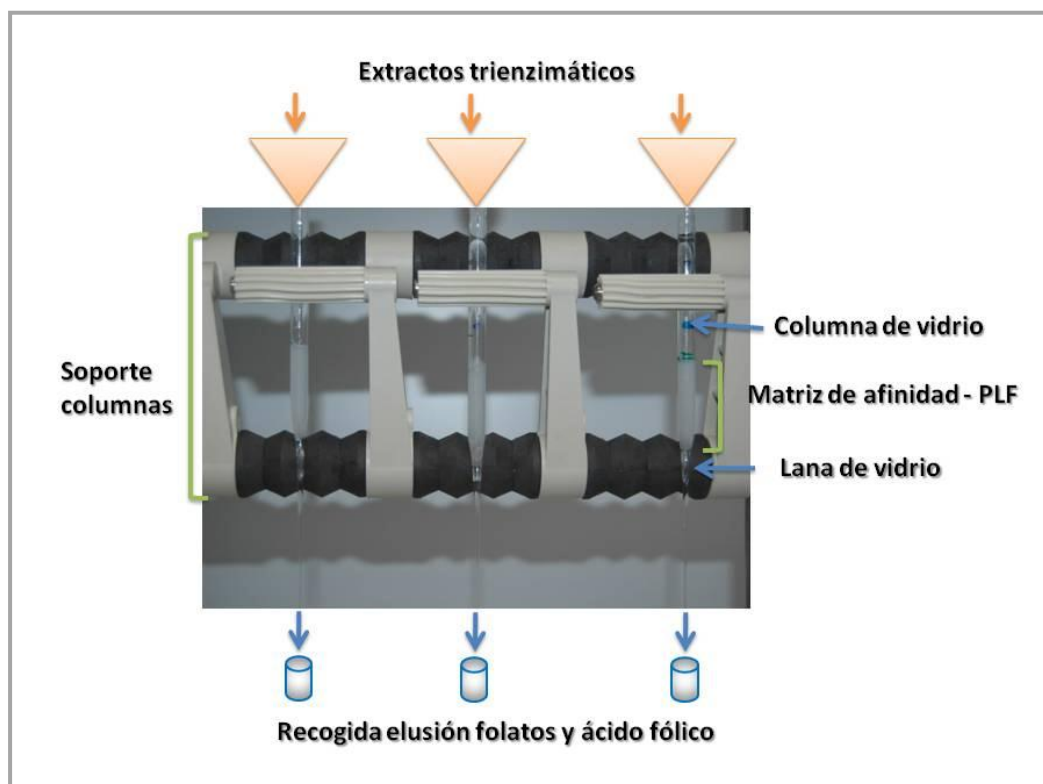


Figura 6. Esquema del equipamiento y las columnas de afinidad-PLF para la purificación de folatos.

Antes del primer uso, cada columna se lavó secuencialmente con 3 ml de ácido trifluoroacético 20 mM, 10 ml de tampón fosfato potásico 1M pH 7 y 6 ml de agua para eliminar posibles residuos adheridos. Dado que la matriz de la columna no es estable a pH bajo, se hizo necesaria la adición del tampón a pH 7 después de cada aplicación de ácido trifluoroacético.

B.3. Determinación de la capacidad de unión del Affi-Gel 10-PLF al ácido fólico

Para determinar la capacidad de unión de la matriz, se realizó una prueba saturando una columna con 2 ml de una solución de ácido fólico 200 μM (400 nmol), seguido de lavados secuenciales con 10 ml de tampón fosfato potásico 1M pH 7 y 6 ml de agua para eluir el ácido fólico no unido a la matriz. A continuación, se eluyó el ácido fólico unido con 3 ml de ácido trifluoroacético 20 mM con ditioeritritol 10 mM, volumen que se recogió y neutralizó con 60 μl de piperazina 1 M. Finalmente, se midió la absorbancia del ácido fólico a una $\lambda = 282$ nm con un espectrofotómetro (Beckman DU-650, EE.UU.) y la concentración fue calculada en base al volumen eluido total y el coeficiente de extinción molar del ácido fólico (27.600 $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [75]). Se consideró adecuado trabajar con una capacidad de unión de aproximadamente 10-15 nmol de ácido fólico por ml de matriz de Affi-Gel 10-PLF. Se comprobó que la capacidad de unión de folatos de las columnas fuese >4 μg . Los estándares de folatos utilizados para preparar la solución de ácido fólico para saturar la columna de afinidad se prepararon tal como se describe en el **Apartado 2.2.2**.

B.4. Cromatografía de afinidad de los folatos extraídos

La preparación de las columnas se llevó a cabo tal como se describe en el apartado anterior, con la diferencia que las columnas contenían en total un volumen de 0,6 ml de matriz Affi-Gel 10-PLF.

Una alícuota de 10 ml de las fracciones sobrenadantes, previamente filtradas al concluir la extracción trienzimática de cada muestra, se descongeló, homogenizó y se aplicó a la columna. A continuación, la matriz se lavó con 5 ml de tampón fosfato potásico 1 M (pH 7) y con 10 ml de agua. Los folatos adheridos a la matriz fueron eluidos, primero con 400 μl de ácido trifluoroacético 20 mM que contenía ditioeritritol 10 mM, volumen que se desechó, y luego con 2,5 ml de la misma solución. Este segundo volumen se neutralizó con 40 μl de piperazina 1 M y una alícuota de 1 ml se utilizó para la cuantificación por HPLC. Además, se obtuvo otra alícuota de 50 μl de eluido para medir la radiactividad y la recuperación de la columna. Los valores de

recuperación se consideraron adecuados a partir del 85%. Las soluciones estándar de folato preparadas para el método de calibración externa para la cuantificación por HPLC, fueron también preparadas de esta forma.

2.2.4. Análisis del ácido fólico y el 5-metiltetrahidrofolato por HPLC

Introducción

El método que se describe a continuación fue validado por la Dra. Póo-Prieto y cols. [192], para cereales fortificados comercializados en los EE.UU. Concretamente, se cuantificó el ácido fólico sintético añadido en la fortificación obligatoria y el 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) como forma mayoritaria de los folatos naturales en las distintas matrices de cereales.

Materiales, reactivos y equipos

El análisis de folatos purificados por cromatografía de afinidad se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC (Beckman Coulter, Inc., UK) compuesto de una bomba binaria, un detector de ultravioleta diodo array y un detector de fluorescencia en tándem (Shimadzu, RF-551).

Se utilizó una columna en fase reversa ODS-Hypersil (Keystone Scientific, 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m) precedida por una columna C18 de 3 mm (SecurityGuard, Phenomenex).

Las composición de las fases móviles fue la siguiente: Fase A: fosfato potásico 28 mmol/L y ácido ortofosfórico 60 mmol/L en agua; Fase B fosfato potásico 28 mmol/L y ácido ortofosfórico 60 mmol/L en una solución de acetonitrilo al 20% en agua (v/v). Antes de su uso, estas soluciones fueron filtradas a través de membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m, desgasificadas y renovadas a diario.

El programa de gradientes y las condiciones de HPLC para la separación de los analitos se basaron en las descritas por Bagley y cols. [187] modificado por Póo-Prieto y cols. [101]. El flujo de trabajo se estableció en 1 ml/min y la columna se mantuvo a temperatura ambiente (22-25 °C). Durante los primeros 3 minutos el gradiente se mantuvo al 100% de Fase A, seguidamente el gradiente se llevó a

70% de A en 10 min. Un segundo gradiente lineal que llevó a 45% de A se estableció en 17 min. Posteriormente, se programó a 43% de A durante 15 min y finalmente, tras 45 min de programa, la columna fue equilibrada durante 5 min en las condiciones iniciales para completar el ciclo [101].

Identificación y cuantificación

Los picos correspondientes a los folatos de interés se detectaron utilizando una combinación de un sistema de detectores de ultravioleta visible diodo array fijados a una $\lambda = 280$ nm para el ácido fólico, y longitudes de onda de fluorescencia a $\lambda = 295$ nm de excitación y $\lambda = 360$ nm de emisión para el 5-metiltetrahidrofolato. La identificación de ambos analitos en las muestras se confirmó comparando sus tiempos de retención con los de estándares purificados por cromatografía de afinidad-PLF. Los estándares de folatos se prepararon de acuerdo a lo descrito en el **Apartado 2.2.2.**

Las áreas de los picos fueron integradas para su cuantificación utilizando el método de calibración externa mediante una curva estándar (área vs. concentración) ajustada por regresión lineal para cada analito.

Validación de los métodos

Limite de detección

Se calculó según la fórmula establecida por Corley y aceptada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) [193]:

[Ecuación 6]

$$LD = \frac{3 \times DS_B}{m}$$

Donde:

- DS_B : desviación estándar de los blancos ($n = 16$)
- m : pendiente de la curva de calibración

Recuperación

La recuperación del método completo (extracción, purificación y análisis) se evaluó mediante el uso de harina de trigo comercial no fortificada, a la cual se adicionó una solución de estándares para alcanzar las concentraciones máximas esperadas en las muestras de alimentos fortificados (40 $\mu\text{g/g}$ de ácido fólico y 0.4 $\mu\text{g/g}$) de 5-metiltetrahidrofolato. La adecuación de los procesos de extracción y purificación por cromatografía de afinidad se controló a través de experimentos de recuperación con el trazador de ácido fólico tritiado.

Precisión

La precisión intra e inter-ensayo se determinó mediante el análisis del material de referencia SRM 1846 adquirido al *National Institute of Standards and Technology* (NIST), EE.UU.; que consiste en una fórmula láctea en polvo fortificada con ácido fólico [194, 195]. El mismo se procesó en paralelo junto con cada grupo de muestras, sometiéndolo a las mismas condiciones de extracción, purificación y cuantificación.

La precisión intra-ensayo se expresó como el coeficiente de variación (% CV) de las áreas de los picos de ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato de 5 muestras extraídas y analizadas por separado en un mismo día.

La precisión y repetibilidad inter-ensayo se basó en la medida de las muestras extraídas y analizadas de forma independiente durante 15 ensayos consecutivos durante un periodo aproximado de 5 meses.

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

Introducción

El ensayo microbiológico se basa en la cuantificación del crecimiento del microorganismo folato dependiente de *L. casei* spp. *ramnosus* cloranfenicol-resistente (NCIB 10463), que es proporcional a la concentración de dicha vitamina en un medio de cultivo y que se mide en función del aumento en la turbidez de las soluciones inoculadas. La respuesta del microorganismo es similar para mono, di y tri-glutamatos, pero más lenta para poliglutamatos de cadena larga [196]; por este motivo es necesaria, la deconjugación incluida en la extracción trienzimática previamente descrita (**Apartado 2.2.2**). De esta forma, el ensayo nos proporciona la cuantificación de folatos totales de la muestra incluyendo las formas naturales y el ácido fólico añadido.

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, el organismo de elección para la cuantificación de folato total fue el *Lactobacillus casei* spp. *ramnosus* (ATCC 7469). El mismo ha sido en los últimos años utilizado ampliamente en el análisis de folatos de los alimentos y es, a la vez, el utilizado en el método de referencia de la AOAC [11, 197, 198]. Sin embargo, esta subespecie presenta una serie de desventajas en cuanto a su manejo en laboratorio, siendo la principal la necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad en cuanto a medios de cultivo, muestras y material, con el consiguiente coste económico que esto conlleva.

Tras la estancia en el grupo de Paul Finglas en el Instituto de Investigación de los Alimentos (IFR, siglas del inglés *Institute of Food Research*, Norwich, Reino Unido) donde se aprendió a utilizar el método microbiológico con la cepa cloranfenicol resistente (NCIB 10463) aplicada a los extractos de alimentos fortificados con fólico, se optó por introducir y optimizar dicho método en nuestro laboratorio dadas sus ventajas en cuanto a eliminar la necesidad de esterilidad en su manejo y la consiguiente reducción de costes. Dicho método es una adaptación del propuesto por O'Broin y Kelleher en 1992 [100].

Materiales, reactivos y equipos

Azida sódica, ácido ascórbico, ascorbato sódico y cloranfenicol fueron obtenidos de Sigma (Madrid, España); glicerol de Panreac (España), medio de cultivo específico Medio Casei Ácido Fólico (Folic Acid Casei Medium, Becton Dickinson, España). Todos los reactivos se adquirieron en grado de pureza analítica, y el agua fue de grado MilliQ (Millipore, España).

Se utilizaron los siguiente materiales: placas de 96 pocillos de poliestireno, de fondo plano, con tapa (Corning), adhesivo sellador de placas Mylar (MP Biomedicals), pipetas multicanal y repetidora (Eppendorf) y lector de placas automático y software Digiwin v.1 (DigiScan Reader, Asys Hitech, Austria).

Microorganismo

El microorganismo *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* cloranfenicol resistente (NCIB 10463) (*L. casei*), se obtuvo en forma de liofilizado adquirido a la *National Collection Of Industrial And Marine Bacteria Ltd.* (Escocia, Reino Unido). Se trata de una cepa desarrollada a partir de la cepa utilizada en el ensayo convencional de la AOAC [197] (ATCC 7469), a la cual se hace crecer en un medio con concentraciones crecientes de cloranfenicol hasta obtener un crecimiento satisfactorio [199].

Cultivo y crioprotección

El proceso de crioprotección se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Wilson y Horne [200]. El medio de crecimiento para la preparación del microorganismo crioprotegido se preparó en una botella de vidrio, pesando 47 g de Medio Casei Ácido Fólico (MCAF) a los que se añadió 700 ml de agua y 100 ml de la solución de cloranfenicol 2 mg/ml. Se llevó a ebullición durante 1-2 min, luego se completó con agua hasta 1L y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Para reconstituir el cultivo liofilizado, se resuspendió en 20 ml de Medio Casei Ácido Fólico que contenía 20 mg de ácido ascórbico y 3 ng de ácido fólico (30 µl de la solución stock de fólico de 100 ng/ml), dejándolo en incubación a 37 °C durante una noche.

Al día siguiente, se transfirieron 100 μ l del cultivo anterior a 20 ml de medio de crecimiento FACM nuevo, dejando en incubación tal como describimos anteriormente. Es necesario repetir esta transferencia hasta observar que el microorganismo crece de forma óptima (en total 5-6 días).

Una vez alcanzado este crecimiento, es necesario predeterminedar el tiempo necesario para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo. Para ello, al comienzo del día se transfieren distintas concentraciones del cultivo, 100 μ l, 500 μ l y 2 ml a 20 ml de medio FACM (con ácido fólico y ascórbico añadidos) y se incuban a 37 °C. Asimismo transferimos otros 100 μ l a 20 ml de medio y lo guardamos como "cultivo estándar".

Medimos a continuación la absorbancia de las distintas preparaciones a cada hora (a 600 nm) hasta completar las 48 h. Sabemos que la fase logarítmica se alcanza a absorbancias entre 0,4 a 0,8 con un punto medio de 0,6 y que la concentración microbiana óptima será la de 100 μ l/20 ml, que se alcanza aproximadamente a las 26 horas (Wright, AJA., comunicación personal). Una vez establecida la absorbancia, se prepararon dos botellas A y B, con 100 ml de medio de crecimiento a las cuales se añadieron 15 ng de ácido fólico (150 μ l de la solución stock de 100 ng/ml) y 100 mg de ácido ascórbico. Utilizando el "cultivo estándar" preparado, se transfirieron 500 μ l a cada botella. Se midió la absorbancia asociada al crecimiento en la botella A y cuando se alcanzó el punto medio de la fase logarítmica de crecimiento (600 nm = 0,600) se mezcló el contenido de la botella B con 100 ml de glicerol al 80% pre-enfriado y se dispensaron alícuotas de 1 ml de esta mezcla en criotubos. Se sometió a los mismos a una congelación progresiva en una caja de poliespan de paredes gruesas, primero a -20 y luego a -80 °C, con ello se pretende evitar la formación de cristales. O'Broin y Kelleher [100] señalan que los cultivos así preparados pueden mantenerse activos durante al menos 12 meses en los que se obtiene una respuesta de crecimiento constante.

Estándares de ácido fólico

Se utilizó ácido fólico como estándar de calibrado ya que es, *a priori*, la forma mayoritaria de los folatos totales que pretendemos cuantificar con éste método en los alimentos fortificados con ácido fólico. Se ha observado que la respuesta del microorganismo a las distintas formas de folatos es similar y reproducible siempre que se mantenga el pH del medio de crecimiento constante en torno a 6,3 [201]. Para preparar el estándar de trabajo de ácido fólico de 100 ng/ml a partir del cual se construyó la curva patrón, se prepararon previamente las soluciones estándar A y B detalladas en el **Apartado 2.2.2.**

Además, se preparó la solución C (100 ng/ml), utilizada únicamente para el medio de crecimiento (**Apartado 2.2.5.**) diluyendo 100 veces la solución B con ascorbato sódico 0,5%.

Procedimiento del ensayo

El medio de cultivo se preparó tal como se describe en el apartado previo, pero en doble concentración para ser almacenado protegido de la luz y en refrigeración y posteriormente diluido en el volumen necesario cada día. La concentración del medio para el ensayo fue de 4,7 g de medio, y se añadieron 1,5 ml de la solución de cloranfenicol 2 mg/ml y 100 mg de ácido ascórbico por cada 100 ml de agua. Un vial de microorganismo crioprotegido (1 ml) se descongeló y disolvió en 50 ml de una solución de cloruro sódico al 0,9%; 1ml de esta suspensión se añadió a 100 ml de medio de cultivo previamente preparado. Se consideró oportuno analizar “blancos” con las enzimas del ensayo trienzimático (conjugasa de plasma de rata, α -amilasa y proteasa) para evaluar la posible contribución de folatos endógenos descritas por algunos autores [79].

Curva patrón

Preparación de las soluciones de trabajo de ácido fólico

Cada día de ensayo se preparó una solución de ascorbato sódico al 0,5% para realizar las diluciones de los estándares (**Tabla 10**). Es importante que las soluciones de ácido fólico utilizadas para construir la curva patrón sean realizadas a partir de la solución estándar B el mismo día del ensayo. Se

prepararon la solución C (100 ng/ml) y a partir de esta la solución D (1 ng/ml, 1000 pg/ml): utilizando ascorbato sódico al 0,5% como diluyente.

Tabla 10. Curva patrón para el ensayo microbiológico

Ascorbato sódico 0,5% (ml)	Solución D (μ l)	Factor de dilución	Concentración Ácido fólico (pg/ml)	Concentración/pocillo (8x100 μ l) (pg)
2,0	0.0	X 0	0	0
1,95	50	X 40	25	2,5
1,9	100	X 20	50	5
1,85	150	X 13,33	75	7,5
1,8	200	X 10	100	10
1,7	300	X 6,66	150	15
1,6	400	X 5	200	20
1,5	500	X 4	250	25
1,4	600	X 3,33	300	30

Preparación de placas

En una primera placa (Placa 1) se añadieron 100 μ l de cada uno de los 9 puntos de la serie de calibración en las 8 filas (A-H) de cada columna (1-9) (**Figura 7**). En las columnas 10 a 12 (filas A-H) se pipetearon 100 μ l de los 3 niveles de los controles de calidad (QC₁₋₂₋₃) que se describen a continuación. Seguidamente, se añadieron 200 μ l del medio (FACM) inoculado con el microorganismo. En los pocillos A-D se añadieron 200 μ l de medio al que previamente añadimos una solución de azida sódica (150 mg/ml) (200 μ l a 20 ml de medio inoculado) con objeto de obtener la absorbancia base [100].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃
B	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃
C	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃
D	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃
E	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃
F	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃
G	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃
H	0 pg	2,5 pg	5 pg	7.5 pg	10 pg	15 pg	20 pg	25 pg	30 pg	QC ₁	QC ₂	QC ₃

Columna 1, A-D: medio de cultivo inoculado tratado con azida sódica (blanco absoluto)

QCn: controles de calidad

Figura 7. Placa 1: curva de calibrado de 9 puntos y control de calidad

En las placas 2 en adelante se añadieron 100 µl y 50 µl de la dilución de las muestras problema en las filas A-D y E-H respectivamente. En estas últimas filas además, se completa hasta 100 µl con ascorbato sódico 0,5%. Finalmente añadimos a todos los pocillos 200 µl de medio inoculado. Esta configuración nos permitió analizar los extractos trienzimáticos de cada muestra de tal forma que por cada placa se analizó una media de 6 muestras por duplicado. Todas las placas se cubrieron con un adhesivo sellador y se incubaron a 37 °C durante 48 horas, tiempo que tarda el microorganismo en alcanzar la fase de crecimiento exponencial.

Al concluir las 48 h de incubación, se retiraron las placas de la estufa y se agitaron durante unos segundos para homogenizar el contenido de los pocillos. Se utilizó un lector de placas automático con una longitud de onda de 600 nm.

Con las absorbancias medidas en la Placa 1, y tras restar el valor medio obtenido como absorbancia base (columna 1, filas A-D), la absorbancia neta debida al crecimiento del microorganismo a cada concentración se utiliza para construir la curva de calibrado (eje Y) frente a las concentraciones de ácido fólico (0-30 pg) (eje X), utilizando una hoja de cálculo. Se aplicó una regresión polinómica de tercer grado con la que se obtuvo una ecuación de tipo $y = C + ax + bx^2 + cx^3$, y el valor de R^2 .

Las absorbancias de cada control de calidad (QC) de la Placa 1 y de las muestras problema de la Placa 2 en adelante (pg/pocillo) se extrapolaron en la curva de calibrado para obtener el valor del Folato Total en microgramos por 100 gramos de alimento.

Control de calidad, repetibilidad y precisión

Controles de Calidad Internos

Se prepararon diluciones adecuadas a partir de los extractos trienzimáticos de las matrices “*cereales de desayuno*” y “*lácteos y derivados*” para obtener concentraciones baja, media y alta (≈ 30 , 100 y 450 µg/100 g) de folatos totales para utilizarlos como controles de calidad, y se almacenaron en alícuotas codificadas a -80 °C. En cada ensayo se analizaron en paralelo los 3 niveles (Placa 1). De esta forma se pretendía monitorizar posibles cambios en la respuesta del

crecimiento del microorganismo a distintas concentraciones de folato y matriz de alimento.

Control de Calidad Externo

El Estándar Internacional para folato en suero (WHO 1st Serum folate International Standard IS 03/178 NIBSC) se adquirió al Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Control (NIBSC, siglas del inglés *National Institute for Biological Standards and Control*, Hertfordshire, Reino Unido) [202] y se presenta en forma de liofilizado de suero humano que debe reconstituirse con 1 ml de agua MilliQ. De acuerdo con su certificado de identidad, contiene 5,33 ng/ml de folato total (12,1 nmol/L utilizando el factor de conversión convencional de 2,266 [202]). El valor de folato total de este control de calidad externo viene dado por el valor medio de la suma de vitámeros individuales de folatos cuantificados por LC/MS/MS analizados en un estudio de colaboración entre 24 laboratorios de 7 países [203]. En nuestro estudio se analizó mediante el método microbiológico ya descrito para conocer la precisión del mismo.

Material Estándar de Referencia

Tal como se describió en el **Apartado 2.2.2.**, en el ensayo trienzimático se extrajo en paralelo a las muestras de productos fortificados, el contenido en folato total del material estándar de referencia SRM 1846 [195]. A partir de este se obtuvieron los valores de variabilidad inter- e intra ensayo, por el método microbiológico y por HPLC analizando las alícuotas de los extractos en paralelo con las de las muestras y los blancos del ensayo trienzimático.

2.2.6. Concordancia de los métodos analíticos para la cuantificación de folato total y ácido fólico

El total de las muestras analizadas por duplicado (extracción trienzimática, purificación y detección por HPLC) fueron analizadas por el método microbiológico que se describe en el **Apartado 2.2.5**. Éste ensayo es una modificación del método propuesto por la AOAC en el año 2000 [11, 197] y que hasta la fecha es considerado “método de referencia” en el análisis de folato total de muestras de alimentos ya sean “naturales” o fortificados [79, 198]. Así, los vitámeros separados y cuantificados por cromatografía de afinidad y HPLC se sumaron, dando el valor de “folato total” que se comparó con los valores obtenidos por el método microbiológico.

Se realizó el análisis de regresión lineal de los resultados obtenidos y la concordancia entre las determinaciones de ácido fólico en los alimentos fortificados por ambas técnicas, cromatografía de afinidad-HPLC y ensayo microbiológico, se estableció mediante el cálculo del coeficiente de correlación intraclase (CCI) [204, 205]. Los rangos propuestos por Landis y Koch [206] se utilizaron para estimar fuerza de concordancia entre los dos métodos analíticos (0,71-0,90). Se utilizó el programa informático SPSS 17.0 para Windows®.

Por último se aplicó el modelo matemático de Bland-Altman para evaluar gráficamente el grado de concordancia entre ambos [207, 208]. El gráfico de Bland-Altman se construyó calculando para cada par de datos (folato total por cromatografía de afinidad-HPLC y folato total por método microbiológico) las diferencias entre medias (“*bias*”) de los valores de los 154 alimentos analizados por ambos métodos. A continuación se calcularon para cada alimento la media de los valores obtenidos de ambos métodos y se representó cada par de valores en los ejes de coordenadas X-Y. Por último se calculó la media y la desviación estándar (DS) de las diferencias entre medias para representar los límites de concordancia (media \pm 2 x DS).

2.2.7. Comparación de los datos analíticos con los valores declarados por el fabricante en el etiquetado

En España, la práctica de fortificación de alimentos con ácido fólico se realiza de forma voluntaria y, por tanto, los resultados obtenidos en cuanto a valores de folato total y ácido fólico de cada producto sólo pudieron compararse con los valores declarados por el fabricante en el etiquetado del correspondiente envase. Los valores resultantes de ácido fólico cuantificado por cromatografía de afinidad-HPLC se compararon con el valor declarado para el ácido fólico en el etiquetado (μg de ácido fólico/100 g de producto). Todas las muestras se extrajeron y analizaron de forma independiente y por duplicado como mínimo. Los resultados se presentan como la media e intervalo de confianza.

La comparación los resultados obtenidos se realizó mediante la agrupación de las muestras según los criterios del nivel de fortificación (1 al 4). Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los valores. Los resultados de folato total se compararon con los valores declarados mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas, estableciendo como nivel de significación $p < 0,001$. El análisis estadístico de datos se realizó con el programa informático SPSS 17.0 para Windows®.

2.2.8. Inclusión en la Base de Datos de los resultados analíticos

Para la inclusión estandarizada de los datos obtenidos por ambos métodos, para los 154 alimentos analizados, se utilizó los identificadores para los distintos vitámeros de folatos según lo recomendado por el tesoro EuroFIR [180].

Tabla 11. *Vitámeros analizados en los alimentos fortificados con ácido fólico y equivalencias*

Identificador	Descriptor EuroFIR
FOLAC	Ácido fólico, sintético
FOLH4ME5	5-metiltetrahidrofolato
FOL	Folato, total ^a

^a Obtenido mediante el método microbiológico

3. ESTIMACIÓN DE LA INGESTA DE ÁCIDO FÓLICO A TRAVÉS DE LOS ALIMENTOS FORTIFICADOS: MODELOS DE SIMULACIÓN INCLUYENDO ALIMENTOS FORTIFICADOS CON ÁCIDO FÓLICO.

3.1. Modelos de simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico

3.1.1. Simulación de ingesta mediante el diseño de desayunos que incluyen alimentos fortificados con ácido fólico

La mayor parte de los alimentos analizados en el presente trabajo pueden formar parte del desayuno, bien de forma individual o conjunta, dependiendo de los hábitos de consumo de los distintos grupos de población. De hecho, las recomendaciones actuales para el diseño de una dieta equilibrada y saludable sugieren realizar a diario un desayuno completo que incluya alimentos de al menos tres grupos: cereales y derivados, lácteos y derivados y frutas o zumos naturales [209]. Por ello se consideró interesante simular la inclusión potencial de los alimentos fortificados con ácido fólico en la dieta en forma de distintos menús de desayuno, para evaluar la adecuación de estos a los requerimientos de folatos para los distintos grupos de edad y compararlos con los aportes de un desayuno sin alimentos fortificados con ácido fólico. De esta forma, el primer modelo de simulación de ingesta se basó en los modelos publicados por la Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda para la evaluación de la fortificación voluntaria [41] y los modelos publicados por Verkaik-Kloosterman y cols. [210, 211].

Se diseñaron 10 modelos de desayunos con distintas combinaciones de alimentos y basados en los ejemplos propuestos en a la *Guía de la Alimentación Saludable* publicada por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) [209]. En estos se incluyeron uno, dos o tres alimentos de cada uno de los grupos analizados y para los cuatro niveles de fortificación con ácido fólico.

De acuerdo con Ortega y cols. [212], el desayuno debe aportar $\geq 20\%$ de la energía total consumida al día, por lo que se calcularon estos valores para las Ingestas Recomendadas de energía (kcal/día) de los grupos de población

estudiados [138]. Además, se calculó el aporte energético de los productos fortificados analizados y utilizados en la simulación, de acuerdo a los valores del etiquetado nutricional (kcal/100 g).

Los restantes alimentos seleccionados como parte del desayuno fueron los procedentes de los grupos recomendados por la SENC [209]: frutas y derivados, cereales y lácteos y derivados. Los datos de composición en energía y folatos naturales de dichos alimentos, se obtuvieron de las Tablas de Composición de Alimentos de Moreiras y cols. [91].

Las raciones habituales de consumo de los alimentos, para adultos y niños de más de 10 años se establecieron de acuerdo a Alcoriza y cols. [213] y Moreiras y cols. [91]. Para los niños hasta los 6 años se estimó que las raciones pueden estimarse como el 60% de establecidas para el adulto, aumentando un 10% por cada año de edad hasta los 10 años [91].

3.1.2. Simulación de ingesta mediante la utilización de datos de consumo de alimentos en población española

Verkaik-Kloosterman y cols. [211] publicaron en 2007 un protocolo sistemático para la simulación de la ingesta de ácido fólico a través de la fortificación de los alimentos, para la estimación de los niveles de ingesta de ácido fólico y folatos de la población. A continuación se describen las siete fases que incluyen:

1. Definición de la estrategia de fortificación
2. Identificación de los tipos de alimentos fortificados
3. Establecimiento de los niveles de fortificación
4. Obtención de los datos de composición de los alimentos (calidad)
5. Datos de consumo de alimentos
6. Aplicación del modelo de simulación
7. Cálculo y evaluación de la ingesta total habitual

1. Definición de la estrategia de fortificación

En el caso que estudiamos, la estrategia de fortificación con ácido fólico es la voluntaria. No se consideraron los aportes potenciales de ácido fólico provenientes de suplementos vitamínicos.

2. Identificación de los tipos de alimentos fortificados

A partir de los datos recopilados en la Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico definimos los grupos de alimentos mayoritarios presentes en el mercado. Éstos, fueron los seleccionados para el análisis de contenido en ácido fólico y folatos.

3. Establecimiento de los niveles de fortificación

Estudiando los valores de contenido en folatos y ácido fólico obtenidos en el total de los alimentos analizados (n=154), se aplicaron los cuatro Niveles de Fortificación arbitrarios establecidos para los alimentos fortificados que componen la Base de Datos, así, para cada nivel se calculó la media de ácido fólico y folatos totales ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) y la desviación típica.

4. Obtención los datos de composición de los alimentos

En el presente estudio se obtuvieron los contenidos medios de los alimentos fortificados con ácido fólico de forma analítica, los valores se expresaron como folatos totales, ácido fólico sintético o 5-metiltetrahidrofolato (folatos naturales).

- **Ácido fólico** cuantificado por el método de cromatografía de afinidad-HPLC. Se utilizaron los valores medios por ración declarada para cada uno de los cuatro Niveles de Fortificación establecidos en los “criterios de clasificación” expuestos en la **Tabla 9** del **Apartado 1.2**.
- **5-metiltetrahidrofolato** cuantificado por el método de cromatografía de afinidad-HPLC.

5. Datos de consumo de alimentos

Utilizamos los datos de consumo de alimentos en la población española, publicados como parte de los siguientes estudios:

- Encuesta de Nutrición de la Comunidad de Madrid en población adulta (ENUCAM) (2009) [3].
- Hábitos alimentarios y consumo de alimentos en la población infantil y juvenil española (Estudio enKid) (1998-2000) [2]. Estos datos vienen expresados en gramos de alimentos consumidos al día, como media y percentiles (P10 - P90) para distintos rangos de edad.

Para la evaluación de la dieta media habitual de la población española, contamos con estudios de los cuales se derivan los datos de ingesta de folatos. Los Datos del Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) que conjuntamente con la Fundación Española de la Nutrición (FEN) evaluaron la calidad de la dieta de los Españoles [27] indican que la dieta española media no aporta más del 50% de las IR de folatos, tanto en mujeres como en hombres adultos. Es importante indicar que en este estudio se utilizan datos de disponibilidad de alimentos, por lo que podría existir sobre-estimación en determinados grupos de población.

El trabajo titulado *“Valoración de la Dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario”* ha sido diseñado para evaluar los patrones dietéticos y el estatus nutricional de la población española entre los años 2000 y 2006, incluye los hábitos de consumo alimentario de hogares, restauración e instituciones y es un trabajo que se viene realizando hace mas de 20 años, por lo que representa una fuente fiable para definir las principales deficiencias o excesos de la dieta con objeto de promover la dieta saludable [27].

Entre los resultados de éste trabajo tenemos la cantidad media en gramos de cada grupo de alimentos consumida por el español medio al día (hombres y mujeres). A partir de estos valores, y sustituyendo determinados grupos de alimentos por sus equivalentes fortificados con ácido fólico, se calculó la contribución de los mismos a los requerimientos diarios de la vitamina en el contexto de la dieta media en España.

Tabla 12. Revisión de Estudios de Consumo de Alimentos en la población Europea y Española.

Nombre y tipo de Estudio	Población (n)	Nivel	Métodos de valoración de la Ingesta	Ingesta media folatos ^a (µg/día)		Autores y Referencias
				R24h	CFCA	
Estudio ENUCAM (2009)	N=1553 H/M, >18, ≥65	Comunidad de Madrid	Recuerdo de 24 horas CFCA, Encuesta de salud y hábitos, consumo suplementos	H: 233,2 ± 141,8 M: 234,9 ± 125,1	H: 338,7 ± 148 M: 341,6 ± 143,2	Ruiz-Moreno y cols. [3]
Valoración dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario (2007-2008)	N= 8000 hogares H/M,	Nacional	Compra de alimentos en el hogar, encuestas telefónicas	234		Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [27] [28]
Estudio enKid (Transversal) (1998-2000)	N = 3534 H/M, 2-24 años	Nacional	Recuerdo de 24 horas CFCA, Encuesta de hábitos	H: 161,6 ± 42,4 (96,9-232,6) M: 144,9 ± 32,9 (92,7-199,2)		Aranceta Bartrina y cols. [2, 162]

R24h: Recuerdo de 24 horas, CFCA: Cuestionario de Frecuencia de Consumo de alimentos, N: número de participantes, H/M: hombres/mujeres, ^a Estimación folatos total de la dieta, media ± desviación estándar (límite inferior P5 y superior P95).

6. Aplicación del modelo de simulación

Para realizar la estimación de la exposición potencial de la población al ácido fólico a través de los alimentos fortificados, llevamos a cabo una simulación teórica basada en la sustitución de determinados alimentos sin fortificar por los datos de dichos alimentos de ácido fólico y 5-MTHF obtenidos de forma analítica. A partir de los datos de ingesta media de alimentos en los distintos grupos de población y los datos analíticos obtenidos se calcularon las ingestas teóricas de ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato.

7. Cálculo y evaluación de la ingesta total habitual

Para evaluar la adecuación de las ingestas de ácido fólico de los distintos grupos de población estudiados, una vez obtenidos los $\mu\text{g}/\text{día}$ de ácido fólico, utilizamos los niveles de Ingestas Recomendadas según género, edad y situación fisiológica, revisados para la población española por Moreiras y cols. en 2011 [138]; para calcular el porcentaje que aportan dichos alimentos. Por otro lado, se utilizaron los Niveles Máximos de Ingesta (NMT) establecidos en el 2000 por el Comité Científico de la UE [78] para la estimación de la ingesta excesiva de ácido fólico, considerando una ingesta excesiva de ácido fólico a partir del 100% de los NMT.

3.2. Evaluación de la adecuación de la ingesta de ácido fólico a los valores de referencia de ingesta para distintos grupos de población

Una vez realizados los modelos de simulación de ingesta en sus diferentes modalidades, se calculó el porcentaje adecuación a los valores de referencia de ingesta de ácido fólico utilizando las Ingestas Recomendadas para población española (IR) y el aporte al Nivel Máximo Tolerable de ingesta (NMT) para los grupos de población que se presentan en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Grupos de población estudiados en los modelos de simulación de ingesta

Grupo	Rangos de edad referenciados	
	Estudios de consumo enKid [2] y ENUCAM [3]	Simulación desayuno [138]
Infantil y adolescente	2 a 5	1 a 3
	6 a 9	4 a 5
	10 a 13	6 a 9
		10 a 12
		13 a 15
Mujeres	18 a 24	16 a 49
	25 a 34	Gestación
	35 a 44	Lactancia
	45 a 65	50 a 59
	≥ 65	≥ 60
Hombres	18 a 44	16 a 49
	45 a 65	50 a 59
	≥ 65	≥ 60

Los valores asociados a los NMT están expresados en microgramos de ácido fólico sintético (procedente de suplementos y alimentos fortificados) [78], por tanto, se utilizaron los datos analíticos correspondientes con éste vitámero, obtenidos mediante la metodología de cromatografía de afinidad-HPLC para evaluar el aporte de los alimentos fortificados tanto a las IR para la población española como a los NMT.

IV. RESULTADOS

1. DESARROLLO, SEGUIMIENTO Y ACTUALIZACIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE ALIMENTOS FORTIFICADOS CON ÁCIDO FÓLICO

1.1. Actualización del diseño y estructura de la Base de Datos

La Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico diseñada se compone de tablas de contenidos relacionadas entre sí (**Figura 8**). En cada una de estas tablas se almacenan los datos de los alimentos recopilados en el inventario. Gracias a dicha organización es posible almacenar, actualizar y extraer los datos de una forma simple y estandarizada.

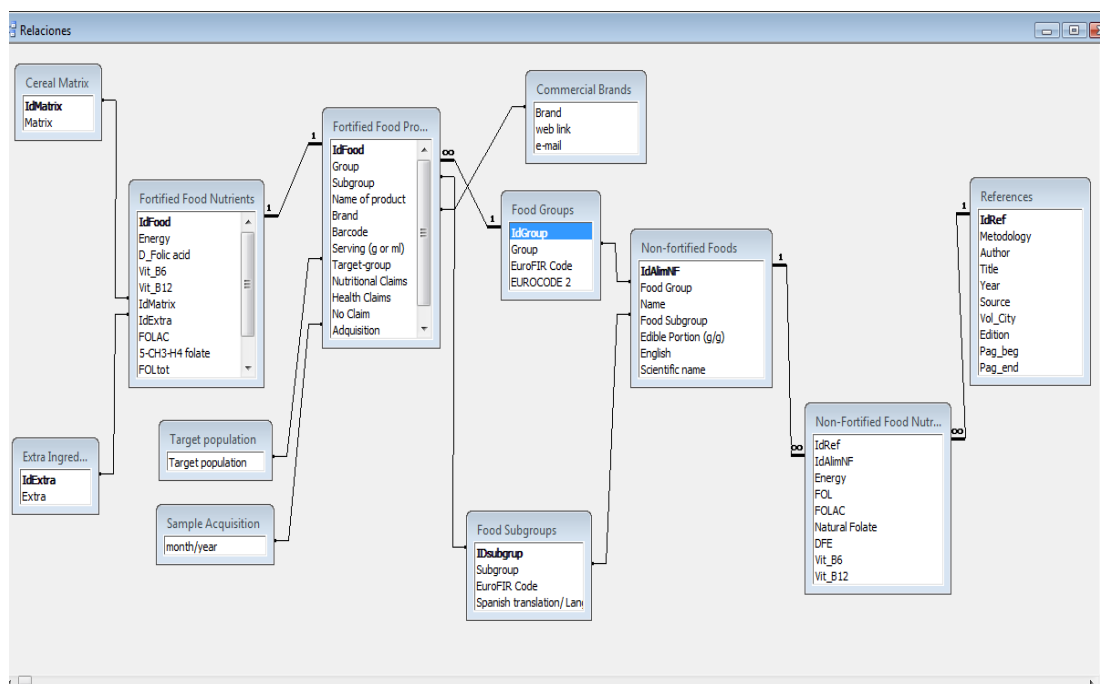


Figura 8. Pantalla de Access 2000: relaciones de la Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico.

La Base de Datos de contenido en folatos y ácido fólico que fue publicada en 2009 [214], se ha reestructurado y codificado de acuerdo a la clasificación EuroFIR/LanguaL para grupos y subgrupos de alimentos [215]. Los contenidos se presentan en inglés y español. Se mantiene en español el nombre comercial original del producto, pero su clasificación, subgrupo, etc., se presentan en inglés y con las denominaciones propuestas por EuroFIR/LanguaL [215], de esta manera se facilita la comparación con datos de otras bases de datos. Todos los contenidos de la Base de Datos se presentan como archivo en formato digital adjunto a este trabajo (CD), para ser ejecutado con el programa Access 2000[®].

1.2. Inventario de alimentos fortificados con ácido fólico

En el presente trabajo se incluyen los resultados obtenidos a partir del inventario de alimentos fortificados con ácido fólico llevado a cabo en el Municipio de Madrid Capital durante un periodo de 30 meses, entre diciembre de 2007 y mayo de 2010. Dicho inventario pasó a completar el inventario previo obtenido entre septiembre de 2006 y mayo de 2007 [12] (**Tabla 14**). Se recopiló la información de 375 alimentos fortificados con ácido fólico. El tipo de establecimiento donde se encontró mayor variedad de productos fortificados, fueron las grandes superficies que, son a la vez, el lugar de elección por el consumidor de acuerdo al MAGRAMA [184]. Con objeto de contrastar la información recogida en los establecimientos se realizaron búsquedas en las páginas web de las principales marcas de fabricante y de establecimientos de venta de alimentos.

Tabla 14. Estudio de mercado para la actualización de la Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico.

Fechas	Establecimientos visitados	Nuevos Alimentos fortificados incluidos
Inventario previo (Septiembre 2006-Mayo 2007)	8	277
Diciembre 2007	8	4
Agosto 2008	5	42
Abril 2009	5	40
Mayo 2010	8	12
Total alimentos fortificados		375

Los tipos de establecimientos visitados fueron:

- Grandes superficies o Hipermercados, situados a las afueras de los núcleos urbanos
- Supermercados de barrio
- Tiendas de descuento de barrio

1.3. Grupos de alimentos y nivel de fortificación con ácido fólico

1.3.1. Distribución de grupos de alimentos

Los 375 alimentos incluidos fueron clasificados según el "LanguaL Thesaurus EuroFIR classification system" [215] (Anexo I). Así, se dividieron en 6 grupos principales (Figura 9) y 17 subgrupos de alimentos. Los *cereales y derivados de cereales* (46%) seguidos de los *productos para usos nutricionales especiales* (25%) y la *leche, derivados y sustitutos de la leche* (21%) fueron los grupos mayoritarios encontrados en el mercado.

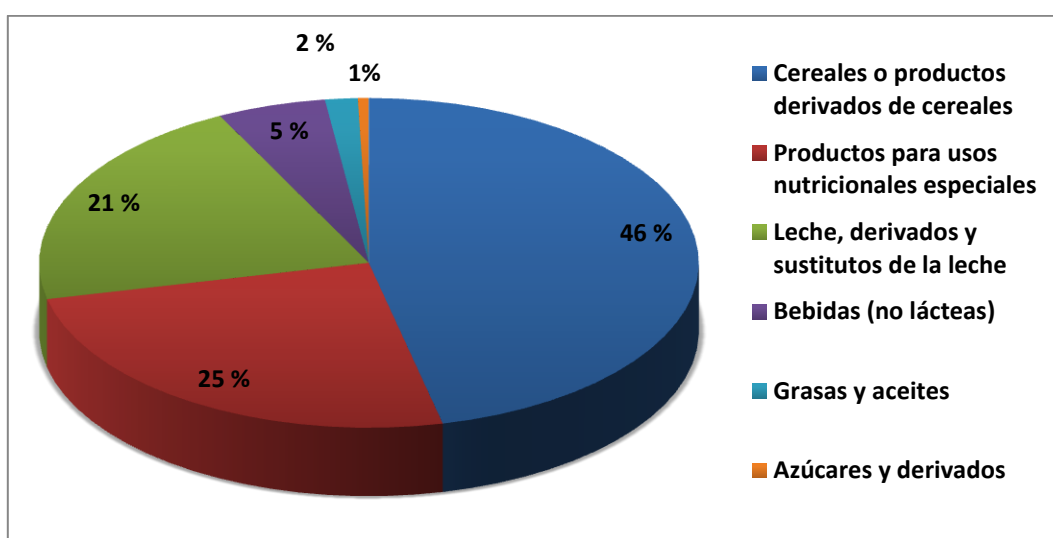


Figura 9. Distribución en grupos de los alimentos fortificados con ácido fólico que conforman la Base de Datos.

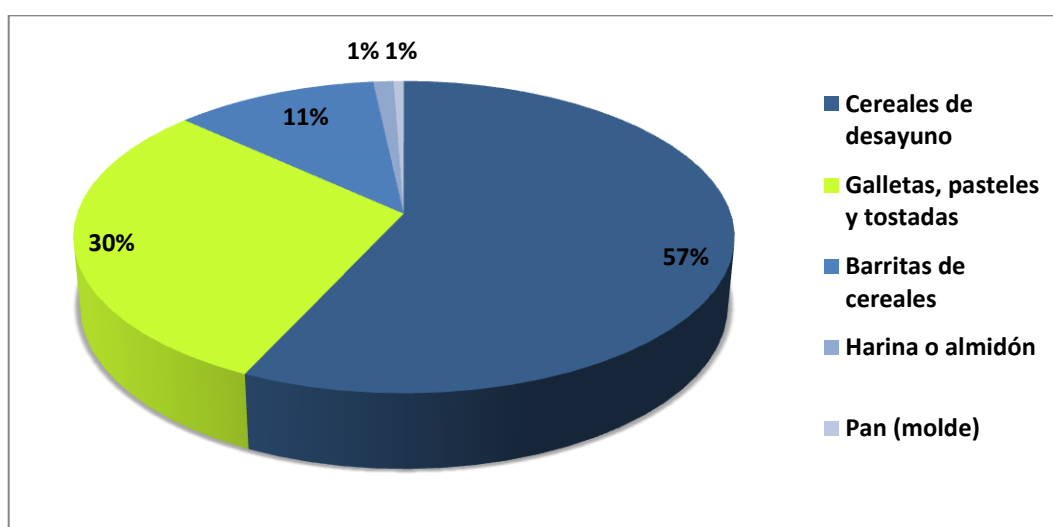
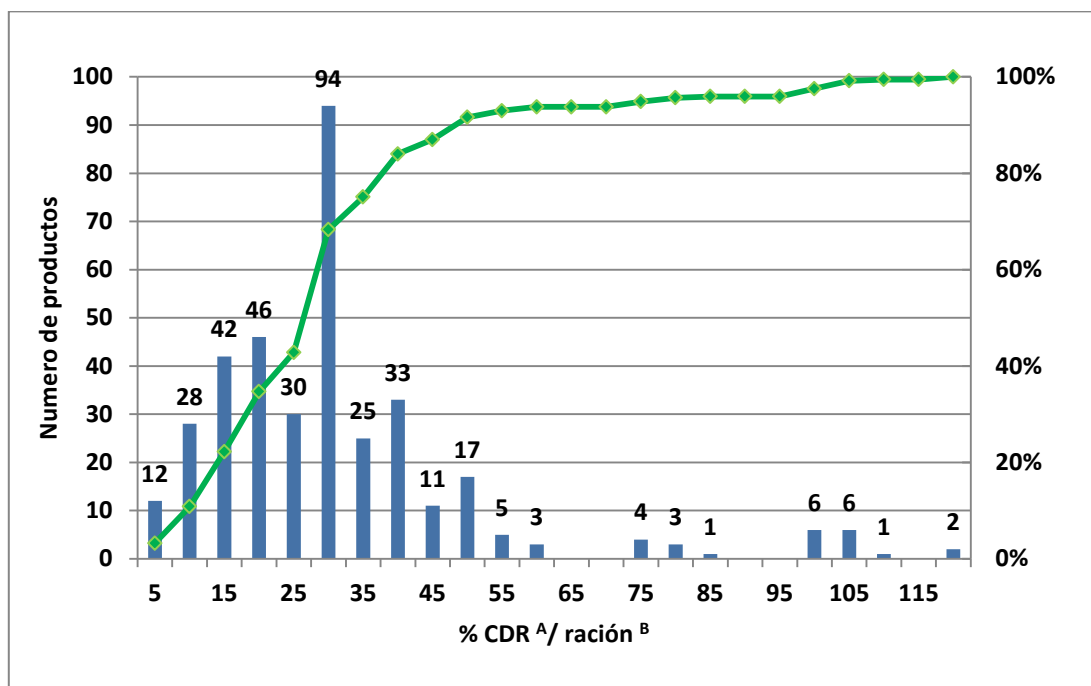


Figura 10. Distribución de subgrupos de alimentos dentro del grupo de cereales y derivados fortificados con ácido fólico que conforman la Base de Datos.

Los grupos de alimentos fortificados incluidos en la Base de Datos presentan diversos niveles de fortificación con ácido fólico y vitaminas declarados por el fabricante, y que de acuerdo a la legislación vigente deben contener $\geq 15\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de ácido fólico (200 μg) o de las vitaminas declaradas, por 100 g, ml o ración si se trata de porciones individuales [172].



^A Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 μg) [172]. ^B Declarada por el fabricante en el etiquetado nutricional.

Figura 11. Distribución de los niveles de fortificación que presentan los alimentos fortificados con ácido fólico.

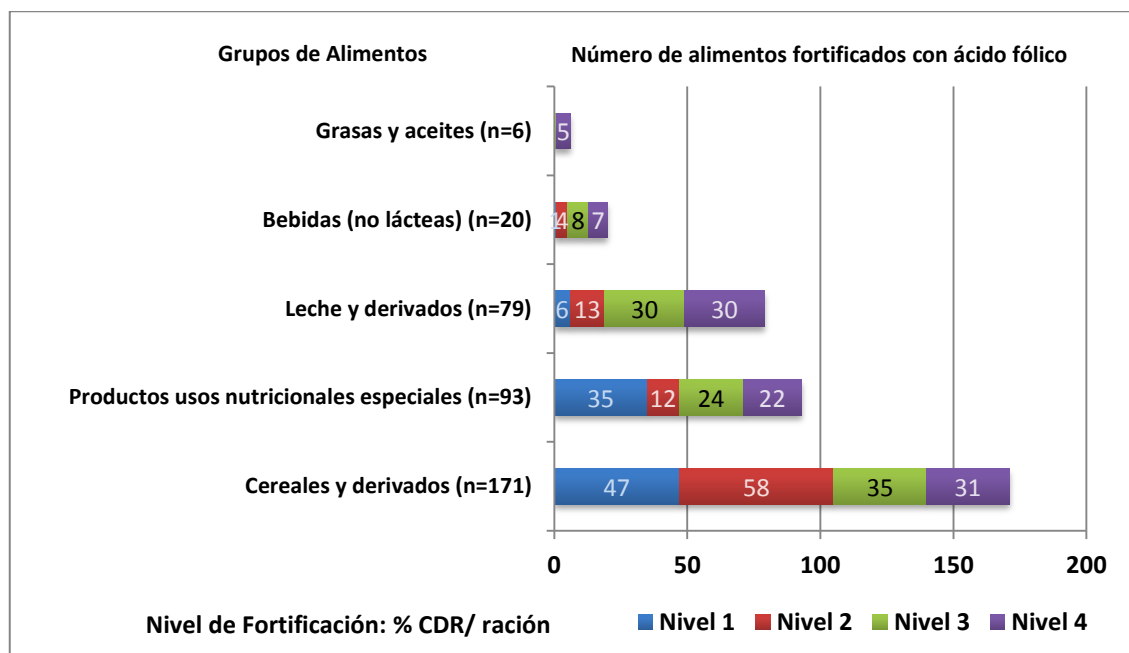
En la **Figura 11** se presenta el histograma de distribución de los niveles de fortificación de los alimentos inventariados en la Base de Datos. El 75% de los alimentos fortificados con ácido fólico presenta un porcentaje $\leq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de ácido fólico por ración (n=277). Se realizó una segmentación de los alimentos en cuatro Niveles de fortificación atendiendo al criterio del porcentaje de la CDR aportado por ración (**Tabla 15**), utilizando para tal fin los valores aportados por el fabricante en el etiquetado de los alimentos. De este modo se obtuvo un número equivalente de alimentos en cada Nivel de fortificación a partir del cual calcular los valores medios.

Tabla 15. Criterio de clasificación para los alimentos fortificados con ácido fólico de la Base de Datos de acuerdo a la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) que aportan por ración declarada.

Nivel	Ácido fólico ^A por ración ^B (µg)	% de la CDR de ácido fólico ^A por ración ^B	Número de productos en la BB DD	% del total de productos de la BB DD
1	≤ 33	≤ 16 %	89	24,3
2	33,1-51	16,1 – 25,9 %	87	23,5
3	51,1-70	26 – 34,9 %	98	26,5
4	≥ 70,1	≥ 35 %	95	25,7

^A Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172]. ^B Declarada por el fabricante en el etiquetado nutricional.

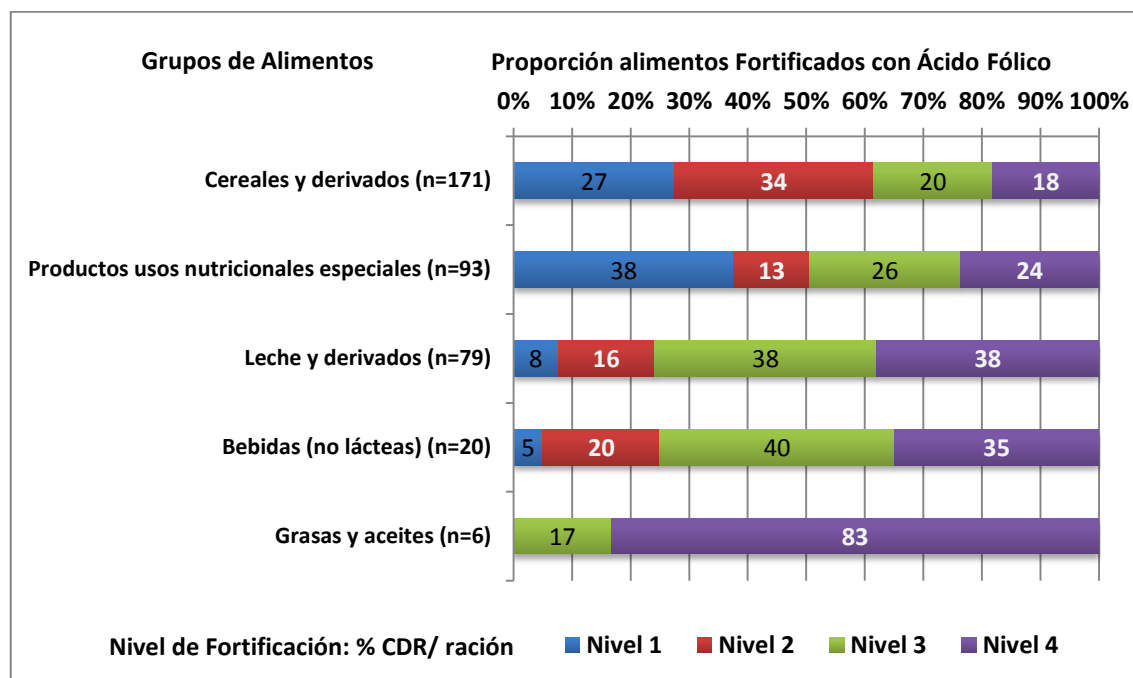
Una vez definidos los Niveles de fortificación se clasificaron los alimentos inventariados en la Base de Datos para conocer las proporciones de los distintos grupos de alimentos. En las **Figuras 12** y **13** se observa que más de la mitad de los *cereales y derivados* (105/171), grupo mayoritario en la Base de Datos, presentan niveles de fortificación 1 y 2, es decir que aportan hasta un 25,9% de la CDR de ácido fólico por ración.



Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 12. Distribución de los Niveles de fortificación con ácido fólico en los grupos de alimentos de la Base de Datos.

La situación contraria se observa en la *leche y derivados* donde la mayoría de los alimentos (60/79) se encuentran fortificados en los niveles 3 y 4, aportando entre 26 y $\geq 35\%$ de la CDR/ración. El grupo de los *azúcares y derivados* fue excluido de estos análisis al estar compuesto únicamente 2 productos.



Nivel 1: $\leq 16\%$, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 μg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 13. Distribución de los grupos de alimentos fortificados de acuerdo a los niveles de fortificación con ácido fólico.

Dentro del grupo de *grasas y aceites*, constituido en su totalidad por *grasas vegetales o de origen mixto* (margarinas) el nivel de fortificación predominante es el Nivel 4 aportando más del 35% de las CDR de ácido fólico por ración. Los *cereales y derivados* son el grupo que presenta menor porcentaje de alimentos fortificados en este nivel. Los *productos para usos nutricionales especiales*, que incluyen de forma mayoritaria *alimentos para la reducción de peso y fórmulas infantiles y de continuación* es el grupo que presenta mayor proporción de alimentos fortificados con el Nivel 1, aportando $\leq 16\%$ de la CDR/ración. Por el contrario el grupo de *leche y derivados y bebidas (no lácteas)* son los que presentan menor proporción de productos fortificados a este nivel. En la legislación europea no existen estipulados niveles máximos de adición de vitaminas para los alimentos fortificados. La excepción son las *fórmulas*

infantiles y de continuación donde la legislación establece un contenido máximo 50 µg de ácido fólico por 100 Kcal de producto en lugar de por 100 g [216]. Los productos de esta categoría encontrados en el mercado (n=38) cumplen con este límite declarando entre 5 y 30 µg de ácido fólico por 100 kcal (**Tabla 16**) si bien los valores del etiquetado aparecen expresados por 100 g o por ración de consumo (entre 6 y 70 µg/100 g).

Tabla 16. Valores de ácido fólico declarados para Fórmulas infantiles y de continuación.

Código del alimento	Ácido Fólico (µg/100 g)	Energía (kcal/100 g)	Ácido Fólico (µg/100 kcal)
NES03	19	380	5,0
NES02	19	375	5,1
NES07	19	373	5,1
PUL12	6	93	6,5
PUL13	6	93	6,5
PUL11	6	66	9,1
PUL01	38	375	10,1
MIL02	11	106	10,4
MIL01	41	364	11,3
HER08	15	118	12,7
HER02	15	112	13,4
HER04	15	110	13,6
HER05	15	110	13,6
MIL03	50	367	13,6
NES23	55	379	14,5
NES04	60	386	15,5
HER03	16	92	17,4
HER11	15	85	17,6
HER09	15	84	17,9
HER10	15	81	18,5
HER01	70	369	19,0
PUL09	15	65	23,1
NES19	26	90	28,9
NES12	29	98	29,6
NES17	21	71	29,6
NES18	27	91	29,7
NES15	21	70	30,0
NES16	24	80	30,0
NES06	29	96	30,2
NES10	28	93	30,1
NES11	29	96	30,2
NES13	29	96	30,2
NES14	29	95	30,5
NES09	29	94	30,9

1.3.2. Fortificación con ácido fólico y fortificación conjunta con B₆ y B₁₂

Se estudió también el contenido en ácido fólico declarado por el fabricante por 100 g de producto, ya que es la forma de expresión utilizada en las Tablas y las bases de datos de Composición de Alimentos. En la **Tabla 17** se presentan los niveles de fortificación declarados por el fabricante y recogidos del etiquetado nutricional de los productos, expresados como media de n productos en cada grupo/subgrupo \pm la desviación estándar, también se expone el porcentaje de la CDR de las vitaminas relacionadas metabólicamente con el ácido fólico, la B₁₂ y la B₆. Este fue variable de acuerdo al grupo de alimentos, siendo mayor en el caso de las *grasas y aceites*, y en de los *productos para usos nutricionales especiales*, y menor en la *leche y derivados*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que dichos contenidos en vitamina suele ser inversamente proporcional a las raciones recomendadas por el fabricante; es decir, a mayor ración recomendada, menor contenido en ácido fólico declarado por 100 g y viceversa, así, nos encontraremos mayores concentraciones de ácido fólico declarado por 100 g en aquellos alimentos que se consumen en raciones más pequeñas, como las margarinas y grasas vegetales (**Tabla 17**). Nos interesó también conocer el nivel de fortificación conjunta con otros nutrientes, seleccionando las vitaminas B₆ y B₁₂ por estar relacionadas con las funciones metabólicas del ácido fólico en el organismo [19]. En el 86% de los productos fortificados con ácido fólico se observó la fortificación conjunta con vitaminas B₆ y/o B₁₂. De forma mayoritaria, en el grupo de *grasas y aceites* y en los subgrupos de *cereales de desayuno*, *barritas de cereales*, el de *yogures y leches fermentadas*, así como en las *fórmulas infantiles y de continuación*.

Se calculó el porcentaje de las Cantidades Diarias Recomendadas (CDR) de estas vitaminas para conocer su adecuación a la legislación que establece que un alimento puede declarar el contenido en estos nutrientes si “contiene una cantidad significativa” de los mismos por 100 g o por ración si el envase es individual [186], dicha cantidad se encuentra fijada en un 15% de la CDR por 100 g o por ración. Se observó que en el caso de las *fórmulas infantiles y de continuación* así como en la *leche y yogures y los zumos y néctares*, la cantidad añadida de vitamina B₁₂ por el fabricante es significativamente inferior a la de ácido fólico y B₆ (**Tabla 17**).

Tabla 17. Contenido en ácido fólico y fortificación conjunta con vitaminas B₆ y B₁₂ de los alimentos fortificados con ácido fólico declarados por el fabricante por 100 g de producto.

Grupos de Alimentos	Subgrupos	N ₁	AF µg /100 g	% CDR/ 100 g	N ₂	B ₆ mg/100 g	% CDR/ 100 g	B ₁₂ µg /100 g	% CDR/ 100 g
Cereales o productos derivados de cereales	Pan (molde)	1	30	15	1	0,3	21	ND	-
	Cereales de desayuno	99	197 ± 60,7	99	97	1,8 ± 0,6	129	0,9 ± 0,3	36
	Galletas, pasteles y tostadas	52	91,8 ± 38,7	46	30	0,8 ± 0,6	57	0,4 ± 0,3	16
	Barritas de cereales	20	141,4 ± 30	73	19	1,4 ± 0,3	98	0,7 ± 0,2	27
	Harina o almidón	2	60	30	-	ND	-	ND	-
	Subtotal	174			147				
Productos para usos nutricionales especiales	Complementos dietéticos	5	1833 ± 1490	917	1	ND	-	1,7	78
	Alimentos para la reducción de peso	51	119,2 ± 96,5	60	46	1,36 ± 1,5	97	0,7 ± 0,6	28
	Fórmulas infantiles y de continuación	38	25,2 ± 15,2	13	38	0,21 ± 0,14	15	0,22 ± 0,13	9
	Subtotal	94			85				
Leche, derivados y sustitutos de la leche	Quesos	1	30	15	1	0,3	21	0,15	6
	Leche (líquida)	34	34,8 ± 14,4	17	28	0,3	21	0,19 ± 0,08	8
	Yogures y leches fermentadas	22	71,8 ± 100	36	22	0,4 ± 0,23	29	0,2 ± 0,03	8
	Preparados lácteos (tipo ω-3)	22	92 ± 108	46	18	0,6 ± 0,25	41	0,28 ± 0,11	11
	Subtotal	79			69				
Bebidas (no lácteas)	Zumos o néctares	14	38,7 ± 22,4	19	11	0,4 ± 0,3	29	0,2 ± 0,1	7
	Bebidas no alcohólicas (café, cacao y te)	6	476,6 ± 413	238	6	5,33 ± 5,27	380	1,5	60
	Subtotal	20			17				
Grasas y aceites	Margarinas o lípidos de origen mixto	2	650 ± 495	325	2	4 ± 1,4	286	3,25 ± 2,5	130
	Grasas vegetales	4	875 ± 250	438	4	5	357	4,37 ± 1,25	175
	Subtotal	6			6				
Azúcares y derivados	Chocolates	2	ND	-	-	ND	-	ND	-
Total		375			324				

N₁: número de productos fortificados con ácido fólico incluidos en cada subgrupo de alimentos; AF: ácido fólico declarado en el etiquetado por 100 g de alimento, media de N productos ± desviación estándar. N₂: número de productos fortificados conjuntamente con ácido fólico y con B₆ o B₁₂; ND: no declarado en el etiquetado del envase; CDR: Cantidades Diarias Recomendadas establecidas en el Real Decreto 930/1992 de 17 de julio [172].

1.4. Estudio de los grupos de alimentos y los niveles de fortificación con ácido fólico de acuerdo a las marcas

De los 375 alimentos fortificados inventariados 301 pertenecían a “*marcas del fabricante*” (MDF) (*retailer/ manufacturer brands*) y 74 a “*marcas de distribución*” (MDD) (*distribution brands*) también conocidas como “*marcas blancas*”. Ambos tipos de marcas presentaron distribuciones similares en cuanto a los grupos de alimentos fortificados comercializados (**Figura 14**) exceptuando al grupo de *grasas y aceites* que no se encuentra comercializado bajo marcas de distribución.

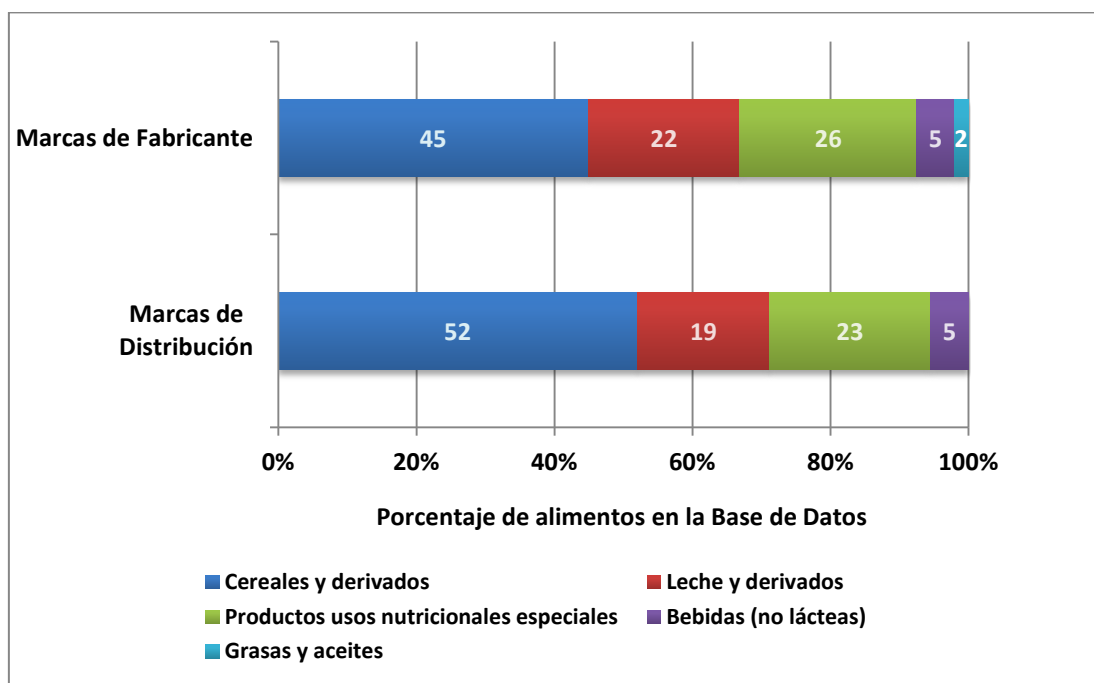
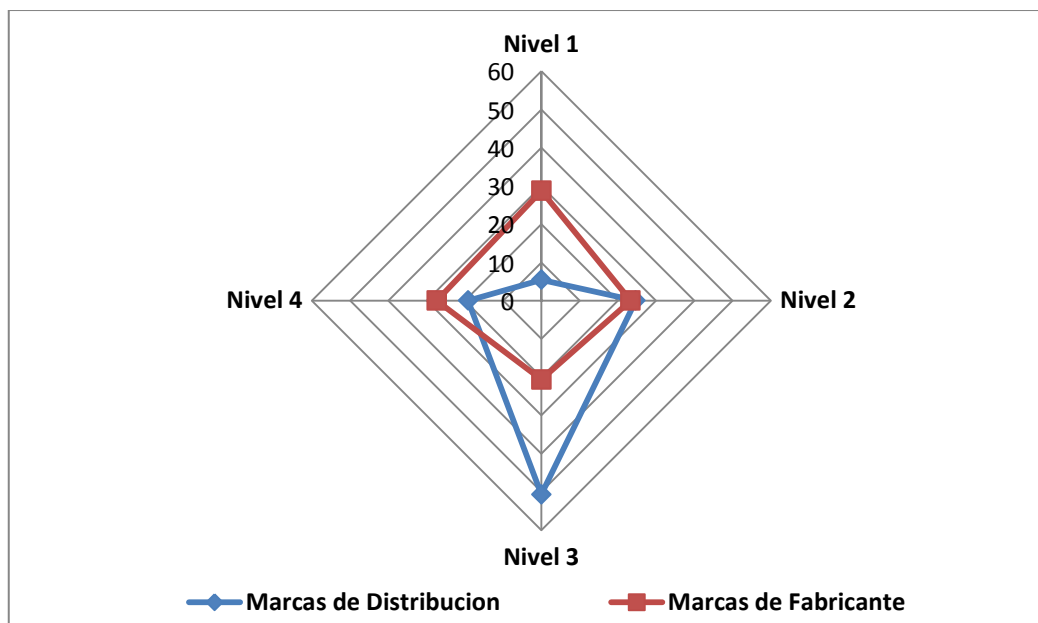


Figura 14. Distribución de los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico de acuerdo al tipo de marca bajo el cual se comercializa.

Si atendemos a los niveles de fortificación encontrados en cada tipo de marca (**Figura 15**) observamos que las marcas de fabricante presentan una distribución similar para cada nivel, mientras que las marcas de distribución comercializan una menor proporción (5%) de alimentos fortificados en el Nivel 1 y de forma mayoritaria (51%) alimentos fortificados en el Nivel 3.

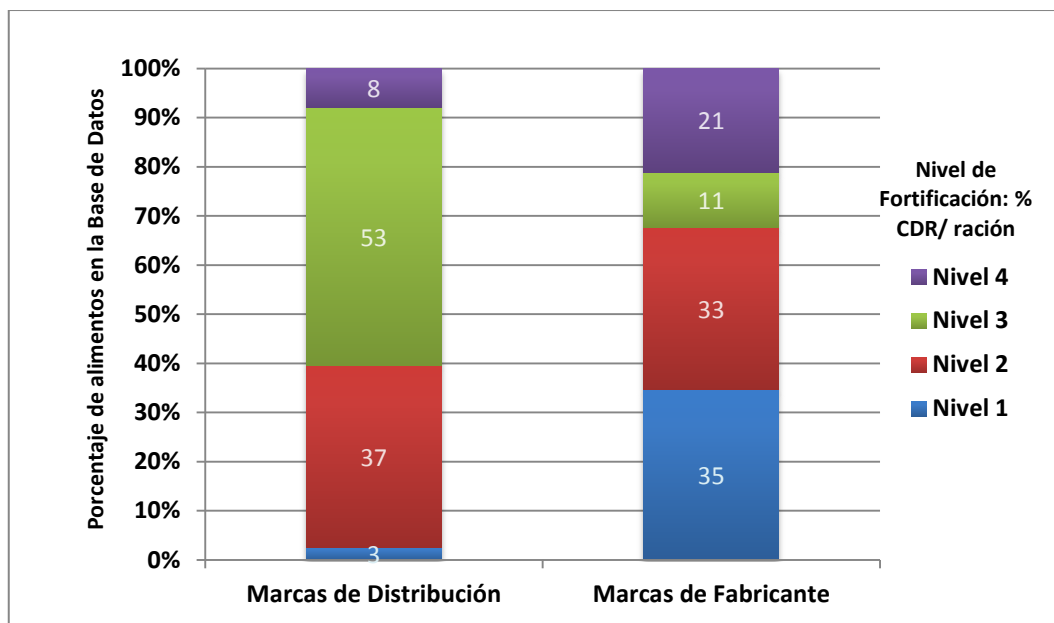


Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 μg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 15. *Marcas de distribución vs. Marcas del fabricante: distribución del nivel de fortificación de los alimentos con ácido fólico.*

Únicamente los *cereales y derivados* y los *productos para usos nutricionales especiales* son los grupos de alimentos para los cuales MDD y MDF ofrecen todos los Niveles de Fortificación (1 al 4), aunque en distinta proporción, tal como se observa en las **Figuras 16 a 19**, para dichos grupos de alimentos (que son además los mayoritarios en la Base de Datos). Del total de marcas consideradas “marcas del fabricante”, $n=41$, 7 pertenecían a marcas extranjeras: Colombianas, Estadounidenses (países con fortificación obligatoria) y Rumana. Estas marcas no declaraban el contenido en ácido fólico por 100 g aunque si lo incluían en el listado de ingredientes.

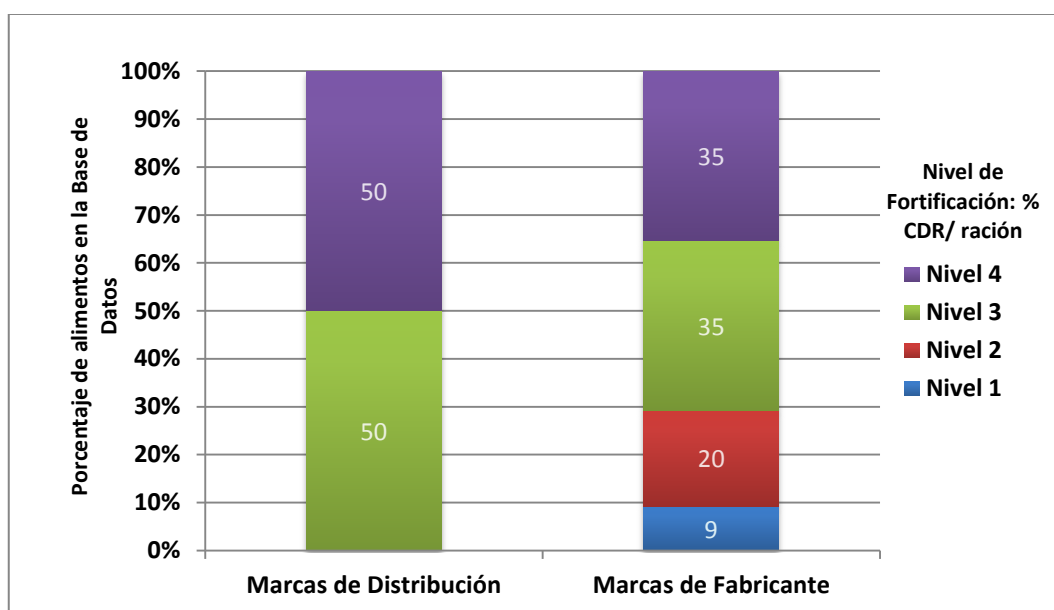
Analizando los Niveles de Fortificación que comercializa cada tipo de marca atendiendo al grupo de alimentos encontramos que los *cereales y derivados* de MDD presentaron una mayor proporción (53%) de alimentos fortificados en el Nivel 3, frente a las MDF que únicamente presentaron el 11% de sus productos en dicho nivel. Por el contrario, el Nivel 1 únicamente presentó un 3% de productos en las MDD frente al 35% en las MDF. Es también considerable la diferencia entre ambos tipos de marca para el Nivel 4 de fortificación.



Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 16. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en Cereales y derivados, según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.

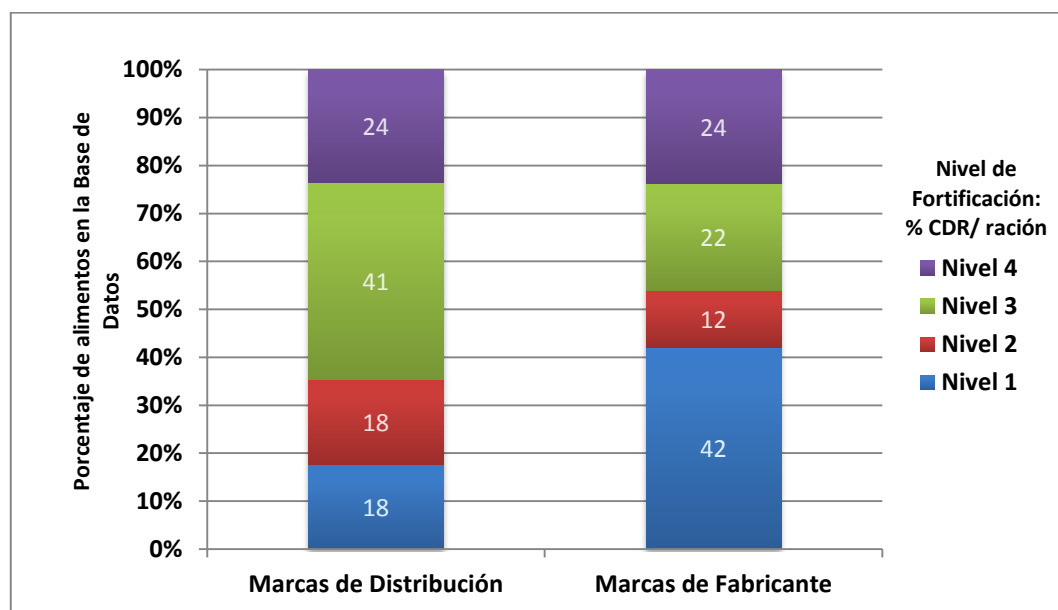
En el grupo de *leche y derivados* cabe destacar que las MDD únicamente presentan alimentos fortificados en los dos niveles superiores, si bien, las MDF también presentan mayores proporciones de alimentos fortificados en estos niveles, tal como se observa en la **Figura 17**.



Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 17. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en Leche y derivados, según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.

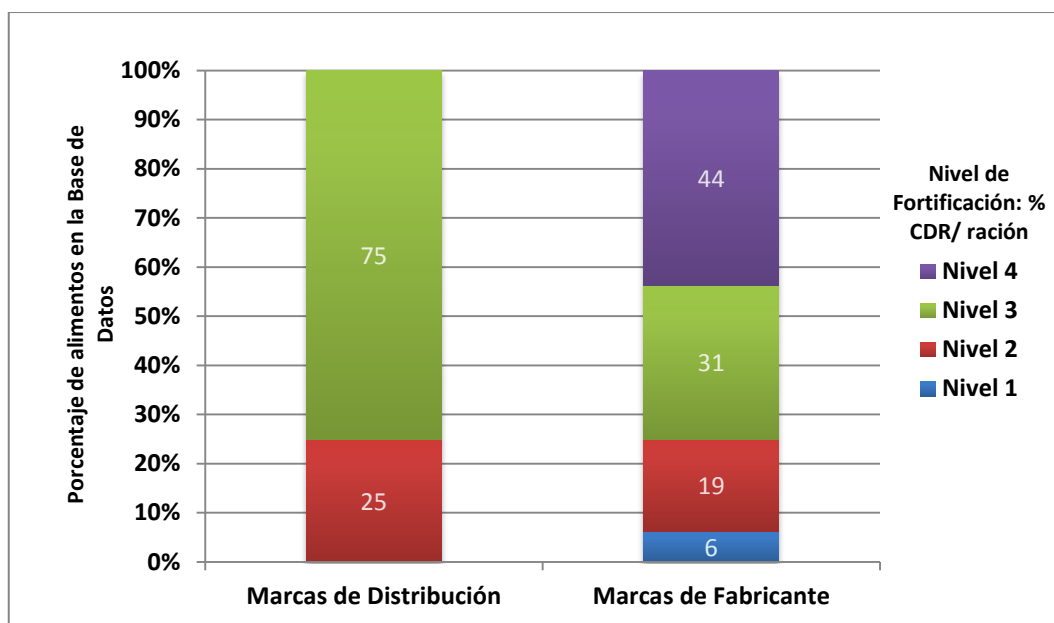
Los *productos para usos nutricionales especiales* presentan importantes diferencias en la proporción de alimentos comercializados fortificados en el Nivel 1, para los cuales presentan mayor proporción las MDF (42% frente a 18% en MDD), esta diferencia se debe a que el subgrupo de las *fórmulas infantiles y de continuación* -las cuales deben estar fortificadas a Nivel equivalente al 1 por legislación- pertenecen todas a MDF. En los alimentos de Nivel 3 de fortificación se observa por el contrario un mayor porcentaje de productos de MDD (41% frente a 22% en MDF) (Figura 18).



Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 18. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en productos para usos nutricionales especiales, según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.

En el caso de las *bebidas (no lácteas)* (Figura 19) el Nivel 3 de fortificación con ácido fólico es significativamente superior en las MDD, siendo del 75% de los productos frente al 31% en las MDF. Asimismo, las MDD carecen de alimentos fortificados con Niveles 1 y 4. Las MDF presentan la mayor proporción (44%) de las *Bebidas* que comercializan, en el Nivel 4.

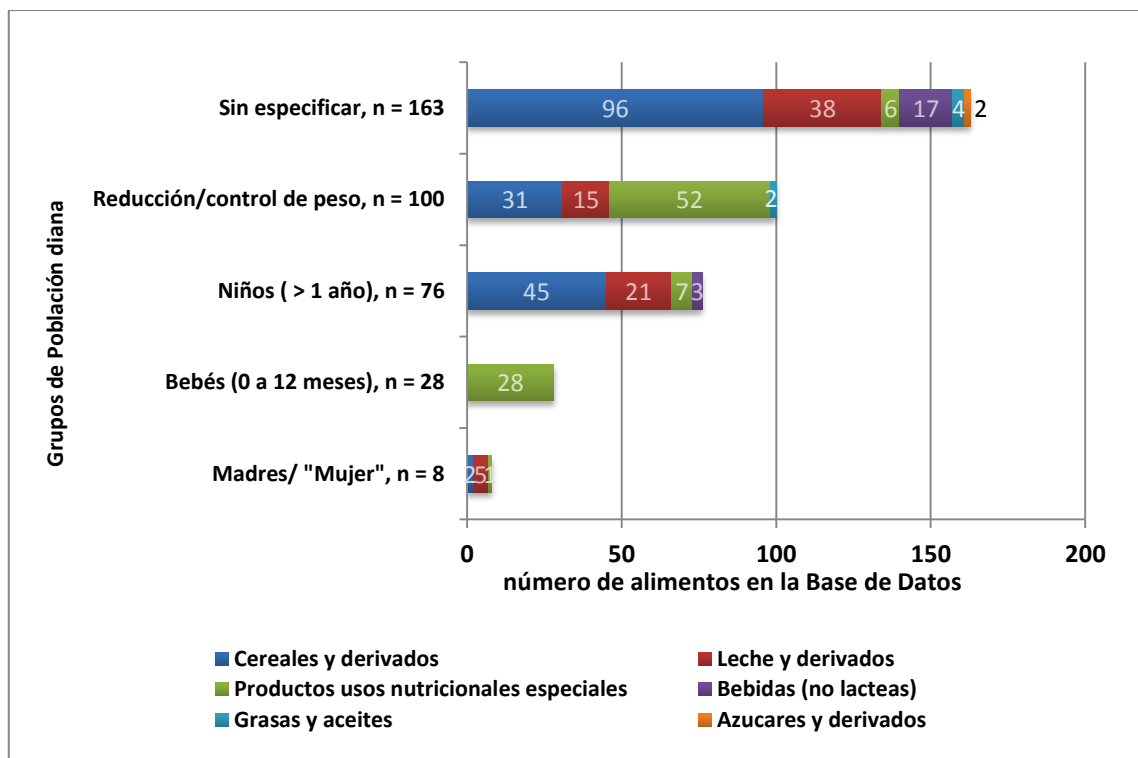


Nivel 1: $\leq 16\%$, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 μg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 19. Distribución de los niveles de fortificación con ácido fólico en Bebidas (no lácteas), según sean de Marca de Distribución o Marcas de Fabricante.

1.5. Grupos de población diana para los alimentos fortificados con ácido fólico

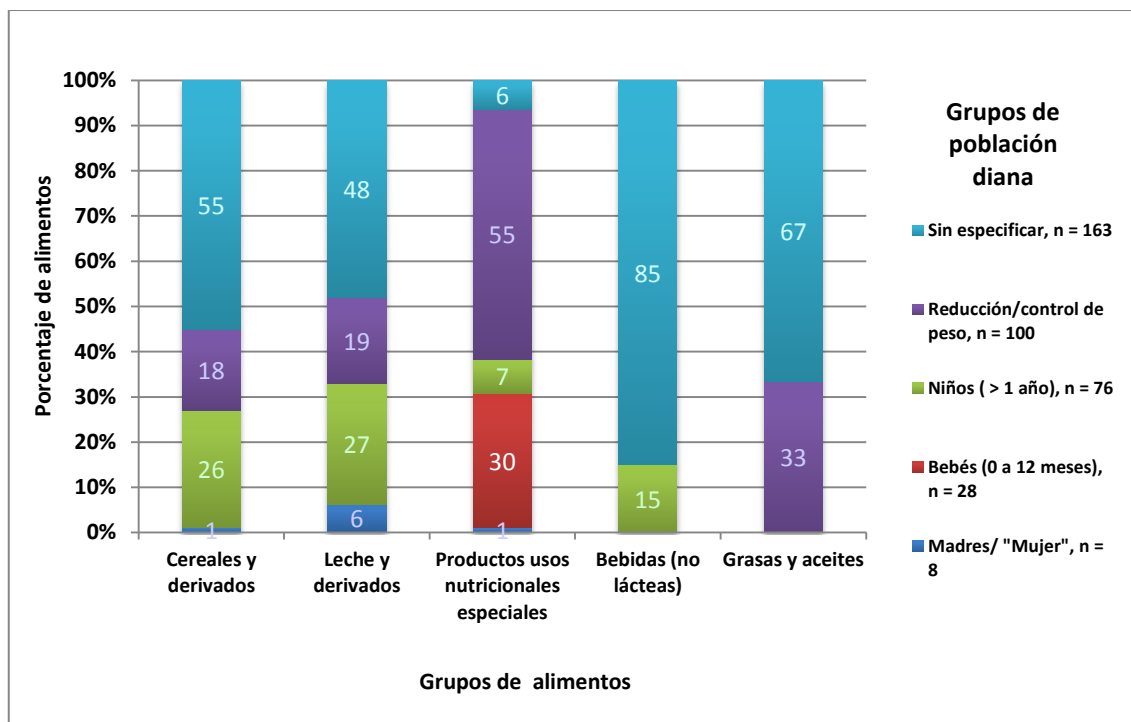
Mediante declaraciones específicas tales como “*mamá*”, “*mujer*”, “*peques*”, “*línea*” y otros elementos de marketing presentes en el etiquetado, se clasificaron los productos fortificados con ácido fólico de la Base de Datos en cuatro grupos de población diana a la que potencialmente van dirigidos. Se observó que la mayor proporción de los productos fortificados con ácido fólico inventariados carece de población diana (**Figura 20**) siendo estos un total de 163, siendo en su mayoría *cereales y derivados*. A continuación, encontramos los productos dirigidos a la *reducción y/o control de peso* (n=100) dentro del cual podemos encontrar *cereales y derivados* y *leche y derivados* que presentan las denominaciones “*light*”, “*bajo en grasas*”, “*desnatado*”, “*0% materia grasa*”, etc., en su etiquetado, con lo que han sido considerados como dirigidos al control del peso. Una importante proporción de los productos fortificados va dirigida a la población infantil (n=76), siendo en su mayoría alimentos de los grupos *cereales y derivados* y de *leche y derivados*.



n: número de productos en la Base de Datos.

Figura 20. Distribución grupos de población diana a los que van dirigidos los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico.

Si atendemos ahora a la distribución de grupos diana de consumo dentro de cada grupo de alimentos fortificados encontramos que el grupo de los *cereales y derivados*, en su mayor proporción (55%) no especifica población diana de consumo en el etiquetado, siendo los *niños mayores de 1 año* el grupo de población más citado en el etiquetado (**Figura 21**). Las *leches y derivados* siguen un patrón muy similar al grupo anterior, con excepción de los productos destinados a las *Mujeres/Madres* para las cuales es el grupo de alimentos mayoritario.



n: número de productos en la Base de Datos.

Figura 21. Distribución grupos de población diana a los que van dirigidos los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico.

Los *productos para usos nutricionales especiales* engloban las siguientes categorías: *productos para la reducción de peso, complementos dietéticos y fórmulas infantiles y de continuación* por lo que constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a su población diana de consumo. Estos productos van dirigidos en su mayoría (55%) a las personas interesadas en la *reducción o el control de peso* y a continuación a los *Bebés hasta los 12 meses*. Los restantes grupos de alimentos presentan también mayor porcentaje de alimentos cuya población diana de consumo no se especifica en el envase.

1.6. Estudio del etiquetado nutricional y los tipos de alegaciones en el etiquetado de los alimentos fortificados con ácido fólico

Del total de los 375 productos fortificados con ácido fólico incluidos en la Base de Datos, el 98% (n=368) presentan etiquetado nutricional completo de acuerdo a lo establecido en el Reglamento 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor [170] que establece que el etiquetado nutricional es obligatorio en este tipo de alimentos. Los productos procedentes de marcas extranjeras (n=7, Colombia, EE UU y Rumania) no declaran la cantidad de ácido fólico por 100 g o por ración, únicamente lo incluyen en el listado de ingredientes, por lo que se excluyen de este análisis.

Considerando los tipos de declaraciones que pueden y sus condiciones específicas recogidas en el Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, (relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos [1]), se estudiaron por separado las *Alegaciones Nutricionales* y las *Alegaciones de Salud* encontradas en los alimentos fortificados con ácido fólico inventariados.

A. Alegaciones Nutricionales

Concretamente se estudiaron las *Alegaciones nutricionales* de contenido en vitaminas presentes en el panel frontal del envase o etiquetado del alimento. Observamos que el 66% de los productos de la Base de Datos declara su contenido en vitaminas (n=247) (**Figura 22**), y que de estos un 36% declara específicamente contener ácido fólico mediante cualquiera de sus denominaciones (B₉, folic, folacina, etc.) (n=88) (**Figura 23**).

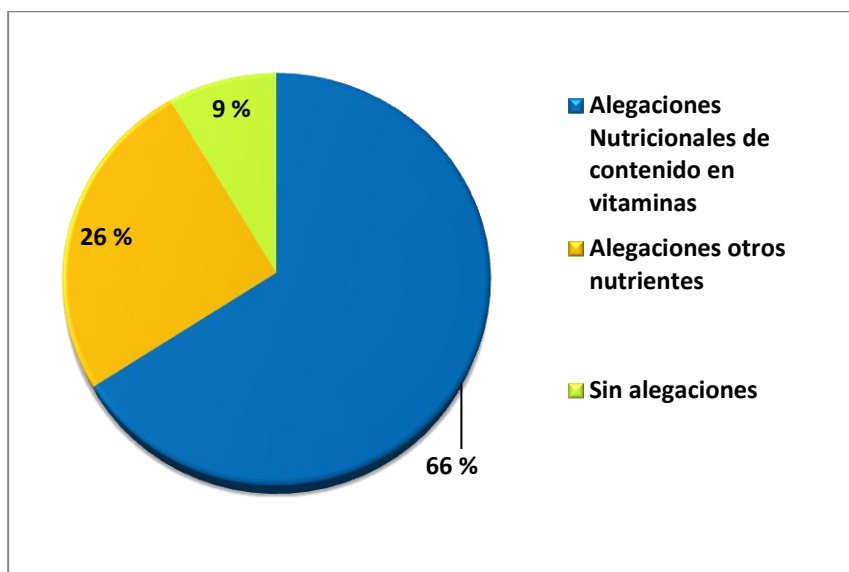


Figura 22. Distribución de los tipos de Alegaciones Nutricionales declaradas en el panel frontal de los alimentos fortificados con ácido fólico (n=375) de acuerdo al Reglamento (CE) Nº 1924/2006 [1].

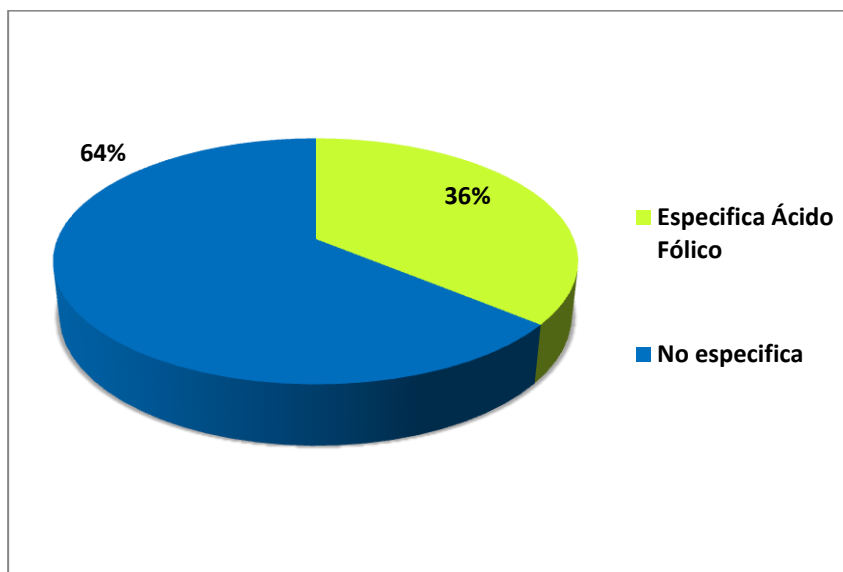


Figura 23. Distribución de los alimentos que presentan declaraciones nutricionales de contenido en vitaminas (n=247).

Si atendemos concretamente a los grupos de alimentos que declaran mediante una mención específica el contenido en ácido fólico en el etiquetado, son las *grasas y aceites*, seguidas de las *bebidas (no lácteas)*, las que mayor proporción de alimentos presentan (**Figura 24**), presentando el 100% y el 53% de productos respectivamente.

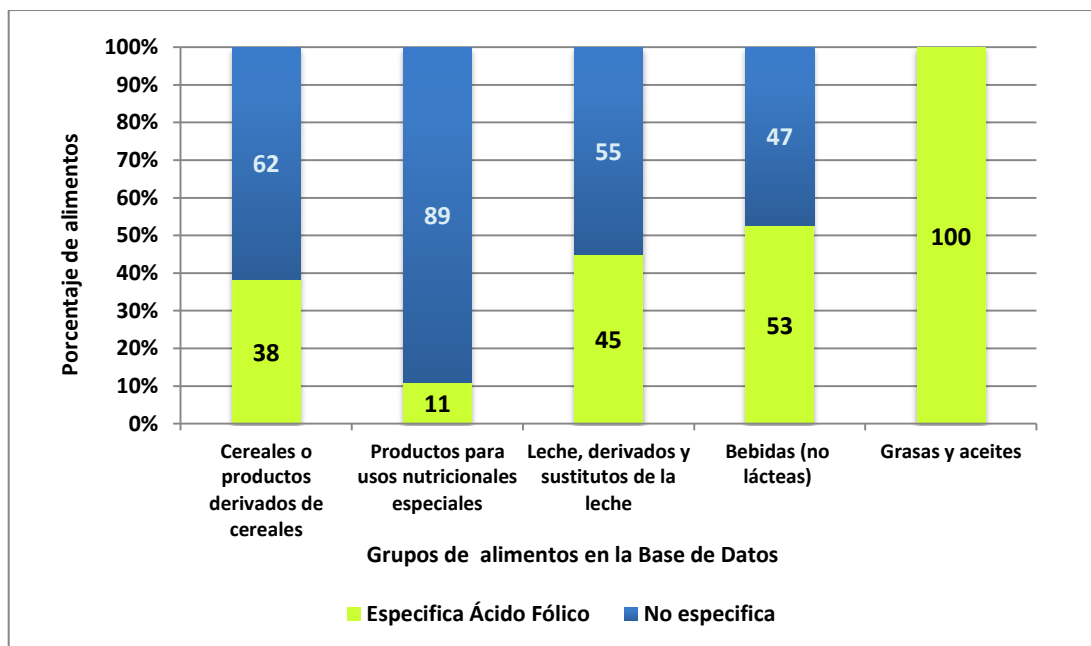
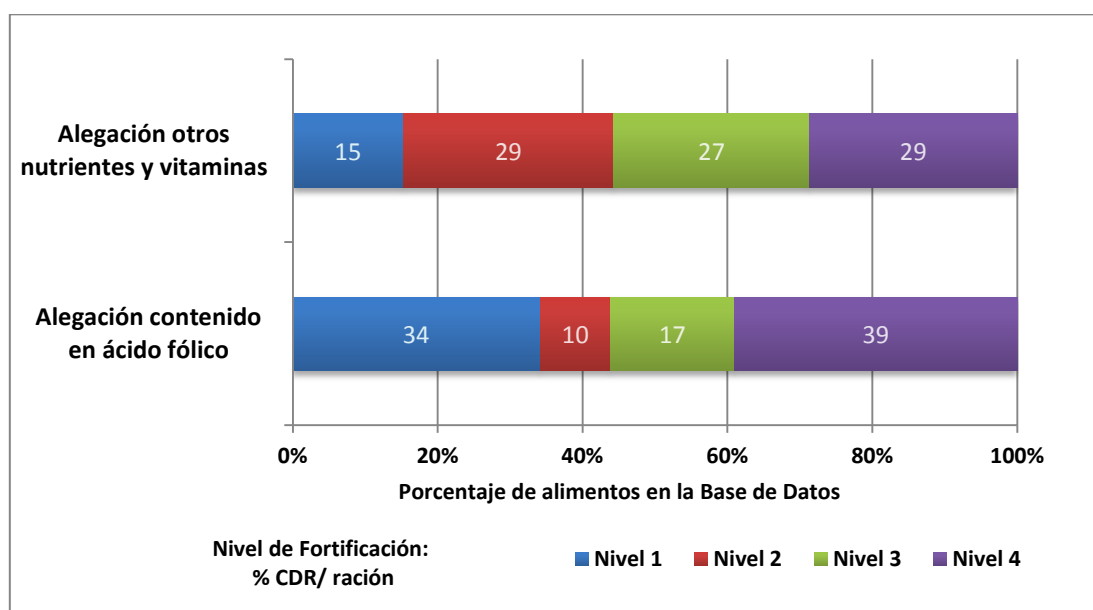


Figura 24. Grupos de alimentos fortificados con ácido fólico que hacen mención específica de su contenido en el panel frontal del etiquetado.

Al estudiar los niveles de fortificación que presentan los alimentos que realizan una alegación de contenido en ácido fólico observamos que los de Nivel 4 y Nivel 1 de fortificación son los que mayor proporción muestran (**Figura 25**), mientras que los alimentos que realizan alegación de otros nutrientes tienen una distribución equivalente, excepto los fortificados en el Nivel 1, que son minoritarios.



Nivel 1: $\leq 16\%$, Nivel 2: $16,1 - 25,9\%$, Nivel 3: $26 - 34,9\%$, Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 25. Estudio del Nivel de Fortificación declarado y la presencia de Alegaciones Nutricionales de contenido en vitaminas, ácido fólico y otros nutrientes en el etiquetado.

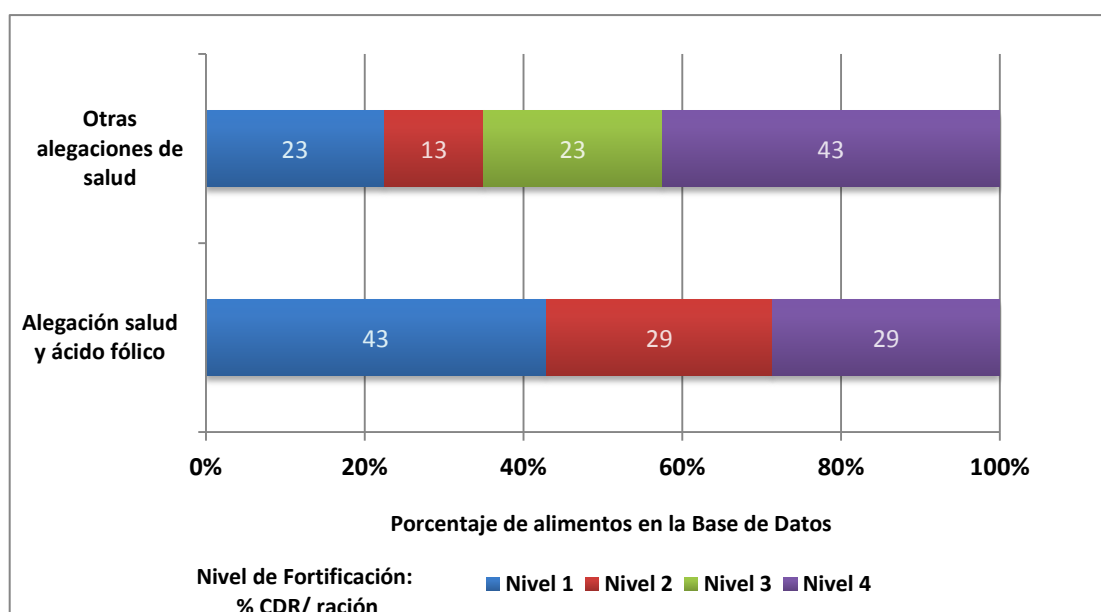
B. Alegaciones de Salud

Las *Alegaciones de salud* se encontraron en un total de 63 productos (17% de los productos de la Base de Datos) de los cuales la mayoría presentaba también una “ración recomendada de consumo” (73%, n=46). Estas alegaciones pueden estar o no relacionadas con las funciones del ácido fólico, ya que además de esta vitamina, los alimentos fortificados con ácido fólico contienen otros nutrientes y vitaminas añadidas, que pueden presentar funciones potencialmente relacionadas con la salud (**Tabla 18**). En ningún caso se observaron *Declaraciones de Reducción del Riesgo de Enfermedad*.

Tabla 18. Alegaciones de salud en los productos fortificados con ácido fólico aprobadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Reglamento (UE) Nº 432/2012 [177].

	Alegaciones relacionadas con la salud presentes en el etiquetado	Evidencia Científica [177, 217, 218]
Relacionadas con el Ácido Fólico	<ul style="list-style-type: none"> - Esencial durante el embarazo - Desarrollo sistema nervioso en gestación - Cuidado de las arterias y el “Corazón”, colesterol - División celular - Síntesis glóbulos rojos 	<p>Si</p> <p>Si</p> <p>No</p> <p>Si</p> <p>Si</p>
Otras	<ul style="list-style-type: none"> - Efecto bífidus y refuerzo de la flora intestinal - Fibra y sistema digestivo - Esteroles y estanoles vegetales y reducción de colesterol - Grasas saturadas y colesterol - Calcio, vitamina D y salud ósea - Ácidos grasos ω-3 y reducción del colesterol y triglicéridos - Probióticos y defensa inmune - Prebióticos y defensas del bebé 	<p>Estudios asociados a productos concretos</p> <p>Si</p> <p>Estudios asociados a productos concretos</p> <p>Si</p> <p>Si</p> <p>Si</p> <p>Estudios asociados a productos concretos</p>

De los productos que presentaron *Alegaciones de Salud*, únicamente 7 alimentos presentaron alegaciones relacionadas con funciones reconocidas del ácido fólico y autorizadas por el Reglamento 432/2012 [177], es decir, las relacionadas con la función de la vitamina en el desarrollo del sistema nervioso durante el embarazo y la síntesis de glóbulos rojos [217, 218]. En todos los casos se observó en estos productos la *Alegación nutricional* de contenido en ácido fólico en el panel frontal del etiquetado. Cabe destacar en cuanto al nivel de fortificación de éstos alimentos, que la mayor proporción (43%) se encontró en el Nivel 1 (≤ 16 % CDR) y que los alimentos fortificados con Nivel 3 carecían de *Alegaciones de Salud* relacionadas con el ácido fólico (**Figura 26**). Es también destacable que los alimentos fortificados con el Nivel 4, en su mayoría presentaban alegaciones de salud no relacionadas con las del ácido fólico.



Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 μg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 26. Estudio del Nivel de Fortificación declarado y la presencia de Alegaciones de Salud en el etiquetado.

A lo largo del periodo del estudio, fue posible constatar la adaptación del etiquetado en cuanto las alegaciones de salud de algunos productos incluidos en el inventario de la Base de Datos. En el grupo de las *Grasas y Aceites*, fueron eliminadas las alegaciones que relacionaban el ácido fólico con el cuidado de las arterias y el colesterol, dicha alegación no está aceptada por la EFSA [217].

1.7. Alimentos fortificados con ácido fólico que dejan de comercializarse o que sufren reformulación o eliminación de el contenido en ácido fólico

El inventario para la recopilación de los datos de alimentos fortificados con ácido fólico se inició en septiembre el año 2006 como parte del DEA [12] y se dio por culminado en mayo de 2010. A lo largo de estos años algunos de los alimentos fortificados con ácido fólico dejaron de comercializarse. Esto implica desaparición del mercado sin reformulación ni cambio de etiqueta o nombre. Mediante la visita a los centros de adquisición se constató cuales de los productos recogidos inicialmente habían dejado de comercializarse. El total de alimentos fortificados con ácido fólico que ya no se comercializa es de 21 (6% de la Base de Datos).

A. Eliminan el ácido fólico de su composición y listado de ingredientes:

Grupo lácteos y derivados:

- *Yogures y leches fermentadas*: 13 alimentos de marca del fabricante (MDF)

B. Dejan de comercializarse:

Grupo lácteos y derivados:

- *Quesos*: 1 alimento de MDF (petit Suisse o quesito fresco para niños)
- *Leche*: 1 alimento MDF
- *Yogures y leches fermentadas*: 3 alimentos de MDF

Grupo cereales y derivados:

- *Pan de molde*: 1 alimento MDF
- *Cereales de desayuno*: 1 alimento MDF

Grupo bebidas no lácteas:

- *Cacao soluble*: 2 alimentos MDF

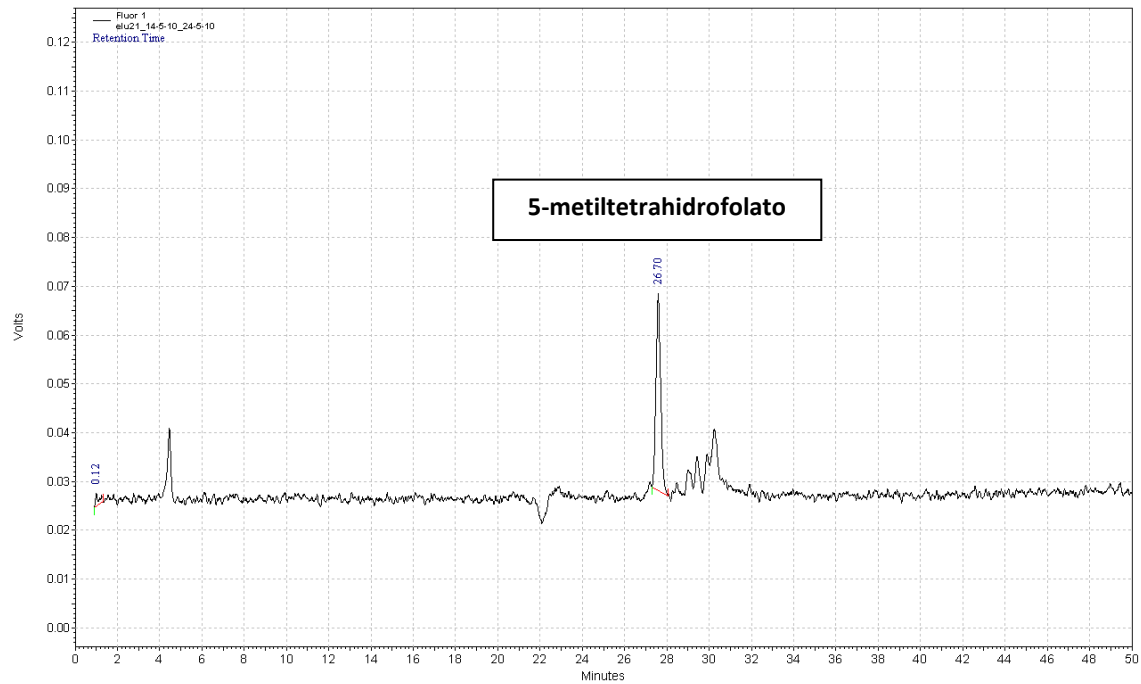
Se estudió también la reformulación de los productos, mediante las declaraciones en el etiquetado, es decir, si un producto que al ser incluido por primera vez en la Base de Datos presentaba un nivel de fortificación con fólico declarada, si esta ha cambiado en los años siguientes. Dos de las margarinas redujeron a la mitad su contenido en ácido fólico pasando de 1 mg a 0,5 mg/100 g. En las marcas de distribución (MDD) se observó cambio en el marketing de los envases en productos dirigidos a población infantil, pero se mantuvo constante el nivel de fortificación declarado.

2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN ÁCIDO FÓLICO Y FOLATOS EN ALIMENTOS FORTIFICADOS. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

2.1. Precisión, exactitud y repetibilidad del método de cromatografía de afinidad con Proteína Ligando de Folato y cuantificación de ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato por HPLC

Mediante el método de cromatografía de afinidad con proteína ligando de folato (PLF) y la cuantificación por HPLC se logró separar el ácido fólico y el 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) de las muestras de alimentos fortificados utilizando la fluorescencia una λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm (**Figura 27 A**) y la detección UV a 280 nm (**Figura 27 B**), respectivamente. El empleo de esta combinación se debió a la mayor selectividad y sensibilidad del sistema de fluorescencia, que permitió analizar la presencia de 5-metiltetrahidrofolato en muy pequeñas cantidades en los distintos tipos de matrices de alimentos analizadas [192] (**Figuras 28 a 33 A y B**).

A



B

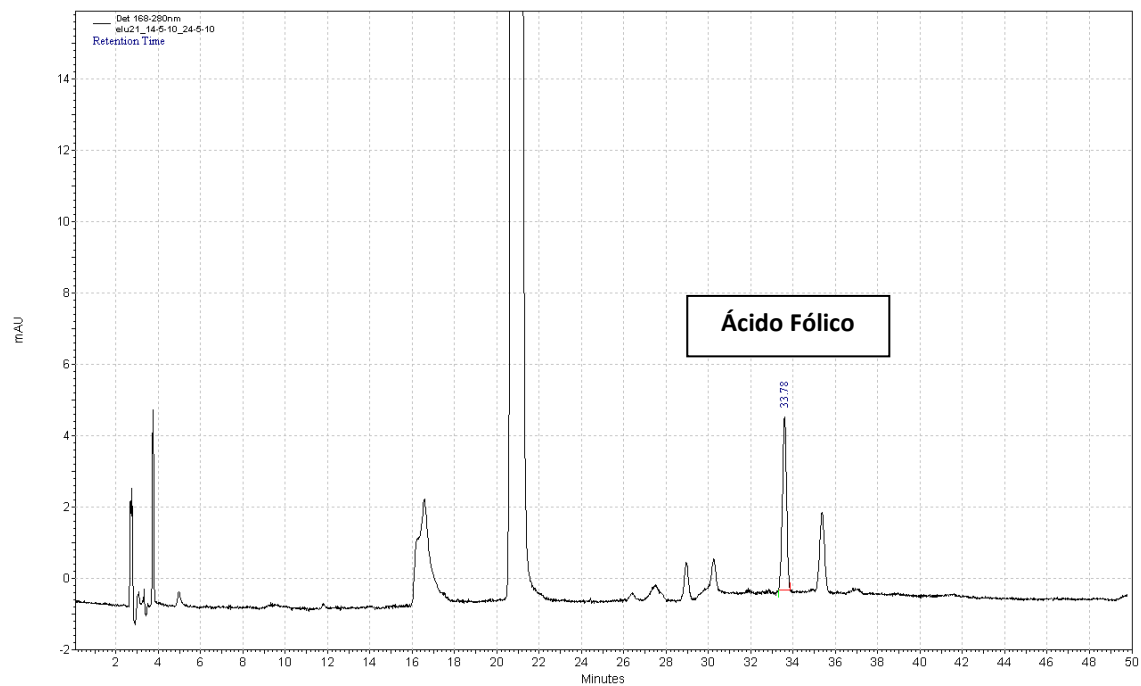
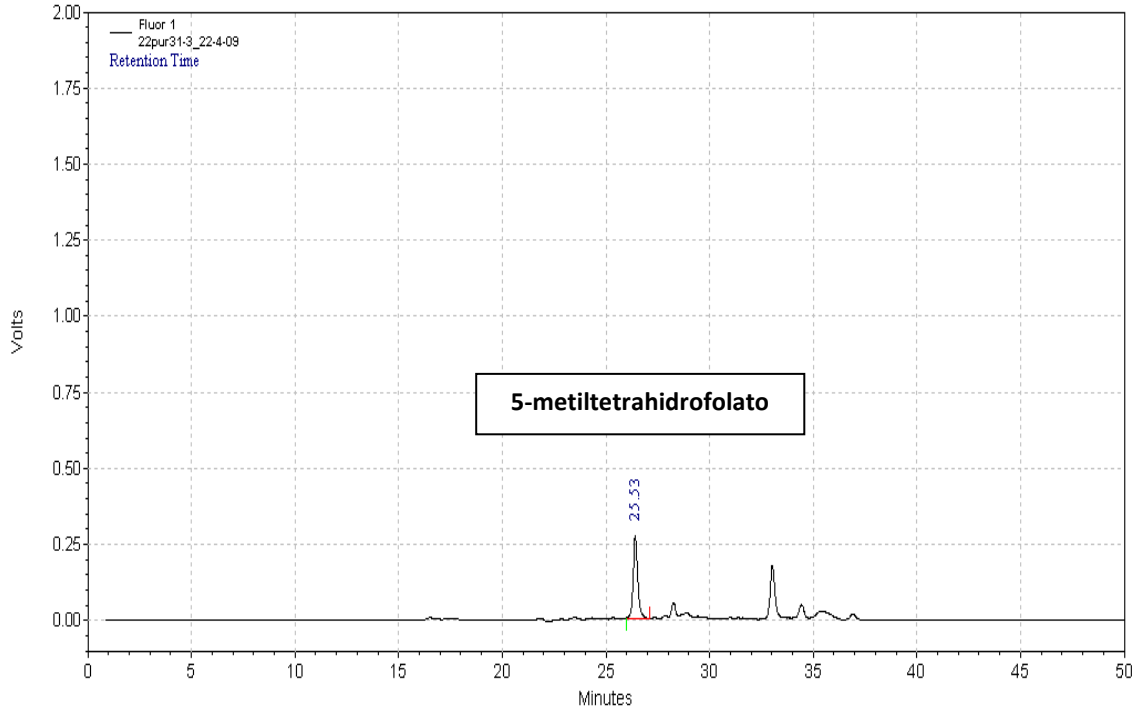


Figura 27. A. Cromatograma de una muestra de Material Estándar de Referencia: Preparado Lácteo infantil en polvo (SRM 1846): 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. **B.** ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.

IV. Resultados

A



B

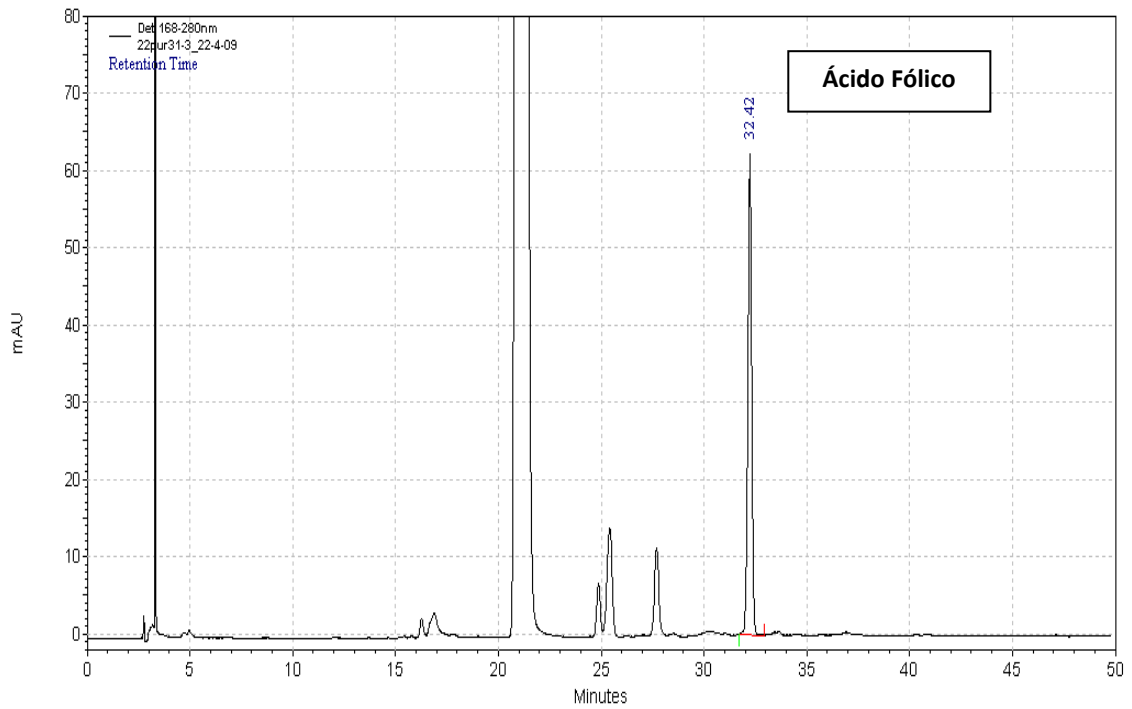
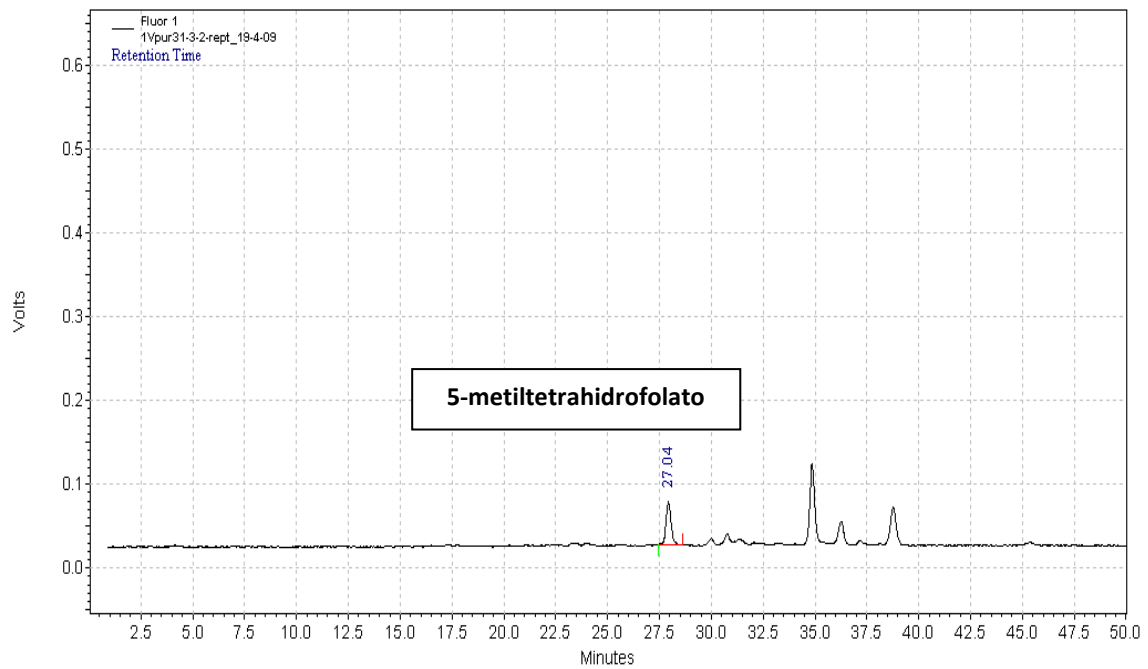


Figura 28. A. Cromatograma de una muestra de cereales de desayuno con trozos de frutas rojas: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. **B.** ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.

A



B

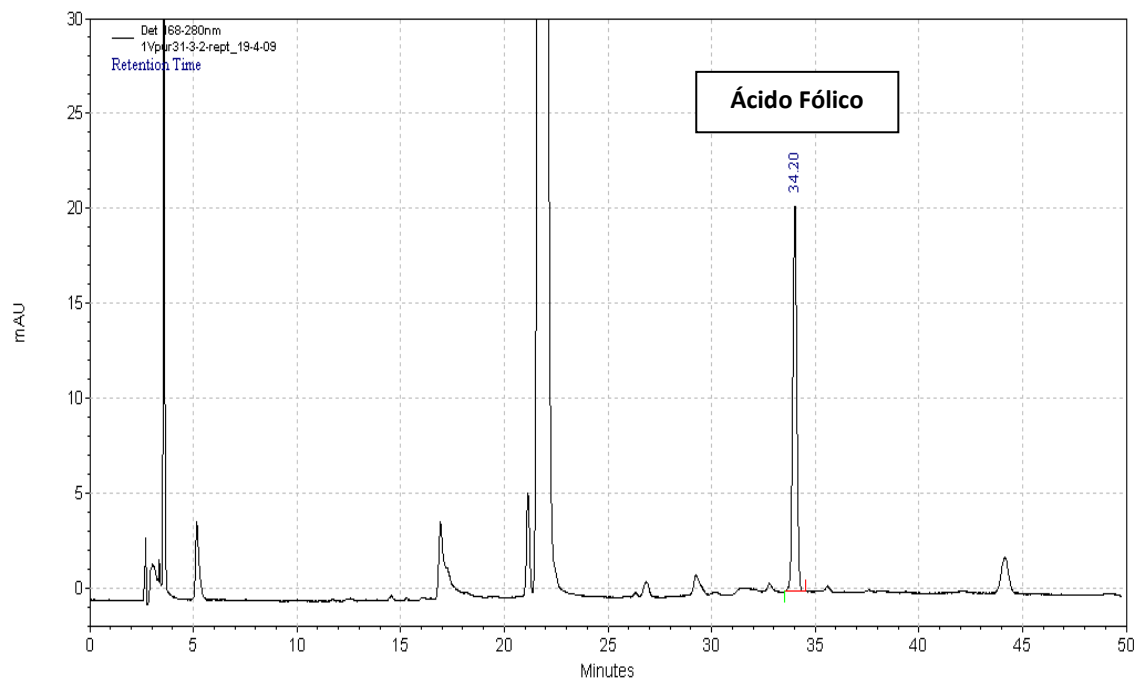
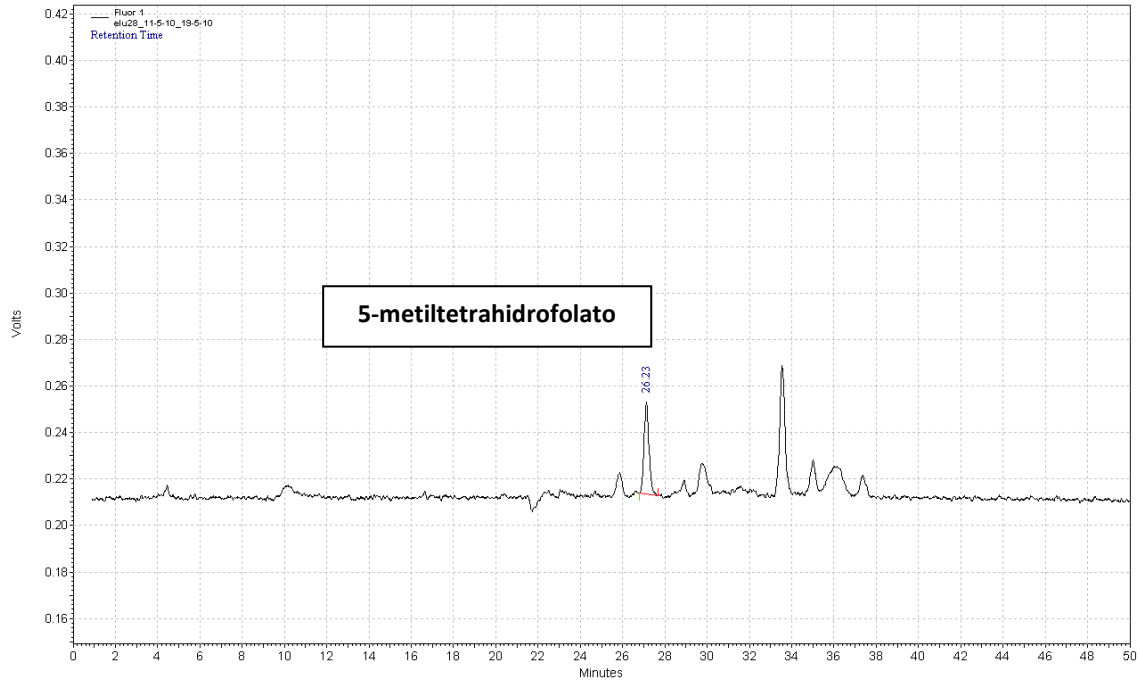


Figura 29. A. Cromatograma de una muestra de cereales de desayuno azucarados y chocolateados: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. **B.** ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.

IV. Resultados

A



B

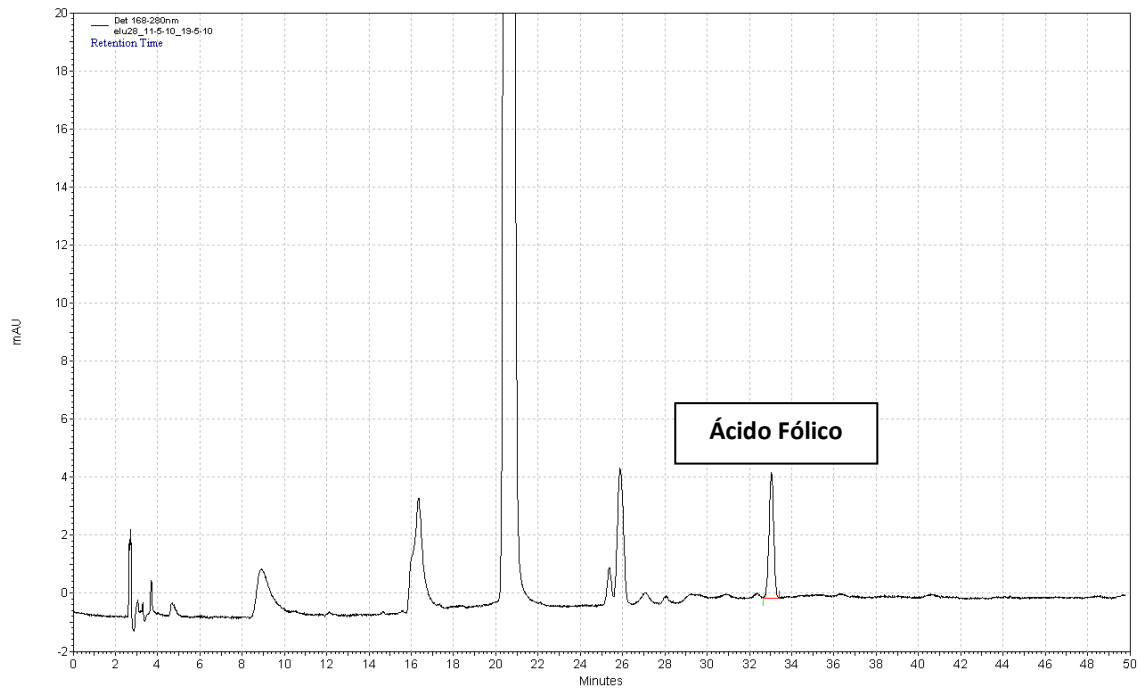
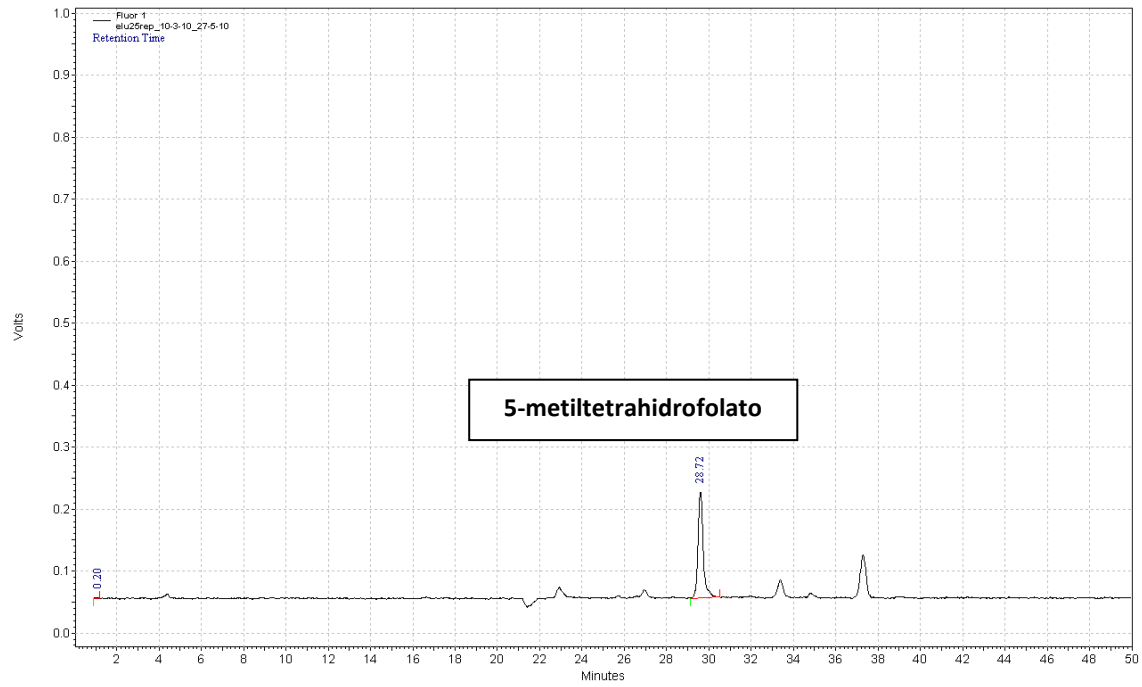


Figura 30. A. Cromatograma de una muestra de leche desnatada: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. **B.** ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.

A



B

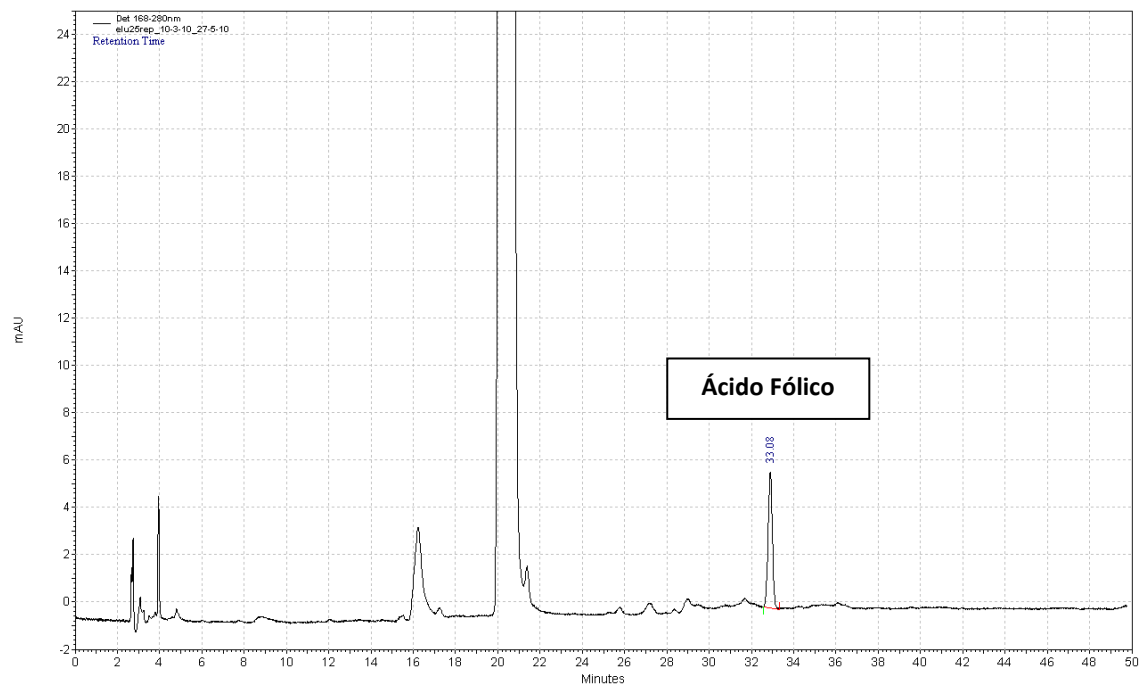
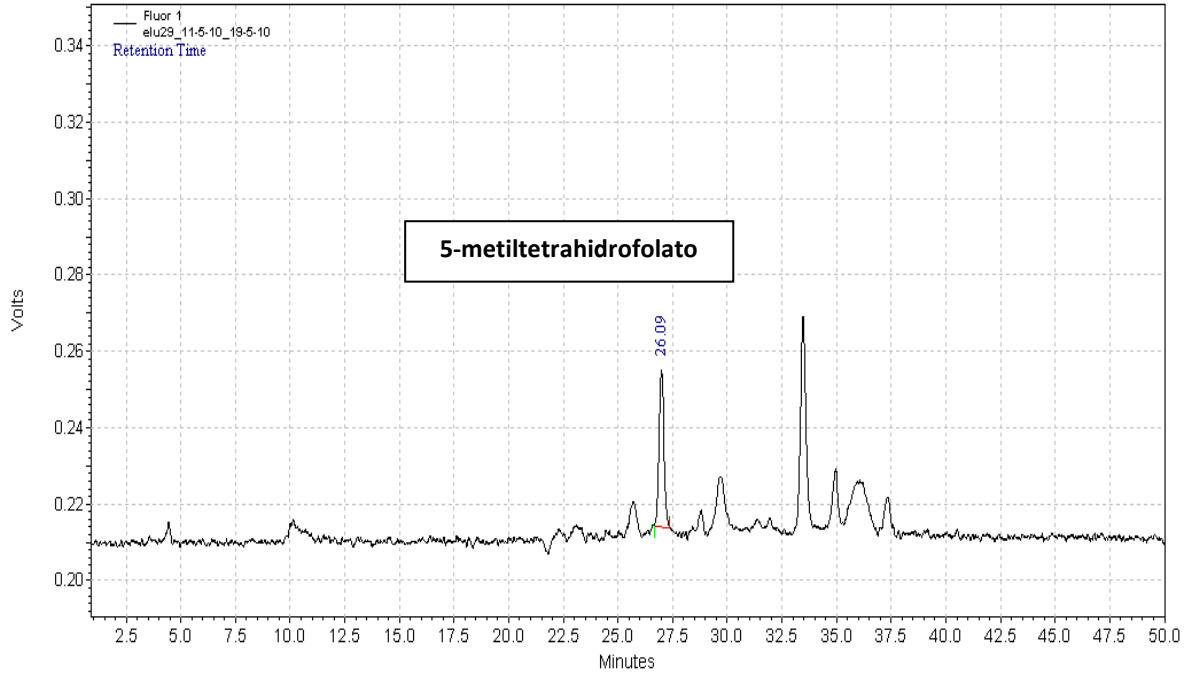


Figura 31. A. Cromatograma de una muestra de preparado lácteo: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. **B.** ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.

IV. Resultados

A



B

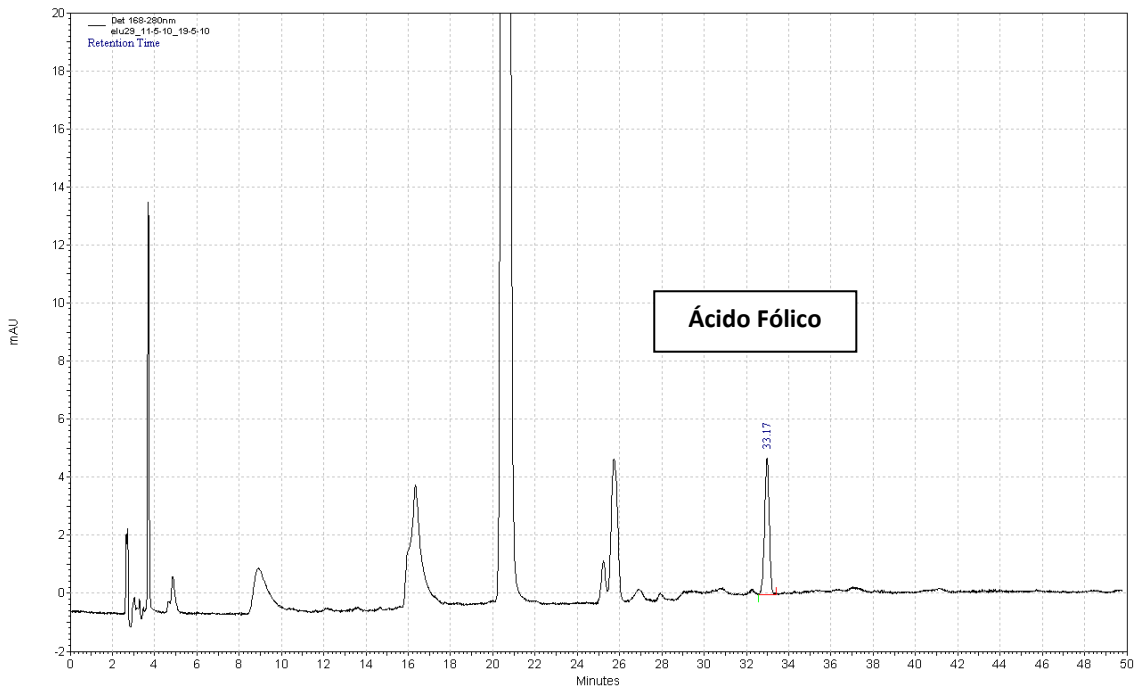
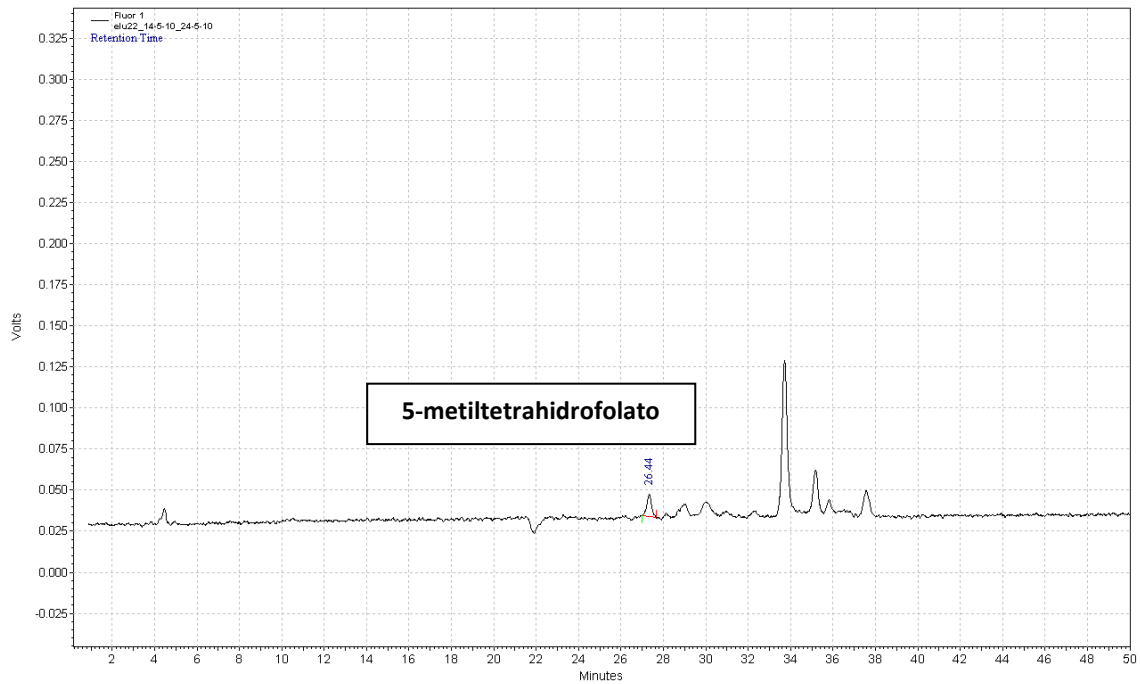


Figura 32. A. Cromatograma de una muestra de galletas: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. **B.** ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.

A



B

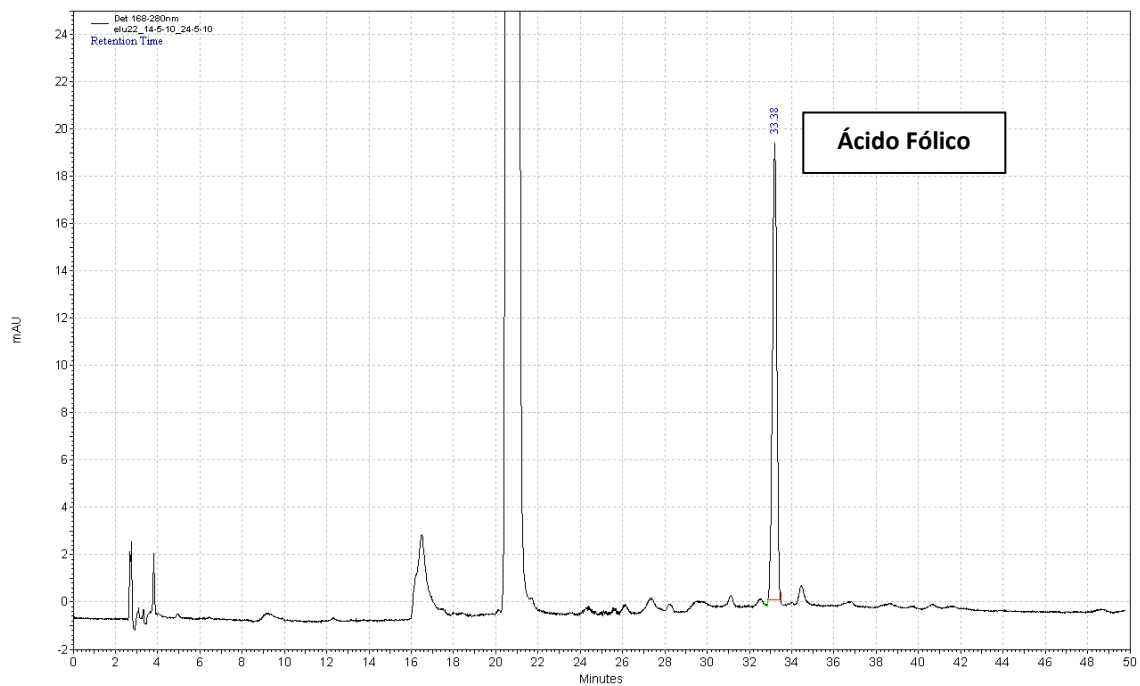


Figura 33. A. Cromatograma de una muestra de cacao soluble instantáneo: 5-metiltetrahidrofolato medido por fluorescencia a λ de excitación de 295 nm y de emisión de 360 nm. B. ácido fólico medido por detección UV a una λ de 280 nm.

2.1.1. Límite de detección

Mediante la detección de UV a 280 nm y la fluorescencia a una λ de excitación de 295 nm/ emisión de 360 nm, los límites de detección definidos como señal frente a ruido = 3 para las soluciones estándar, fueron de 0,0003 nmol/ml para el ácido fólico y 0,0014 nmol/ml para el 5-MTHF, respectivamente. Estos límites permitieron cuantificar tanto el ácido fólico añadido como el folato endógeno presentes en los alimentos.

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

2.1.2. Recuperación

La recuperación a lo largo de todo el método (extracción, purificación y análisis por HPLC) se evaluó mediante el uso de harina de trigo comercial no fortificada, a la cual se adicionó 40 $\mu\text{g/g}$ de ácido fólico y 0,4 $\mu\text{g/g}$ de 5-MTHF [101]. Se obtuvieron valores de recuperación de los estándares, media de tres determinaciones \pm desviación estándar, de $85,3 \pm 6,2$ % para el ácido fólico y $83,5 \pm 4,1$ % para el 5-MTHF tras restar los $0,23 \pm 0,005$ $\mu\text{g/g}$ endógenos en la matriz, $\text{CV}=2,2\%$ ($23 \pm 0,5$ $\mu\text{g}/100$ g). Estos resultados se consideraron aceptables de acuerdo a los rangos de recuperación establecidos por la AOAC [219].

2.2.3. Linealidad

Se comprobó que el método era lineal para el análisis del ácido fólico y del 5-MTHF pasando las diferentes concentraciones de soluciones estándar por las columnas de afinidad-PLF y analizando los eluidos por HPLC. Así, el método mostró una respuesta lineal para los estándares de ácido fólico en un rango de concentraciones comprendido entre 0,1 y 3 nmol/ml (0,04 – 1,32 $\mu\text{g/ml}$), $R^2 = 0,993$ (**Figura 34**) y para el 5-MTHF entre 0,0125 y 0,25 nmol/ml (0,005 – 0,115 $\mu\text{g/ml}$), $R^2 = 0,9961$ (**Figura 35**).

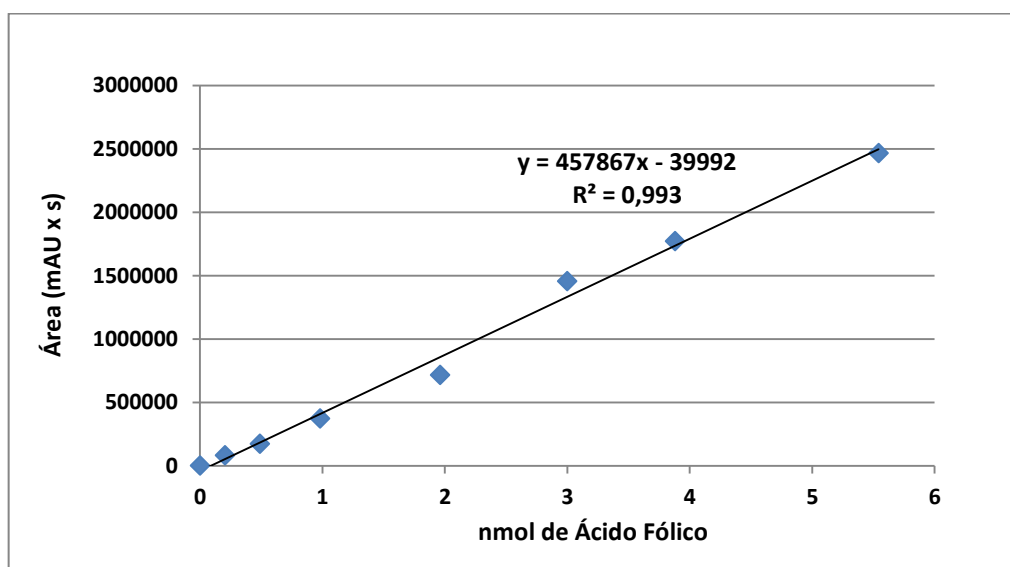


Figura 34. Linealidad del método expresada como área del pico de absorbancia de UV vs. nmol de ácido fólico en 1,8 ml de eluido de la columna de afinidad e inyectado en el HPLC.

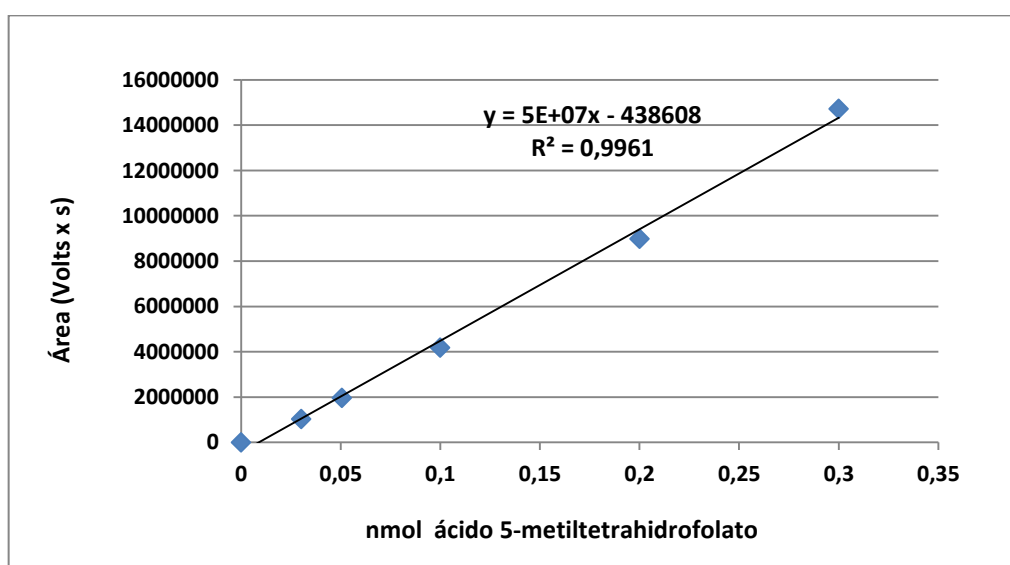


Figura 35. Linealidad del método expresada como área del pico de fluorescencia vs. nmol de 5-metiltetrahidrofolato en 1,8 ml de eluido de la columna de afinidad e inyectado en el HPLC.

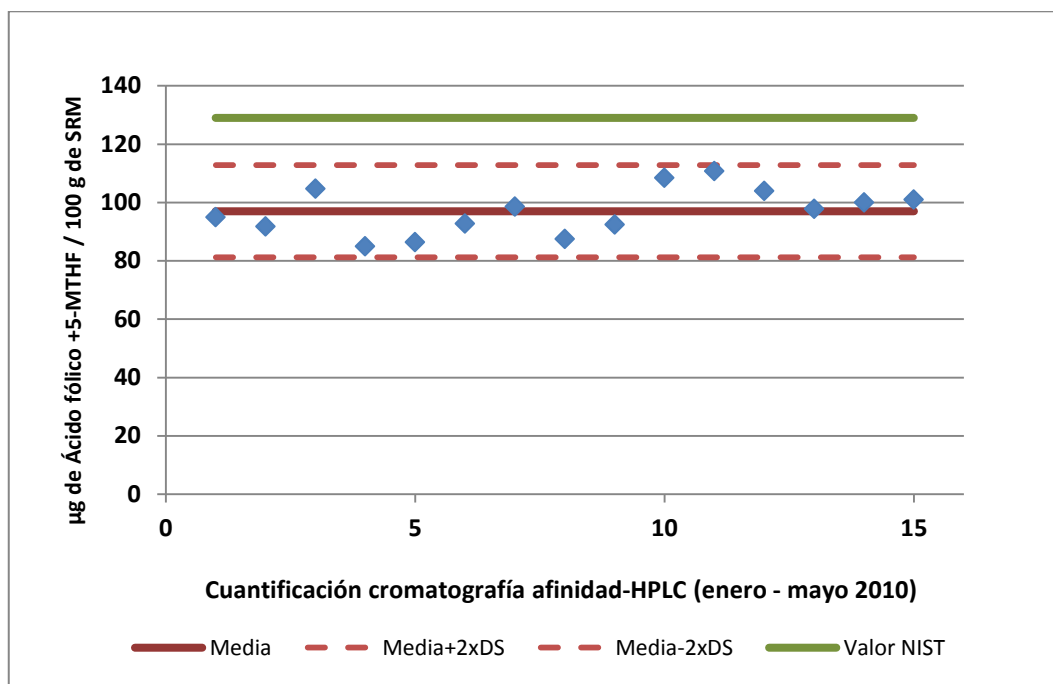
2.2.4. Precisión inter- e intra-ensayo

Se utilizó el material de referencia SRM 1846 fórmula láctea fortificada con ácido fólico [194], que se procesó en paralelo con las muestras de alimentos fortificados analizadas durante las etapas de extracción, purificación y cuantificación [219] (Tabla 19).

Tabla 19. Precisión del método de cromatografía de afinidad-HPLC: coeficiente de variación intra- e inter-ensayo y contenido en ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato del material estándar de referencia SRM 1846 ^a.

	Intra – ensayo (n=5)		Inter – ensayo (n=22)	
	µg FT/100 g	CV (%)	µg FT/100 g	CV (%)
Ácido fólico	91,3 ± 6,17	7	88 ± 7,81	9
5-MTHF	9 ± 0,54	6	9 ± 1,08	12

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar de n ensayos ^a SRM 1846: Material estándar de referencia (NIST: National Institute of Standards and Technology), Fórmula láctea infantil. Valor de referencia certificado para folatos totales = 129 ± 28 µg / 100 g.



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, DS: desviación estándar. Valor de referencia certificado para folatos totales = 129 ± 28 µg / 100 g. NIST: National Institute of Standards and Technology

Figura 36. Repetibilidad del método de cromatografía de afinidad-HPLC utilizando material estándar de referencia SRM 1846 ^a.

2.2. Precisión, exactitud y repetibilidad del método microbiológico

2.2.1. Recuperación

La recuperación del método de principio a fin (extracción, purificación y análisis de folato total) se evaluó analizando una alícuota del mismo extracto que se analizó por HPLC, con la diferencia de que no se realizó la fase de purificación. Se utilizó, al igual que en el caso anterior, harina de trigo comercial no fortificada adicionada con 40 µg/g de ácido fólico y 0,4 µg/g de 5-MTHF [101]. Los valores de recuperación de los estándares, expresados en folato total, obtenidos fueron del 100,3 ± 9,2% (media de tres determinaciones ± desviación estándar). Dichos resultados se consideraron aceptables de acuerdo a lo estipulado por la AOAC [219].

2.2.2. Linealidad

El crecimiento de *L. rhamnosus* (NCIB 10463) resultó lineal frente a concentraciones entre 0 y 300 pg/ml de ácido fólico (0-30 pg/100 µl), con un coeficiente de regresión de $R^2 = 0,99$ tal como se observa en la **Figura 37**.

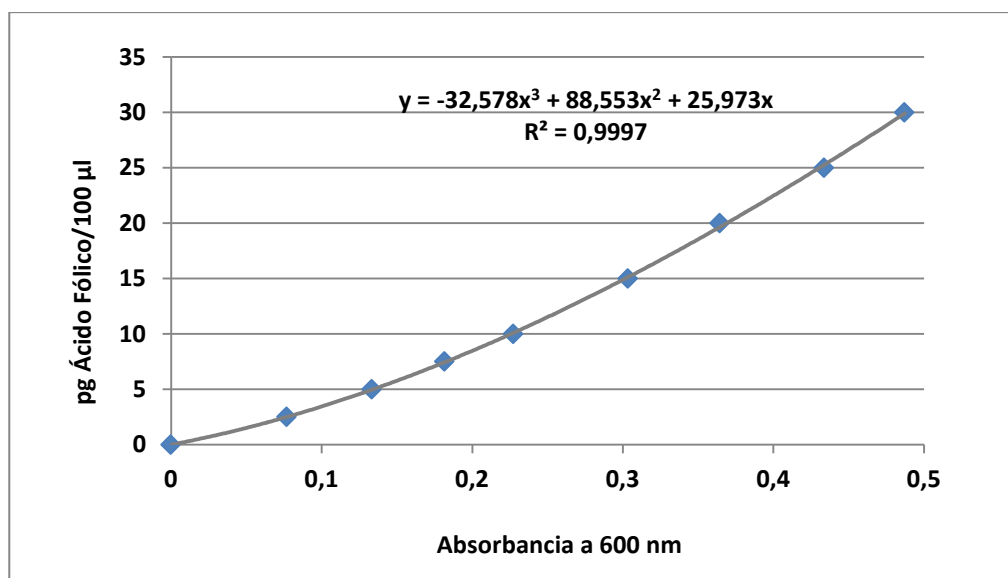


Figura 37. Linealidad del método microbiológico con *L. rhamnosus* (NCIB 10463).

Se analizaron los extractos trienzimáticos de las enzimas utilizadas en el ensayo (α -amilasa, proteasa y conjugasa de plasma de rata), los cuales no presentaron niveles cuantificables de folatos, con lo cual se confirmó, al igual

que con la cuantificación mediante cromatografía de afinidad-HPLC, que su adición en el ensayo trienzimático no aporta folatos endógenos.

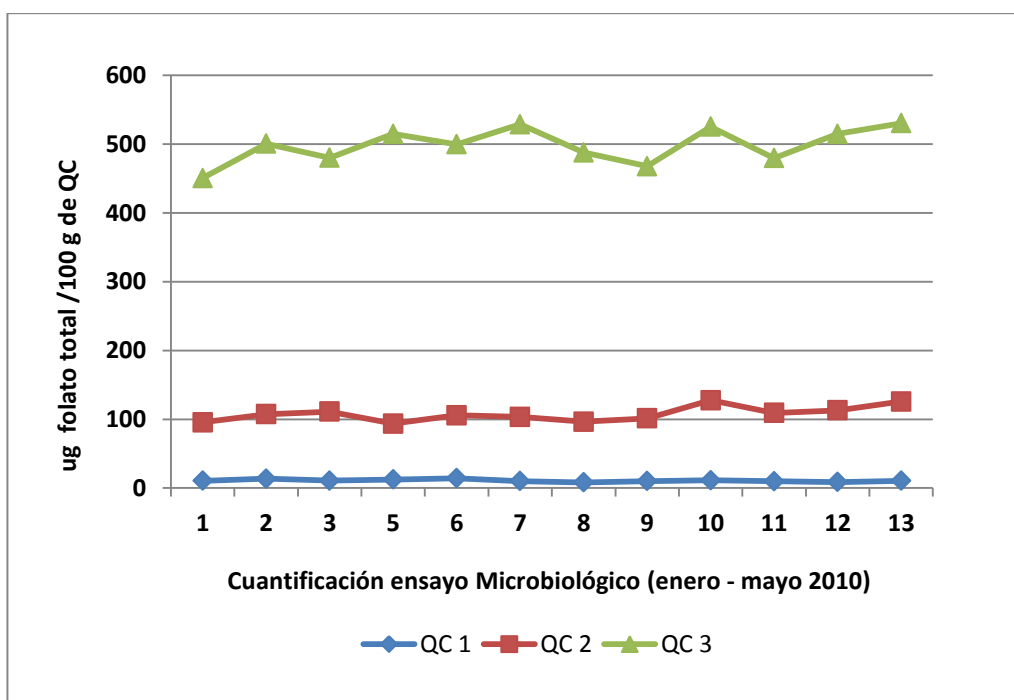
2.2.3. Precisión inter- e intra-ensayo

A. Control de calidad externo

Los resultados obtenidos tras el análisis del estándar externo (WHO International Standard) fueron de $5,12 \pm 0,38$ ng/ml (CV= 7,5%) que se consideraron adecuados frente al valor certificado de 5,33 ng/ml de folato total [202].

B. Control de calidad interno

La repetibilidad o reproducibilidad del ensayo microbiológico se obtuvo analizando en paralelo distintas concentraciones de extractos de alimentos fortificados con ácido fólico preparadas en nuestro laboratorio. Puede observarse en la **Figura 38** la gráfica de control obtenida a lo largo de 13 ensayos, donde se observa una mayor variabilidad inter-ensayo a mayores concentraciones de folato total, lo que implicó la necesidad de una adecuada dilución de las muestras para su ensayo por este método.



QC 1-3: controles de calidad internos preparados a partir de alimentos fortificados

Figura 38. Control de calidad y repetibilidad del método microbiológico con *L. rhamnosus* (NCIB 10463) a distintas concentraciones de folato total.

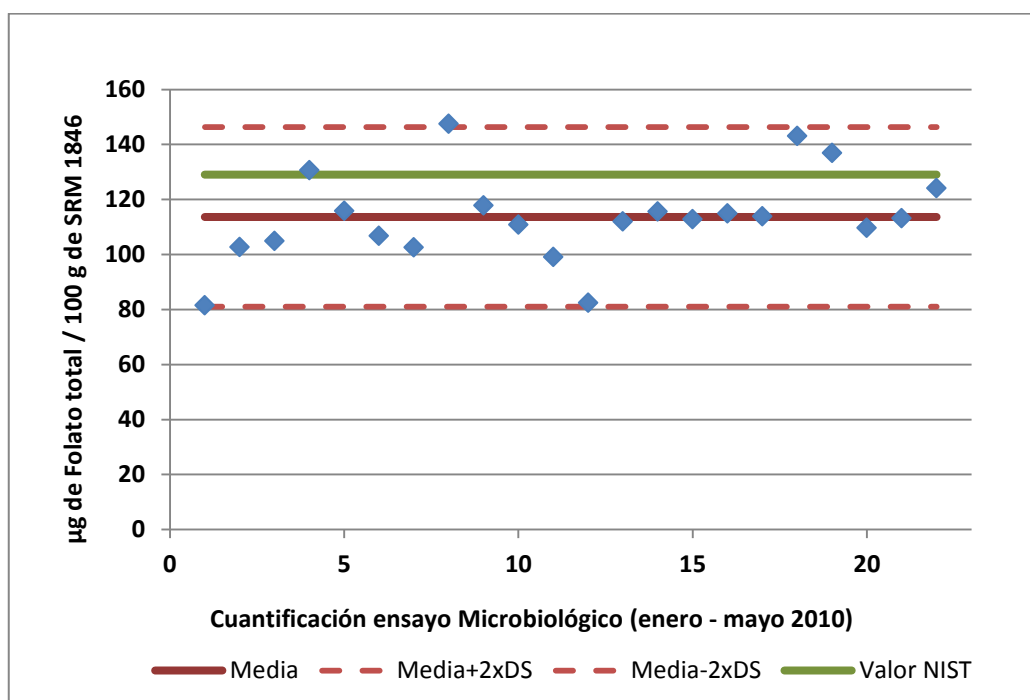
También se calculó la variación intra- e inter-ensayo analizando los extractos de material estándar de referencia sometidos a extracción trienzimática en paralelo a las muestras problema (**Tabla 20** y **Figura 39**), mediante las cuales se controló todo el proceso de extracción y cuantificación de folatos totales a lo largo del periodo de análisis.

Tabla 20. Precisión del método microbiológico con *L. rhamnosus* (NCIB 10463): coeficiente de variación intra- e inter-ensayo y contenido en folato total del material estándar de referencia SRM 1846^a.

Muestra	Intra – ensayo (n=5)		Inter – ensayo (n=22)	
	µg FT/100 g	CV (%)	µg FT/100 g	CV (%)
SRM 1846 ^a	105 ± 13,4	13	113,6 ± 16,3	14,4

Los resultados se expresan como contenido medio en folatos totales (FT) ± desviación estándar de n extracciones trienzimáticas y cuantificación por el método microbiológico.

^a SRM 1846: Material estándar de referencia (NIST), Fórmula láctea infantil. Valor de referencia certificado para folatos totales = 129 ± 28 µg / 100 g.



DS: desviación estándar. Valor de referencia certificado para folatos totales = 129 ± 28 µg / 100 g. NIST: National Institute of Standards and Technology.

Figura 39. Repetibilidad del ensayo microbiológico utilizando material estándar de referencia SRM 1846^a.

2.3. Ácido fólico, 5-metiltetrahidrofolato y Folato total en distintos grupos de alimentos fortificados

2.3.1. Justificación de la elección de los grupos de alimentos

Se seleccionaron para el análisis los productos procedentes de los grupos de alimentos más representativos incluidos en la Base de Datos tras el inventario. Estos son alimentos que, de acuerdo al Estudio enKid forman parte del desayuno, merienda o “snack” (tentempié) de la población española entre 2 y 24 años, ya sea de forma individual o conjunta [2]. Con los datos procedentes de su análisis se facilitó la estimación de los niveles de ingesta de ácido fólico que nos propusimos estudiar como uno de los objetivos del trabajo.

En total se analizaron 154 productos de 26 marcas, entre los que se incluyeron tres grupos: *cereales y derivados (cereales de desayuno y galletas)*, *lácteos y derivados (leche, yogures y bebidas fermentadas, preparados lácteos, etc.)*, y *bebidas no lácteas (zumos y cacao soluble)*, siendo los dos primeros grupos, los mayoritarios encontrados en el mercado. La distribución de los mismos queda reflejada en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Grupos y subgrupos de alimentos fortificados con ácido fólico analizados por el método microbiológico y cromatografía de afinidad-HPLC.

	Subgrupos de alimentos	Productos analizados	Marcas comerciales
Cereales y Derivados	Cereales de desayuno	68	8
	Galletas	13	6
	Total	81	
Leche y Derivados	Leche (entera, semidesnatada, desnatada, batidos lácteos)	26	11
	Yogures y bebidas fermentadas	21	2
	Preparados lácteos (ω -3, soja)	17	9
	Total	64	
Bebidas no lácteas	Cacao y café soluble	6	4
	Zumos y néctares	3	2
	Total	9	
Total		154	26

Se analizaron en total productos de 26 marcas, de las cuales 22 eran marcas del fabricante (MDF) y 4 marcas de distribución (MDD) denominadas comúnmente “*marcas blancas*”.

Para los productos procedentes de MDD, previo a su selección para el análisis, se verificó en el etiquetado el número de registro sanitario de la empresa o fabricante del producto ya que este puede ser un fabricante que comercializa bajo MDF y MDD a la vez. Este número de registro acompaña a todos los productos de MDD y puede verificarse en la página web de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [220].

2.3.2. Grupo 1: Cereales y derivados

2.3.2.1. Cereales de desayuno

Se analizaron un total de 68 *cereales de desayuno* procedentes de 8 marcas, siendo 3 de ellas marcas de distribución. En la **Tabla 22** se presentan los resultados de los análisis por los dos métodos utilizados: microbiológico y cromatografía de afinidad – HPLC. Cada resultado es la media de 2 extractos trienzimáticos independientes, de los cuales diferentes alícuotas se analizaron mediante ensayo microbiológico y se purificaron por cromatografía de afinidad para luego separarse y cuantificarse por HPLC. También se calculan los resultados como Equivalentes Dietarios de Folato (EDF) aplicando la **Ecuación 1**, forma de expresar la cantidad de folato total en un alimento fortificado que da cuenta de la mayor biodisponibilidad del ácido fólico sintético [19].

[Ecuación 1]. *Cálculo de los Equivalentes Dietarios de Folatos (EDF).*

$$\mu\text{g EDF} = \mu\text{g Folatos Naturales} + (1,7 \times \mu\text{g ácido fólico})$$

2.3.2.2. Galletas

En la **Tabla 23** se presentan los resultados de los análisis por los dos métodos utilizados: microbiológico y cromatografía de afinidad – HPLC. Se analizaron un total de 13 tipos de *galletas* de 6 marcas diferentes. En este caso no se analizaron marcas de distribución.

Tabla 22. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en cereales de desayuno.

Marca Comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC			Microbiológico		
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a	Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total	
									$\mu\text{g}/100\text{ g}$
Bicentury [®]	Bicentury Línea Cereales	30	275	252,7 \pm 8,00	5,07 \pm 0,24	434,7	257,8	315,6 \pm 15,7	
	Bicentury Salud. Cereales de Salvado de Trigo	40	125	67,30 \pm 0,80	3,02 \pm 0,32	117,4	70,32	80,68 \pm 5,34	
Carrefour	Arroz inflado con chocolate (Disney [®])	ND	167	180,6 \pm 5,70	5,14 \pm 0,12	312,2	185,7	281,4 \pm 3,91	
	Bolas de maíz con chocolate (Disney [®])	ND	170	173,0 \pm 18,0	4,79 \pm 0,50	298,9	177,8	262,7 \pm 9,00	
	Bolitas de maíz con miel	30	167	208,7 \pm 2,70	11,4 \pm 1,20	366,3	220,2	307,9 \pm 17,4	
	Corn Flakes	30	200	54,1 \pm 7,40	3,96 \pm 0,29	95,93	58,06	58,97 \pm 11,1	
	Corn Flakes azucarados (Disney [®])	ND	200	146,7 \pm 0,70	4,98 \pm 0,24	254,4	151,7	146,9 \pm 1,88	
	Croc ball	ND	170	68,7 \pm 2,10	6,66 \pm 0,03	123,5	75,36	93,13 \pm 0,44	
	Crocc Chocc	30	167	163,7 \pm 2,10	1,88 \pm 0,08	280,2	165,6	131,3 \pm 21,3	
	Fibra Flakes	30	167	204,8 \pm 42,6	7,55 \pm 1,02	355,7	212,4	278,8 \pm 2,51	
	Fruits & Fibres	30	200	209,2 \pm 20,5	4,19 \pm 0,07	359,8	213,4	269,3 \pm 34,6	
	Noir Dégustation	40	125	90,00 \pm 2,10	2,19 \pm 0,02	155,2	92,19	75,44 \pm 2,70	
	Stylese Nature	30	200	325,2 \pm 14,6	2,20 \pm 0,03	555,0	327,4	254,9 \pm 1,87	
	Trigo inflado con miel (Disney)	ND	200	171,5 \pm 10,4	3,97 \pm 0,10	295,5	175,5	236,8 \pm 3,30	
	Hacendado	Copos de Maíz	30	170	147,3 \pm 4,11	30,7 \pm 0,17	281,1	178,0	198,1 \pm 1,79
		Trigo con Chocolate	30	170	140,2 \pm 5,50	9,32 \pm 0,32	247,7	149,5	198,1 \pm 4,38
Trigo con Miel		30	170	131,6 \pm 7,92	10,8 \pm 0,25	234,6	142,5	187,9 \pm 16,7	
Copos de Maíz Azucarados		30	170	110,5 \pm 8,67	21,1 \pm 0,64	209,0	131,6	191,0 \pm 4,24	
Style. Copos de Arroz y Trigo Integral con Chocolate		30	135	120,5 \pm 7,66	26,1 \pm 0,74	231,0	146,7	201,6 \pm 21,8	
Fibra. Salvado de Trigo		40	125	145,9 \pm 0,57	14,3 \pm 0,48	262,4	160,2	221,9 \pm 3,52	
Fruta y Fibra. Pasas, plátanos, coco, avellanas y manzana		30	170	208,8 \pm 4,03	15,4 \pm 1,20	370,3	224,2	328,9 \pm 6,36	
Style. Copos de arroz y trigo integral		30	166	114,9 \pm 8,95	10,6 \pm 0,94	205,9	125,5	183,0 \pm 1,43	
Minis rellenos de leche		35	171	161,3 \pm 6,08	7,49 \pm 0,59	281,7	168,8	308,0 \pm 18,1	

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF) = μg de folato natural (5-metiltetrahydrofolato) + μg de ácido fólico \times 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante, 5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato

Tabla 22. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en cereales de desayuno (Continuación).

Marca Comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC			Microbiológico		
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total	
Hipercor	Corn Flakes	30	170	343,6 \pm 10,2	2,02 \pm 0,08	586,1	345,6	346,2 \pm 7,72	
	Fit Way Salvado de Trigo	30	170	289,1 \pm 11,0	1,75 \pm 0,27	493,2	290,9	373,5 \pm 32,2	
	Fit Way Frutas Rojas	30	310	399,9 \pm 16,4	9,60 \pm 0,77	689,4	409,5	481,8 \pm 14,9	
	Fit Way Copos y Fruta	30	230	309 \pm 14,2	3,28 \pm 0,15	528,6	312,3	387,8 \pm 13,5	
	Maxi Kids Arroz y trigo chocolateado	30	170	186,3 \pm 33,3	3,17 \pm 0,36	319,9	189,5	221,5 \pm 12,9	
	Maxi Kids Copos Azucarados	30	170	221,1 \pm 11,4	3,58 \pm 0,07	379,5	224,7	261,8 \pm 6,76	
	Maxi Kids Trigo Inflado con miel y azúcar	30	170	80,20 \pm 6,00	4,35 \pm 0,49	140,7	84,55	121,8 \pm 1,00	
	Kellogg's [®]	All Bran Choco	40	125	158,7 \pm 7,10	8,42 \pm 0,62	278,2	167,1	218,0 \pm 2,44
		All Bran [®] Flakes	30	334	172,3 \pm 5,30	5,29 \pm 0,20	298,2	177,6	265,3 \pm 13,6
		All Bran [®] Flakes sabor yogur	30	295	145,1 \pm 12,5	6,35 \pm 0,34	253,0	151,5	269,7 \pm 13,4
All Bran [®] Plus		40	250	178,5 \pm 23,6	12,8 \pm 0,67	316,3	191,3	273,0 \pm 11,4	
All Bran [®] Plus sabor yogur		40	200	76,00 \pm 8,50	7,22 \pm 0,60	136,4	83,22	130,9 \pm 29,1	
All Bran [®] Splitz		40	250	74,6 \pm 4,70	18,2 \pm 1,96	145,1	92,86	134,4 \pm 4,03	
All Bran [®] Flakes Chocolate		30	300	212,4 \pm 7,40	5,31 \pm 0,39	366,4	217,7	333,8 \pm 18,1	
Choco Krispies [®]		30	167	70,20 \pm 3,60	4,31 \pm 0,14	123,7	74,51	114,3 \pm 8,42	
Choco Krispies [®] Fun'tubiz		31	110	52,30 \pm 4,90	4,07 \pm 0,06	93,00	56,37	88,76 \pm 6,72	
Choco Krispies XXL		30	167	152,8 \pm 6,80	6,06 \pm 0,67	265,8	158,9	196,5 \pm 19,8	
	Chocos	30	166	142,7 \pm 11,4	3,83 \pm 0,06	246,4	146,5	186,8 \pm 18,1	
	Corn Flakes [®]	30	167	66,90 \pm 4,10	3,07 \pm 0,30	116,8	69,97	88,16 \pm 4,35	
	Extra chocolate y avellanas	40	125	226,9 \pm 7,60	2,34 \pm 0,12	388,1	229,2	296,3 \pm 20,5	
	Extra Fruit & Fibre	40	250	121,6 \pm 2,00	3,38 \pm 0,35	210,1	125,0	192,5 \pm 10,0	
	Extra trocitos de frutas	40	125	146,1 \pm 2,60	2,54 \pm 0,10	250,9	148,6	158,1 \pm 5,16	
	Just Right	40	250	161,8 \pm 13,5	4,01 \pm 0,09	279,1	165,8	229,5 \pm 1,58	

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF) = μg de folato natural (5-metiltetrahydrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante, 5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato

Tabla 22. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en cereales de desayuno (Continuación).

Marca comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC			Microbiológico	
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total
Kellogg's [®]	Miel Pops	30	167	51,30 \pm 6,30	3,36 \pm 0,20	90,60	54,66	91,58 \pm 19,8
	Multi Krispies	30	167	245,9 \pm 13,4	6,01 \pm 0,04	424,0	251,9	316,1 \pm 7,87
	Optivita frutas del bosque	40	250	176,8 \pm 0,80	5,07 \pm 0,08	305,6	181,9	153,1 \pm 1,09
	Rice Krispies	30	167	154,9 \pm 10,2	4,96 \pm 0,07	268,3	159,9	175,1 \pm 12,1
	Smacks	30	167	153,7 \pm 5,70	4,08 \pm 0,04	265,4	157,8	213,1 \pm 10,1
	Special K [®] Classic	30	334	353,8 \pm 1,00	5,64 \pm 0,12	607,1	359,4	425,6 \pm 8,01
	Special K [®] Frutas Rojas	30	294	122,2 \pm 11,3	5,59 \pm 0,55	213,3	127,8	189,8 \pm 8,52
	Special K [®] sabor Yogur	30	290	261,6 \pm 23,2	8,06 \pm 1,20	452,8	269,7	376,0 \pm 17,7
Nestlé [®]	Special K vainilla y frutas selectas	30	294	310,1 \pm 31,9	9,80 \pm 1,28	537,0	310,1	364,5 \pm 5,71
	Crunch [®] cereales	30	170	129,5 \pm 7,80	3,29 \pm 0,17	223,4	132,8	314,1 \pm 30,3
	Estrellitas	30	170	133,8 \pm 15,6	3,50 \pm 0,11	231,0	137,3	271,6 \pm 10,3
	Fibre 1 [®]	40	130	86,8 \pm 12,0	3,73 \pm 0,26	151,3	90,53	142,1 \pm 4,50
	FIFA [®]	30	170	152,4 \pm 0,10	0,98 \pm 0,00	260,1	153,4	375,9 \pm 19,2
	Fitness & Fruits	40	260	113,6 \pm 12,7	0,87 \pm 0,02	194,0	114,5	137,8 \pm 7,18
	Fitness Chocolate	30	260	173,4 \pm 24,3	7,48 \pm 0,49	302,3	180,9	433,2 \pm 4,67
	Fitness Copos de tipo integral y arroz	30	340	274,9 \pm 0,70	5,19 \pm 0,01	472,5	280,1	290,3 \pm 7,00
Pascual [®]	Nesquik [®]	30	170	102,2 \pm 9,70	5,14 \pm 0,35	178,9	107,3	170,8 \pm 11,8
	Essential	30	330	260,6 \pm 10,0	3,57 \pm 0,08	446,6	264,2	246,0 \pm 9,73
	Fruta y Fibra Activa - Bifidus	30	145	107,8 \pm 0,70	6,15 \pm 0,24	189,4	114,0	192,1 \pm 5,77
Weetabix [®]	Muesli Extra	30	200	138,2 \pm 10,8	2,83 \pm 0,02	237,8	141,0	134,5 \pm 17,1
	Weetabix Original	37,5	170	159,8 \pm 3,30	3,96 \pm 0,20	275,6	163,8	123,1 \pm 4,61
	Weetos [®]	ND	170	196,3 \pm 20,7	2,57 \pm 0,30	336,3	198,9	135,1 \pm 1,21

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF) = μg de folato natural (5-metiltetrahydrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante

5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato

Tabla 23. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahidrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en galletas.

Marca comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC			Microbiológico	
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a	Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total
Bimbo	Tostadas redondas vitaminadas	7,5	100	56,27 \pm 3,10	9,67 \pm 0,19	105,3	65,94	81,85 \pm 2,48
Bicentury®	Galletas Sabor Yogur-Chocolate	ND	30	42,92 \pm 0,67	4,12 \pm 0,24	77,08	47,04	72,00 \pm 0,52
	Flora. Galletas doradas al horno	ND	40	79,39 \pm 3,28	3,70 \pm 0,05	138,7	83,09	135,6 \pm 2,74
Flora-Unilever	Flora. Galletas Maria Doradas	ND	40	42,13 \pm 0,47	2,53 \pm 0,09	74,16	44,66	42,66 \pm 4,18
	Flora fruta y fibra: pasas y naranja	ND	40	58,70 \pm 2,83	3,84 \pm 0,09	103,6	62,54	90,48 \pm 4,83
	Flora fruta y fibra: manzana y soja	40	80	51,79 \pm 1,57	3,51 \pm 0,11	91,55	55,30	55,40 \pm 4,88
Gullón	Dibus	ND	100	74,13 \pm 0,30	3,56 \pm 0,06	129,6	77,69	102,6 \pm 7,84
Danone	Lu Dinosaurs.	30,8	72	78,75 \pm 0,00	3,65 \pm 0,31	137,5	78,75	141,5 \pm 4,34
	Lu Minidinosaurus sabor chocolate	60	67	71,74 \pm 1,90	4,15 \pm 0,24	126,1	71,74	97,71 \pm 0,20
Santiveri®	Galletas María	ND	100	185,7 \pm 16,4	3,83 \pm 0,02	319,5	189,5	354,7 \pm 18,0
	Galletas Digestive con cacao	ND	100	186,3 \pm 10,8	3,42 \pm 0,07	320,2	189,8	291,7 \pm 10,9
	Galletas Digestive con arándanos	ND	100	117,3 \pm 4,07	3,23 \pm 0,03	202,7	120,5	162,5 \pm 7,70
	CookiSanas Aloe Vera	ND	100	161,4 \pm 9,00	3,02 \pm 0,16	277,5	164,5	274,2 \pm 17,4

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF)= μg de folato natural (5-metiltetrahidrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

2.3.3. Grupo 2: Leche y derivados

2.3.3.1. Leche

Se analizaron un total de 26 productos de 11 marcas comerciales de las cuales 2 eran MDD. Los tipos de *leche* analizada incluyeron leche de vaca entera, desnatada y semidesnatada, también se analizaron leches sin lactosa y batidos a base de leche (**Tabla 24**).

2.3.3.2. Preparados lácteos

Denominados común pero erróneamente "*leche con omega 3*", esta categoría incluye leche a base de soja y leche adicionada con grasa vegetal o animal distinta de la procedente de leche de vaca. Se analizaron 17 preparados lácteos de 9 marcas comerciales de las cuales 3 eran MDD (**Tabla 25**).

2.3.3.3. Yogures y bebidas fermentadas

Se analizaron 21 *yogures* (enteros y desnatados) y *bebidas fermentadas* procedentes de 2 marcas comerciales. En este caso, no encontramos en el mercado alimentos de este subgrupo comercializados bajo MDD (**Tabla 26**).

Tabla 24. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahidrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en leche y batidos lácteos.

Marca comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC				Microbiológico	
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a		Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total
				$\mu\text{g}/100\text{ g}$					
Carrefour	Leche Energía y Crecimiento Disney [®]	ND	32	63,06 \pm 2,62	9,06	\pm 0,92	116,3	72,12	92,92 \pm 7,32
Celta [®]	Celta [®] energía y crecimiento. Enriquecida.	250	30	53,35 \pm 2,36	8,18	\pm 0,80	98,88	61,53	65,96 \pm 1,58
Central	NaturCalcio Crecimiento. Entera	ND	30	50,25 \pm 0,19	1,99	\pm 0,01	87,42	52,24	68,15 \pm 0,96
Lechera	Leche Crecimiento y Energía (Superman Returns [®])	ND	30	47,40 \pm 5,29	8,55	\pm 0,63	89,13	55,95	51,81 \pm 1,00
Asturiana	Pre Mamá	ND	80	134,8 \pm 23,0	10,8	\pm 1,78	239,9	145,6	200,7 \pm 11,3
Nutrexpa	Colacao Complet	200	30	43,37 \pm 1,91	nd	-	73,73	43,37	41,30 \pm 0,92
Hacendado	Leche enriquecida con calcio 100% natural, desnatada	250	30	47,76 \pm 1,26	5,45	\pm 0,16	86,65	53,22	71,24 \pm 3,01
	Leche Sin Lactosa Semidesnatada	250	30	40,02 \pm 0,58	nd	-	68,03	40,02	48,08 \pm 4,50
	Batido sabor Vainilla	250	30	35,08 \pm 0,42	nd	-	59,63	35,08	41,19 \pm 1,26
	Batido de Chocolate	250	30	35,68 \pm 0,49	nd	-	60,65	35,68	34,84 \pm 0,48
	Batido sabor Vainilla	200	30	38,16 \pm 0,47	nd	-	64,87	38,16	43,54 \pm 2,52
	Batido de Chocolate	200	30	34,00 \pm 0,68	nd	-	57,78	34,00	41,79 \pm 2,30
	Batido sabor Fresa	200	30	34,50 \pm 2,12	3,71	\pm 0,20	62,37	38,22	42,77 \pm 1,80
Kaiku	Kaiku Plus Sin Lactosa desnatada	ND	30	57,30 \pm 1,98	nd	-	97,35	57,27	69,13 \pm 0,35

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF)= μg de folato natural (5-metiltetrahidrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

Tabla 24. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en leche y batidos lácteos (Continuación).

Marca Comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC			Microbiológico	
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a	Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total
Lauki [®]	Lauki calcio semidesnatada	200	30	63,92 \pm 1,32	8,96 \pm 0,19	117,6	72,88	78,26 \pm 6,49
Pascual [®]	Essential [®] Leche desnatada UHT	ND	30	53,35 \pm 4,60	8,95 \pm 1,01	99,65	62,30	77,56 \pm 4,83
	Leche Pascual [®] Calcio Entera.	200	30	46,55 \pm 1,04	10,8 \pm 1,05	89,94	57,35	55,14 \pm 6,50
	Leche Pascual [®] Calcio Semidesnatada.	ND	30	42,20 \pm 0,41	10,1 \pm 0,62	81,79	52,25	47,62 \pm 1,27
	Leche Pascual [®] Calcio Desnatada.	200	30	45,54 \pm 1,21	8,90 \pm 0,20	86,32	54,44	55,40 \pm 0,15
Plena	Leche entera. Energía	250	30	51,54 \pm 2,42	8,12 \pm 0,62	95,74	59,66	50,92 \pm 2,13
Puleva [®]	Puleva [®] Max. Energía + crecimiento	200	30	47,97 \pm 0,51	5,28 \pm 0,36	86,83	53,25	59,91 \pm 4,53
	Puleva [®] calcio mamá	250	80	102,4 \pm 3,23	9,37 \pm 0,38	183,5	111,8	132,8 \pm 0,35
	Puleva [®] calcio complet	250	30	20,30 \pm 0,94	2,12 \pm 0,10	36,63	22,42	72,01 \pm 3,69
	Batido al cacao con cereales	250	30	31,15 \pm 2,17	4,73 \pm 0,00	57,70	35,89	28,49 \pm 1,73
	Puleva [®] Max. Energía + crecimiento. Con cereales y fruta	ND	30	52,44 \pm 1,18	6,79 \pm 0,06	96,00	59,23	56,63 \pm 0,13
Ram [®]	Ram [®] energía y crecimiento	250	30	55,85 \pm 0,13	7,14 \pm 0,26	102,1	62,99	58,10 \pm 3,25

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF)= μg de folato natural (5-metiltetrahydrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante

5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato

Tabla 25. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahydrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en preparados lácteos.

Marca Comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC					Microbiológico	
				Ácido Fólico ^a		5-MTHF ^a		Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total
				$\mu\text{g}/100\text{ g}$		$\mu\text{g}/100\text{ g}$				
Carrefour	Omega 3 preparado lácteo	ND	32	358,0 \pm 8,61	11,9 \pm 1,60	620,5	370,0	300,5 \pm 13,0		
Celta	Bem Vital	250	40	23,75 \pm 0,33	7,14 \pm 0,68	47,52	31,00	41,26 \pm 2,91		
Central	Alpro Soja Ligera	ND	34	52,69 \pm 3,83	nd \pm -	89,57	52,70	68,06 \pm 5,20		
Lechera Asturiana	Eroski w3	250	30	31,75 \pm 4,01	7,67 \pm 0,72	61,64	39,42	35,82 \pm 2,00		
Eroski	Flora Semi Folic B [®]	200	40	47,93 \pm 2,10	5,77 \pm 0,41	87,24	53,69	49,87 \pm 2,30		
Flora-Unilever	Bebida de Soja	250	31	41,31 \pm 1,84	2,39 \pm 0,00	72,62	43,70	54,04 \pm 1,05		
Gerblé [®]	Omega 3 DHA	250	30	55,57 \pm 2,18	6,37 \pm 0,60	100,8	61,95	78,67 \pm 6,57		
Hacendado	Energía + Crecimiento. Omega 3 DHA	250	30	78,75 \pm 4,48	7,77 \pm 0,49	141,6	86,52	122,1 \pm 0,48		
Hero [®]	Hero [®] Baby Lactis Natural	100	15	25,18 \pm 0,50	5,37 \pm 0,35	48,18	30,55	18,3 \pm 0,41		
	Hero [®] Baby Lactis Fresa	100	15	32,49 \pm 1,71	8,90 \pm 0,53	64,13	41,39	19,45 \pm 1,66		
Kaiku [®]	Benecol [®] natural	70	86	73,09 \pm 0,01	nd	124,3	73,09	94,01 \pm 1,81		
	Benecol [®] fresa	67,5	90	118,6 \pm 15,0	10,7 \pm 1,02	212,4	129,3	237,8 \pm 14,5		
	Kaiku Actif fresa	65	310	187,6 \pm 28,7	6,49 \pm 1,57	325,4	194,1	452,8 \pm 12,4		
	Kaiku Activ 0% natural desnatado	70	340	204,0 \pm 12,8	5,56 \pm 0,27	352,4	209,6	323,2 \pm 15,4		
	Actif Memory fresa y plátano	65	310	126,1 \pm 9,29	12,2 \pm 0,38	226,6	138,3	166,6 \pm 9,37		
	Benecol [®] Soja. Emmi+	65	75	54,36 \pm 3,61	14,1 \pm 0,61	106,5	68,48	71,25 \pm 4,63		
	Colágeno Post 25	65	260	57,70 \pm 0,27	3,17 \pm 0,20	101,3	60,87	45,14 \pm 5,11		
Puleva [®]	Puleva [®] omega 3	250	30	19,44 \pm 0,24	2,03 \pm 0,02	35,08	21,47	75,60 \pm 1,54		
	Puleva [®] Peques 3-DHA. Leche de crecimiento	ND	6	16,13 \pm 0,87	7,01 \pm 1,02	34,43	23,14	7,212 \pm 0,82		

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF)= μg de folato natural (5-metiltetrahydrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante

5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato

Tabla 26. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahidrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en yogures y leches fermentadas.

Marca Comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC			Microbiológico		
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a	Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total	
Danone [®]	Danup [®] fresa y plátano	175	30	33,58 \pm 0,23	nd	-	57,09	33,58	29,39 \pm 1,53
	Danup [®] Ice lima limón	200	30	34,75 \pm 0,05	nd	-	59,08	34,75	39,29 \pm 2,00
	Danup [®] Ice & creamy, fresa-nata	175	30	28,49 \pm 1,29	nd	-	48,43	28,49	24,74 \pm 0,04
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, Natural	125	30	40,51 \pm 5,31	nd	-	68,87	40,51	44,98 \pm 2,51
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, sabor fresa	125	30	26,70 \pm 1,88	nd	-	45,39	26,70	35,78 \pm 1,62
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, sabor limón	125	30	27,61 \pm 2,76	nd	-	46,94	27,61	36,50 \pm 1,62
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, trozos fresa	125	30	34,37 \pm 2,00	9,86 \pm 0,93		68,29	44,23	41,41 \pm 1,72
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, trozos melocotón	125	30	45,89 \pm 1,31	7,12 \pm 0,48		85,13	53,01	50,45 \pm 0,62
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, trozos piña	125	30	39,11 \pm 1,89	nd	-	66,49	39,11	68,82 \pm 4,02
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, trozos frambuesa y kiwi	125	30	31,12 \pm 2,01	8,01 \pm 0,98		60,91	39,13	40,59 \pm 0,97
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, cremoso fresa y plátano	125	30	35,86 \pm 1,26	nd	-	60,96	35,86	55,15 \pm 0,70
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, cremoso mango	125	30	27,74 \pm 2,34	4,50 \pm 0,68		51,66	32,24	31,55 \pm 1,47
	Vitalínea [®] 0% M.G. plus, Delicioso cookies	125	30	28,94 \pm 1,40	3,57 \pm 0,13		52,77	32,51	40,67 \pm 0,90
	Vitalínea [®] 0% M.G. Plus, con Sactiactiv [®] Fresa	125	30	39,13 \pm 1,12	2,32 \pm 0,07		68,84	41,45	46,37 \pm 0,60
	Kaiku [®]	Vitalínea [®] 0% M.G. Plus, Mousse de fruta. Fresa y Frambuesa	88	30	27,84 \pm 0,93	12,4 \pm 0,07		59,74	40,24
Vitalínea [®] 0% M.G. Plus, Mousse de fruta. Melocotón y mango		88	30	27,76 \pm 0,15	7,44 \pm 0,39		54,63	35,20	38,66 \pm 0,95
Actif Piña Emmi+		65	310	171,7 \pm 5,42	8,53 \pm 0,68		300,4	180,2	185,2 \pm 7,05
	Actif Limón Emmi+	65	310	212,1 \pm 5,18	9,58 \pm 0,11		370,2	221,7	262,2 \pm 30,0
	Actif Natural Emmi+	70	330	155,0 \pm 4,56	6,23 \pm 0,31		269,7	161,2	180,3 \pm 8,63
	Benecol [®] Light sabor natural. Emmi+	65	90	65,47 \pm 2,44	4,46 \pm 0,13		115,7	69,92	77,26 \pm 0,92

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF)= μg de folato natural (5-metiltetrahidrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

2.3.4. Grupo 3: Bebidas no lácteas

2.3.4.1. Cacao y café soluble

Se analizaron un total de 6 productos de los cuales 4 eran cacao soluble y 2 preparados de café soluble, correspondientes a 4 marcas comerciales de las cuales sólo una era marca de distribución (MDD). Los resultados se exponen en la **Tabla 27**. Los preparados de café soluble ya no se comercializan a fecha de mayo de 2010. Se analizaron además 3 zumos y néctares de 2 marcas comerciales, siendo una de ellas MDD.

Tabla 27. Contenido en ácido fólico, 5-metiltetrahidrofolato, Equivalentes Dietarios de Folato y folato total obtenido por el método de cromatografía de afinidad-HPLC y folato total obtenido por el método microbiológico *L. rhamnosus* (NCIB 10463) en Cacao y Café soluble y Zumos y néctares.

Marca Comercial o de distribución	Nombre del producto	Ración declarada (g o ml)	Ácido Fólico declarado $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Cromatografía de afinidad-HPLC				Microbiológico	
				Ácido Fólico ^a	5-MTHF ^a		Equivalentes Dietarios de Folato ^b	Folato Total ^c	Folato Total
				$\mu\text{g}/100\text{ g}$					
Cacao y Café soluble									
Carrefour	Cacao +	ND	180	156,9 \pm 10,2	nd	-	266,7	157,0	202,6 \pm 13,0
Nutrexpa	Colacao Complet Instantáneo	20	300	284,4 \pm 23,8	5,55 \pm 0,47		489,0	290,0	374,1 \pm 36,5
Gerlinea	Gerlinea Adalgaza. Batido de Chocolate	30	285,3	225,8 \pm 24,9	3,95 \pm 0,13		387,9	229,8	438,8 \pm 23,6
Nestlé	Nescafé Active descafeinado	5	920	486,0 \pm 65,6	12,1 \pm 0,98		838,2	498,1	699,4 \pm 73,8
	Nescafé Active	5	920	510,0 \pm 30,5	12,8 \pm 0,35		880,4	523,2	727,8 \pm 22,1
	Nesquik Junior. Adaptado a niños desde 18 meses	25	63	71,40 \pm 3,70	5,87 \pm 0,03		127,2	77,20	66,87 \pm 5,00
Zumos y néctares									
Carrefour	Cocktail (botella 1L)	200	30	29,47 \pm 1,07	10,1 \pm 0,04		60,18	39,54	36,09 \pm 3,91
	Cocktail (tetrabrik individual)	200	30	22,39 \pm 0,33	6,97 \pm 0,28		45,04	29,36	12,83 \pm 0,18
Solán de Cabras	Bisolán Melocotón	330	30	24,65 \pm 0,82	17,2 \pm 1,70		59,06	41,81	12,48 \pm 1,03

^a Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de dos extractos trienzimáticos independientes

^b Equivalentes Dietarios de Folato (EDF)= μg de folato natural (5-metiltetrahidrofolato) + μg de ácido fólico x 1,7

^c Suma de los vitámeros individuales expresados en ácido fólico

nd: no detectable, menor que el límite de detección

ND: no declarada por el fabricante

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

2.4. Concordancia entre los métodos utilizados

Con el objeto de conocer el grado de concordancia y correlación de los resultados obtenidos mediante los dos métodos utilizados en este trabajo se calculó la correlación por regresión lineal, el coeficiente de correlación intraclass (CCI) y el modelo de Bland-Altman para comparación gráfica de métodos [207].

En la **Figura 40** se representa la regresión entre los resultados obtenidos para las 154 muestras de alimentos fortificados, con una R^2 relativamente baja ($R^2=0,855$). Observamos que a medida que aumenta la concentración de ácido fólico la correlación es menor.

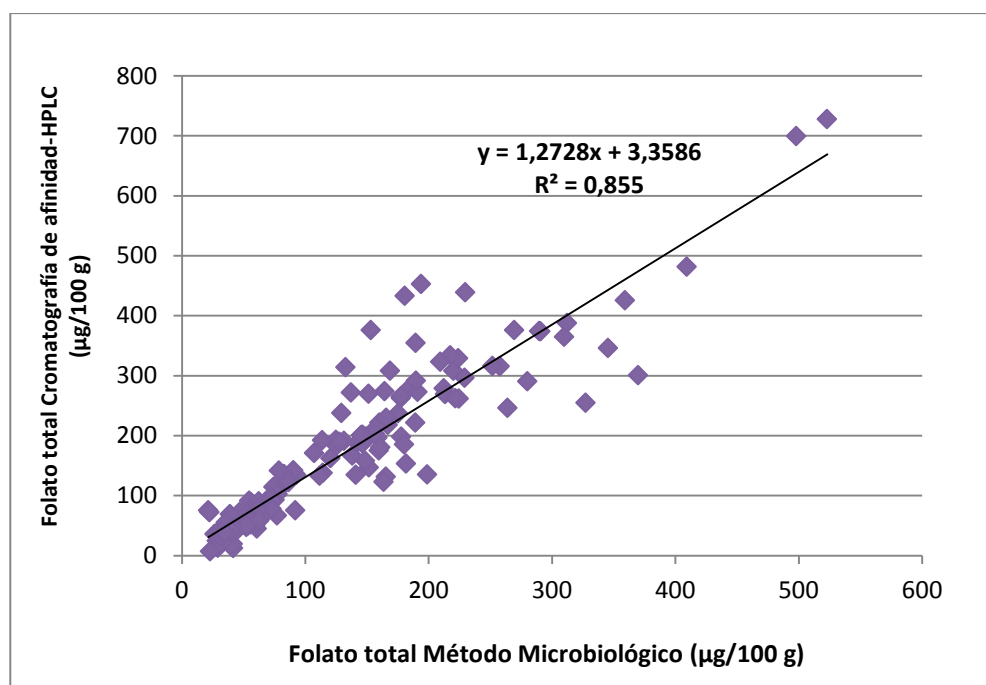


Figura 40. Comparación de la concentración de folato total en 154 muestras de alimentos fortificados con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.

Si desglosamos la gráfica anterior en función al grupo de alimento obtenemos una serie de figuras que nos indican que aunque la matriz sea de la misma naturaleza, los resultados entre ambos métodos podrían presentar poca correlación mediante el método de Pearson. En la **Figura 41** se presenta la regresión obtenida para el subgrupo de los *cereales de desayuno*, con una $R^2=0,667$ y en la **Figura 42** la del subgrupo *galletas*, que presenta una $R^2=0,953$.

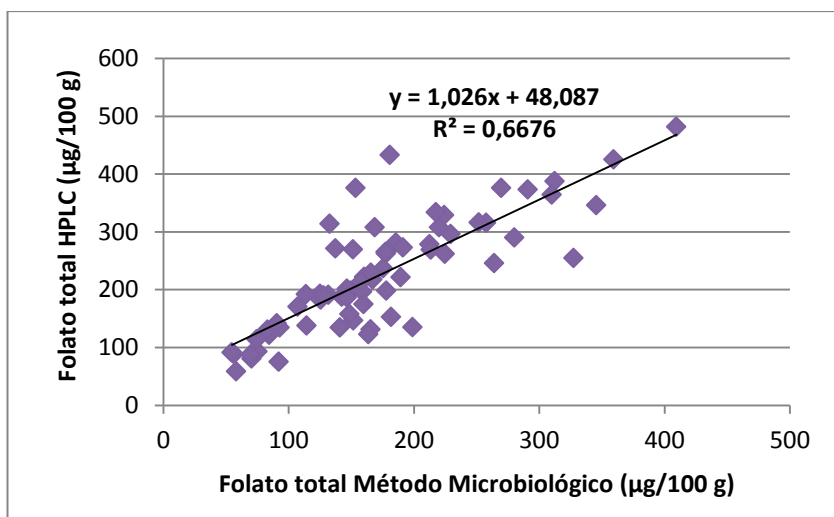


Figura 41. Comparación de la concentración de folato total en cereales de desayuno fortificados con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.

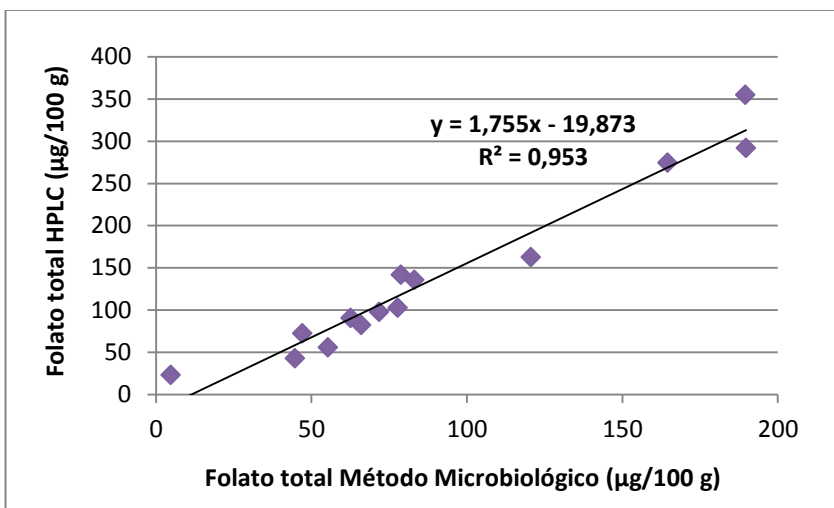


Figura 42. Comparación de la concentración de folato total en galletas fortificadas con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.

La **Figura 43** presenta la regresión obtenida para el grupo de *leche y derivados* en su totalidad (incluye *yogures* y *leches fermentadas* y *preparados lácteos*), puede observarse que la R^2 es mayor que la de los *cereales de desayuno*. Para el grupo de las *bebidas (no lácteas)* se obtiene un mejor coeficiente de regresión, $R^2=0,975$ (**Figura 44**).

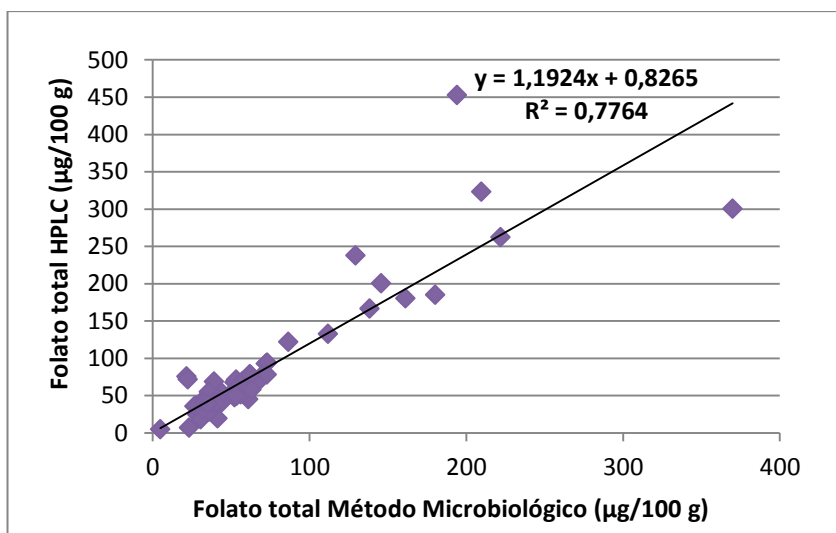


Figura 43. Comparación de la concentración de folato total en leche y derivados fortificados con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.

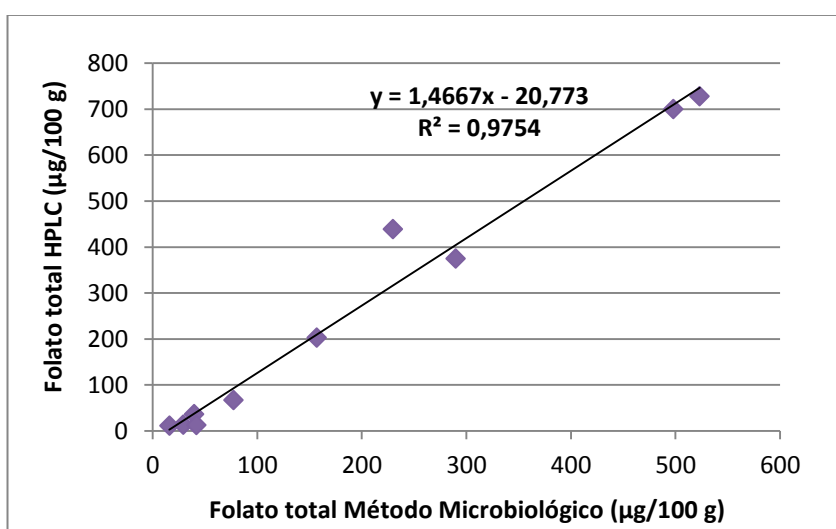


Figura 44. Comparación de la concentración de folato total en bebidas (no lácteas) fortificadas con ácido fólico. Método microbiológico vs. Cromatografía de afinidad-HPLC.

El coeficiente de correlación intraclase obtenido en las 154 muestras de alimentos analizados fue de 0,836 (IC del 95%: 0,612-0,915), que de acuerdo a Landis y Koch [206] supone una buena fuerza de concordancia entre los dos métodos analíticos (0,71-0,90).

El modelo de Bland-Altman se utiliza para evaluar de forma gráfica el grado de concordancia entre dos métodos diferentes ya que los autores establecen que una elevada correlación lineal entre métodos no implica siempre una adecuada concordancia, es decir que un método pueda remplazar a otro en el análisis o medida de un parámetro [207, 208]. En este caso aplicamos el modelo para conocer hasta qué punto los valores obtenidos por el método de cromatografía de afinidad-HPLC (ácido fólico + folatos naturales), pueden predecir los valores de folato total obtenidos del método microbiológico que es el considerado “de referencia”.

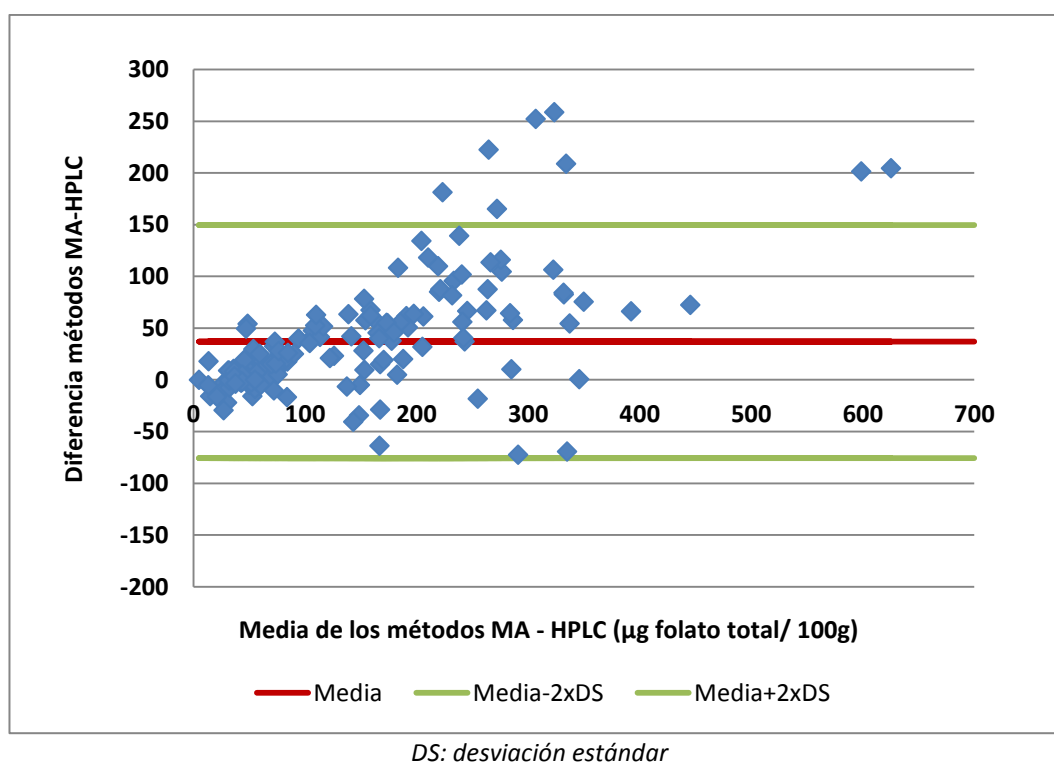


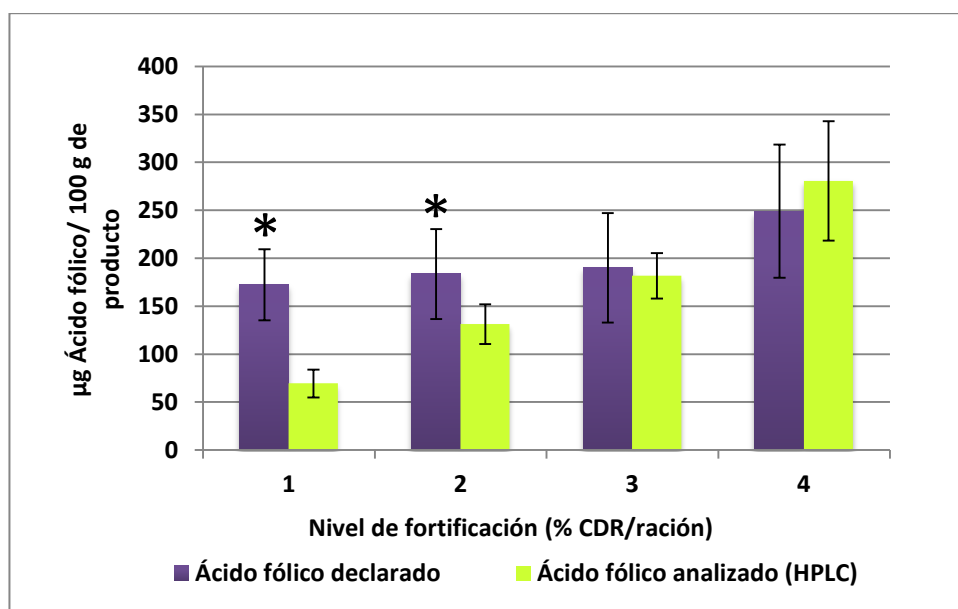
Figura 45. Resultados de la regresión del método de Bland-Altman que compara los métodos microbiológico (MA) y cromatografía de afinidad-HPLC (HPLC) para el análisis de folato total en 154 alimentos fortificados con ácido fólico.

Observamos en la **Figura 45** que a mayor concentración de folatos por 100 g de producto, menor concordancia presentan los métodos al alejarse de la media e incluso superar los límites superiores establecidos. Las discrepancias alcanzan hasta los 250 µg de folato total/ 100 g, estas diferencias no son tan obvias si observamos el gráfico de correlación por regresión lineal del apartado anterior (**Figura 40**).

2.5. Análisis de los datos de alimentos fortificados con ácido fólico obtenidos frente a los niveles declarados en el etiquetado nutricional

2.5.1. Ácido fólico obtenido por cromatografía de afinidad-HPLC frente a valores declarados en el etiquetado nutricional

Para comparar los valores de ácido fólico obtenidos en el análisis frente a los valores declarados por los fabricantes en el etiquetado utilizamos los datos obtenidos de la cromatografía de afinidad acoplada a identificación por HPLC, debido a que es el método que nos permite cuantificar el ácido fólico sintético o añadido de forma aislada. Los resultados de los 154 alimentos fortificados analizados se segmentaron en los cuatro niveles de fortificación previamente descritos obteniendo la media de cada uno y comparándola con la media de los niveles de fortificación declarados por el fabricante, por 100 g, para cada subgrupo de alimentos. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en cuatro de los seis subgrupos estudiados, las cuales fueron independientes del tipo de alimento/matriz estudiado, ya que se observaron sólo en determinados niveles de fortificación.

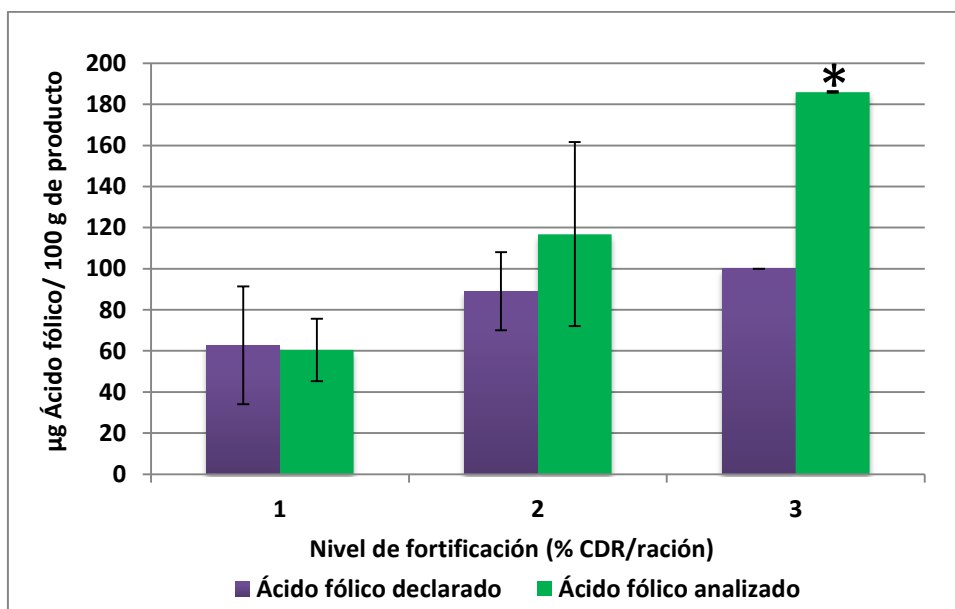


Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante. Significación prueba U de Man-Whitney $*p < 0,001$ para muestras no paramétricas.

Figura 46. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en cereales de desayuno.

En la **Figura 46** se observa que para el subgrupo de los *cereales de desayuno* existen diferencias significativas ($p < 0,001$) en los valores obtenidos frente a los declarados en los niveles de fortificación 1 y 2, siendo menor la cantidad media de ácido fólico obtenida mediante análisis. En el caso del Nivel 1 de fortificación, los valores declarados son 2,5 veces los obtenidos mediante análisis.

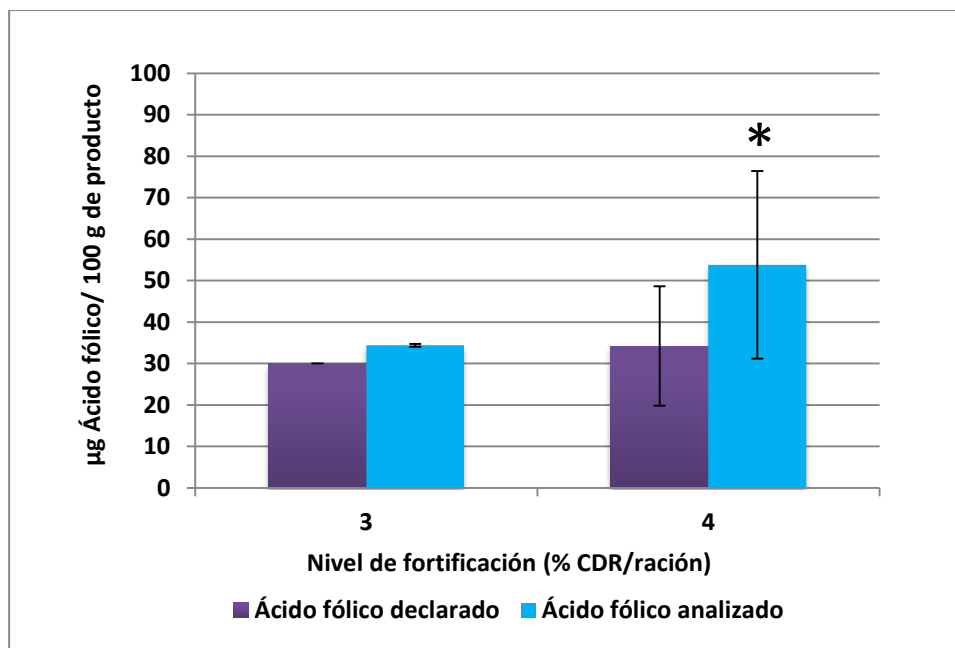
En el subgrupo de las *galletas* (**Figura 47**) por el contrario, se observa una diferencia significativa ($p < 0,001$) en el Nivel 3 de fortificación, por la cual los valores obtenidos en el análisis suponen una media de 1,8 veces los valores declarados en el etiquetado.



Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante. Significación prueba U de Man-Whitney * $p < 0,001$ para muestras no paramétricas.

Figura 47. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en galletas.

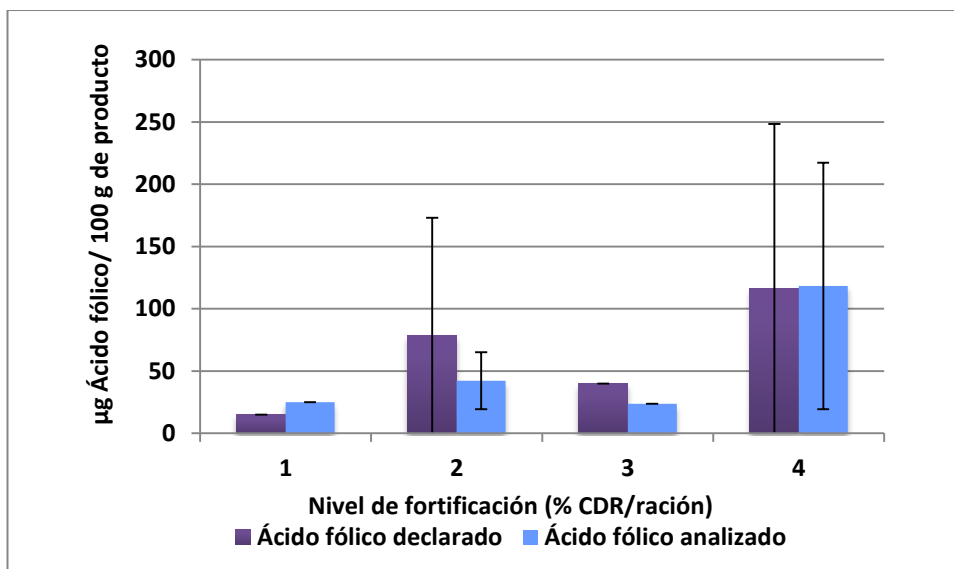
El subgrupo de *leches* que incluye las leches enteras, desnatadas, semidesnatadas y los batidos lácteos analizados, únicamente presentó 2 niveles de fortificación de acuerdo a la segmentación realizada, y de éstos, únicamente el Nivel 4 presentó diferencias significativas ($p < 0,001$) en los valores analizados de ácido fólico frente a los declarados (**Figura 48**).



Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: \geq 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante. Significación prueba U de Man-Whitney * $p < 0,001$ para muestras no paramétricas.

Figura 48. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en leche.

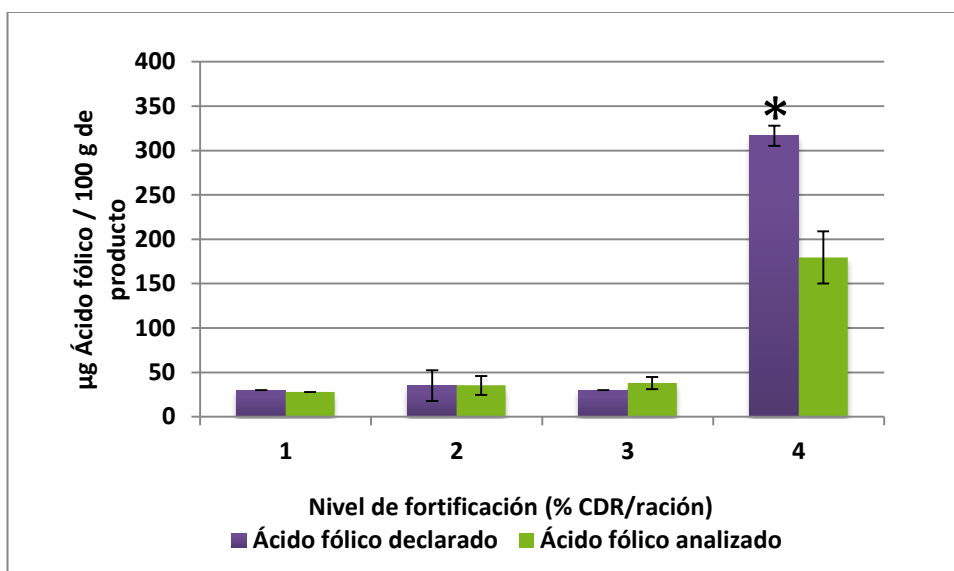
Los valores analíticos de ácido fólico obtenidos en el subgrupo de *preparados lácteos* no difirió de forma significativa de los valores declarados por el fabricante, tal como se observa en la **Figura 49**. Las diferencias observadas en el Nivel 2 y 3 de fortificación son debidas al nivel de fortificación por ración, es decir los alimentos incluidos en el Nivel 2 tienen mayor cantidad de ácido fólico por 100 g pero menor ración declarada por envase o etiquetado (65 ml) que los alimentos pertenecientes al Nivel 3 (200 ml), efecto hasta ahora no observado en los demás subgrupos dado que mantienen similares las raciones declaradas por el fabricante.



Nivel 1: $\leq 16\%$, Nivel 2: $16,1 - 25,9\%$, Nivel 3: $26 - 34,9\%$, Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 49. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en preparados lácteos.

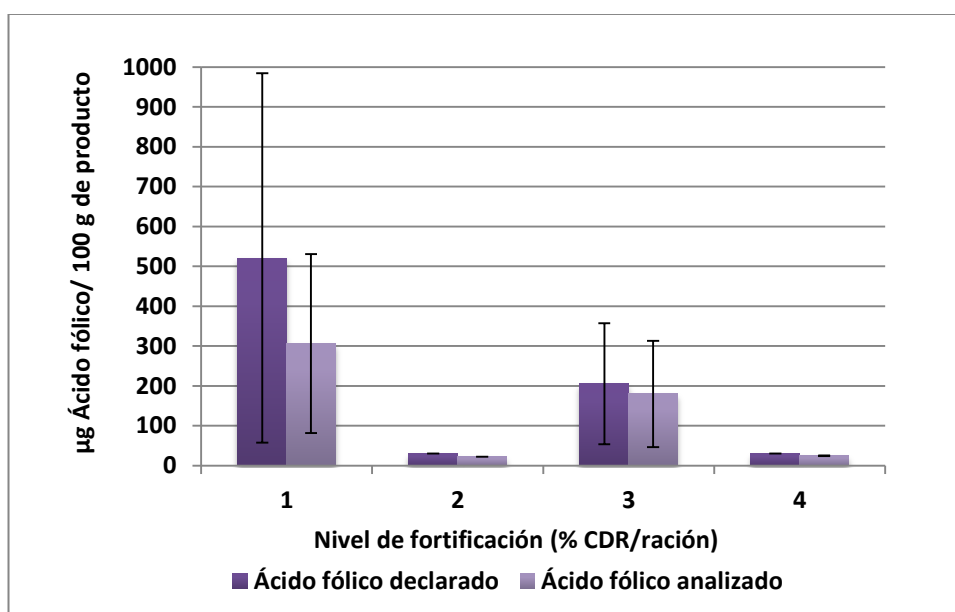
En el subgrupo de los *yogures y leches fermentadas* (Figura 50) se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el Nivel 4 de fortificación, donde los valores declarados por el fabricante suponían 1,7 veces los obtenidos de forma analítica.



Nivel 1: $\leq 16\%$, Nivel 2: $16,1 - 25,9\%$, Nivel 3: $26 - 34,9\%$, Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante. Significación prueba U de Man-Whitney $*p < 0,001$ para muestras no paramétricas.

Figura 50. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en yogures y leches fermentadas.

En la **Figura 51** se representan los valores obtenidos para el subgrupo de las *bebidas (no lácteas)* las cuales no presentaron diferencias significativas frente a los valores declarados en el etiquetado. Los Niveles 1 y 3 de fortificación están compuestos por los productos de cacao soluble fortificado, cuyas raciones de consumo se encuentran entre 15 y 30 g, por este motivo los valores de ácido fólico por 100 g son superiores a los declarados y obtenidos de forma analítica. Los niveles 2 y 3 incluyen los zumos y néctares cuya ración de consumo es de 200-300 ml.



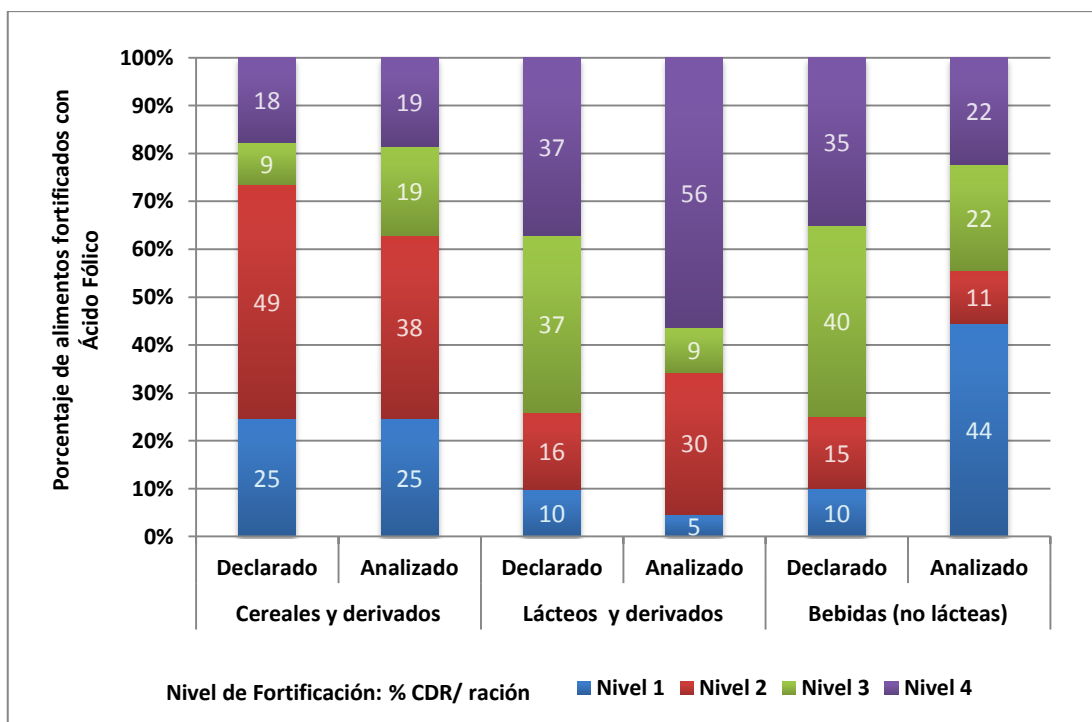
Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante. Significación prueba U de Man-Whitney * $p < 0,001$ para muestras no paramétricas.

Figura 51. Niveles de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC frente a los declarados por el fabricante en Bebidas (no lácteas).

Junto con los *preparados lácteos*, las *bebidas (no lácteas)* fueron los únicos subgrupos de alimentos que no presentaron diferencias significativas entre los valores declarados de ácido fólico y los obtenidos mediante análisis.

2.5.2. Distribución de grupos de alimentos analizados según niveles de fortificación con ácido fólico y grupos de población diana frente a valores declarados en el etiquetado nutricional

En el presente apartado estudiamos en conjunto los niveles de fortificación de los tres grupos de alimentos fortificados con ácido fólico analizados y los comparamos con los valores declarados por el fabricante en el etiquetado. Los niveles medios de fortificación fueron similares en el caso del grupo de *cereales y derivados* donde, tal y como se observa en la **Figura 52** las proporciones se mantienen relativamente similares en los valores obtenidos por análisis y los declarados por el fabricante. La excepción es el Nivel 3 de fortificación, que constituye el 19% de los alimentos de este grupo analizados frente al 9% de los valores declarados. En consecuencia el porcentaje de productos pertenecientes al Nivel 2 es menor de acuerdo a los valores analizados (38% frente al 49% de acuerdo a los valores declarados).

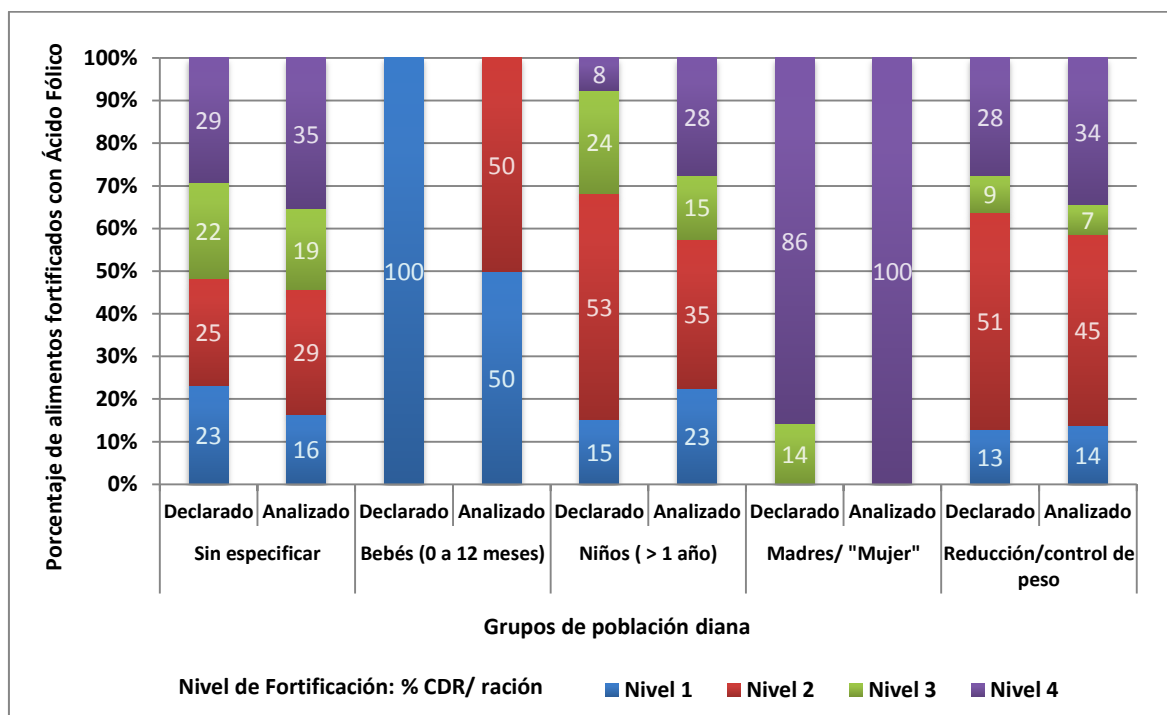


Nivel 1: ≤ 16 %, Nivel 2: 16,1 – 25,9 %, Nivel 3: 26 – 34,9 %, Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 52. Niveles de fortificación con ácido fólico: valores obtenidos de forma analítica frente a valores declarados por el fabricante según el grupo de alimentos.

En el grupo de *leche y derivados* encontramos una situación muy distinta, ya que de acuerdo a los valores analíticos, el Nivel 4 de fortificación es mayoritario, con un 56% de los alimentos, frente al 37% que indican los valores declarados por el fabricante. Además, atendiendo a los valores analíticos, se observa una proporción muy reducida de alimentos en el Nivel 3 de fortificación, un 9% frente al 37% de los valores medios declarados. Por último, en el grupo de *bebidas (no lácteas)* los valores analíticos medios dan como mayoritario el Nivel 1 de fortificación, con un 44% de los alimentos frente al 10% obtenido como media de los valores declarados.

Una vez analizadas las diferencias encontradas en los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico en función al nivel de fortificación, estimamos importante conocer si dichos niveles difieren en función al grupo diana de población a los que van dirigidos los alimentos que hemos analizado. Los resultados se muestran en la **Figura 53**. Se observa que en cuatro de los cinco grupos diana de población, la proporción de alimentos que se clasifican dentro del Nivel 4 es superior, sobretodo en el grupo de los niños (> 1 año).



Nivel 1: $\leq 16\%$, Nivel 2: $16,1 - 25,9\%$, Nivel 3: $26 - 34,9\%$, Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200 \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 53. Niveles de fortificación con ácido fólico obtenidos analíticamente para los grupos de población diana, comparación con los valores declarados por el fabricante.

Los alimentos que no especifican población de consumo, que a su vez son los mayoritarios en la Base de Datos, mantienen relativamente constantes las proporciones de cada nivel de fortificación cuando se comparan los valores medios declarados por el fabricante frente a los analizados. Presentan proporciones mayores en el Nivel 1 y 3 de fortificación siendo un 7 y 3% superiores respectivamente. Por el contrario, el Nivel 4 obtenido con los valores medios analizados tiene mayor porcentaje de alimentos, un 35% frente al 29% de los declarados.

Los alimentos para bebés (0 a 12 meses) de acuerdo a los valores declarados por el fabricante, se encuentran en su totalidad fortificados en el Nivel 1, mientras que los valores analizados nos indican que hasta un 50% de los mismos se clasifican dentro del Nivel 2.

Los alimentos destinados a niños (>1 año) presentan diferencias en los Niveles 2 y 3 de fortificación, siendo superior su proporción de acuerdo a los valores medios declarados por el fabricante. Por el contrario este grupo presenta mayor porcentaje de alimentos que, de acuerdo a los valores analizados, se encuentran en el Nivel 1 y 4 de fortificación.

Los alimentos que tienen a las mujeres o "*madres*" como diana de consumo, si bien representan un porcentaje bajo dentro de la Base de Datos, declaran encontrarse en su mayoría fortificados en el nivel superior y esto lo corroboramos mediante los datos analíticos de ácido fólico en dichos productos.

Se observó que aquellos productos comercializados para el control de peso mantenían en ambos casos una baja proporción de productos fortificados en el Nivel 1 y 3, siendo mayor la proporción en los Niveles 2 y 4. A su vez, de acuerdo a los valores obtenidos de forma analítica, la proporción de alimentos del Nivel 4 fue superior en un 6% a los valores medios declarados por el fabricante.

2.6. Inclusión de resultados analíticos en la Base de Datos

Los datos obtenidos por ambos métodos, para los 154 alimentos analizados, se consideraron de validez adecuada para su inclusión en la Base de Datos. Se utilizó para ello los identificadores para los distintos vitámeros de folatos según lo recomendado por el tesoro EuroFIR [180]. Los datos analíticos pueden consultarse para cada alimento analizado en el archivo digital que contiene la Base de Datos.

3. ESTIMACIÓN Y EVALUACIÓN DEL APORTE DE ÁCIDO FÓLICO A PARTIR DE LOS ALIMENTOS FORTIFICADOS ANALIZADOS A LAS RECOMENDACIONES DE INGESTA DE FOLATOS PARA DISTINTOS GRUPOS DE POBLACIÓN MEDIANTE ESCENARIOS DE SIMULACIÓN


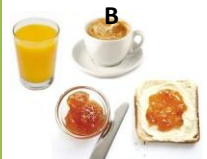








3.1. Modelos de desayuno y escenarios de simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico para distintos grupos de población

Se diseñaron diez modelos de desayuno de acuerdo a la Guía de la Alimentación Saludable editada en 2004 por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) [209] y atendiendo que los requerimientos energéticos de los distintos grupos de edad y situación fisiológica (**Tabla 28**) se cubrieran entre un 20 y un 25% de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía total diaria [138]. Para cada modelo de desayuno se plantearon dos escenarios de sustitución de alimentos no fortificados por alimentos equivalentes fortificados con ácido fólico analizados en el presente trabajo (**Tabla 29**). En el *Escenario 1* se sustituyó un alimento de cada modelo de desayuno y en el *Escenario 2* se sustituyeron dos o tres alimentos por sus equivalentes fortificados. Asimismo, se consideraron los Niveles 1 y 4 de fortificación de dichos alimentos para evaluar su adecuación a las IR de ácido fólico [138] y si mediante su consumo se superan los Niveles Máximos Tolerables de ingesta (NMT) de ácido fólico [78]. Los resultados de las simulaciones se presentan por grupos de edad y situación fisiológica.

Tabla 28. Grupos de edad empleados en la simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico en el desayuno.

Grupos	Rango de edades
Infantil y adolescente	1 a 3
	4 a 5
	6 a 9
	10 a 12
	13 a 15
Mujeres	Edad fértil: 16 a 49
	Gestación
	Lactancia
	50 a 59
	≥ 60
Hombres	16 a 49
	50 a 59
	≥ 60

Tabla 29. Modelos de desayuno y escenarios para la simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico.

Código Desayuno	Alimentos	Escenarios: N Alimentos Fortificados incluidos		
		1	2	3
 A	Zumo naranja natural			
	Leche entera de vaca	Leche entera de vaca	-	-
	Pan blanco tostado			
	Aceite de oliva			
	Azúcar blanco			
Zumo Naranja natural				
 B	Leche entera de vaca	Leche entera de vaca	Zumo-néctar Comercial Leche	-
	Pan blanco tostado			
	Mermelada			
	Mantequilla			
	Azúcar blanco			
	Zumo Naranja natural			
 C	Leche entera de vaca	Galletas	Leche Galletas	Leche Galletas Zumo-néctar comercial
	Galletas			
	Cacao soluble azucarado			
	Zumo Naranja natural			
 D	Leche entera de vaca	Cereales de desayuno	Leche Cereales de desayuno	Leche Cereales de Desayuno Zumo-néctar comercial
	Cereales de desayuno			
	Azúcar blanco			
	Zumo Naranja natural			
 E	Leche entera de vaca	Zumo-néctar comercial	-	-
	Pan blanco tostado			
	Tomate al natural, enlatado			
	Azúcar blanco			
	Zumo-néctar comercial			
 F	Yogurt	Yogurt	-	-
	Pan blanco de molde			
	Mantequilla			
	Kiwi (pieza de fruta)			
 G	Yogurt entero de sabores	Galletas	Yogurt Galletas	
	Frutos secos			
	Galletas			
 H	Yogurt entero de sabores	Cereales de desayuno	Yogurt cereales de desayuno	-
	Manzana			
	Cereales de desayuno			
 I	Leche entera de vaca	Leche entera de vaca	-	-
	Cacao soluble azucarado			
	Donuts o bollería industrial			
	Azúcar blanco			
 J	Leche entera de vaca	Leche entera de vaca	-	-
	Pan blanco de barra			
	Tomate al natural, enlatado			
	Azúcar blanco			

3.1.1. Edad Infantil y adolescente

a. Niños y niñas de 1 a 3 años

En la **Figura 54** se presentan los resultados de los modelos de desayuno diseñados en cuanto a la energía y los folatos naturales que aportan. Estos son expresados como ácido fólico, ya que de esta forma se expresan las recomendaciones para población española [23]. Los diez modelos superan el 20% de las IR de energía para este grupo de edad y el Modelo A podría considerarse el menos adecuado para segmento al aportar un 35% de la energía total.

En cuanto al aporte de folatos, dado que son alimentos sin fortificar, observamos que los modelos A – D aportan entre un 50 y 60% de las IR, básicamente están contenidos en el zumo de naranja natural. Los desayunos E al H aportan entre un 25 y un 50% de estas IR dada la inclusión de zumo -si bien es comercial- y fruta fresca (manzana y kiwi). Los modelos I y J aportan menos de un 20% de las IR de ácido fólico.

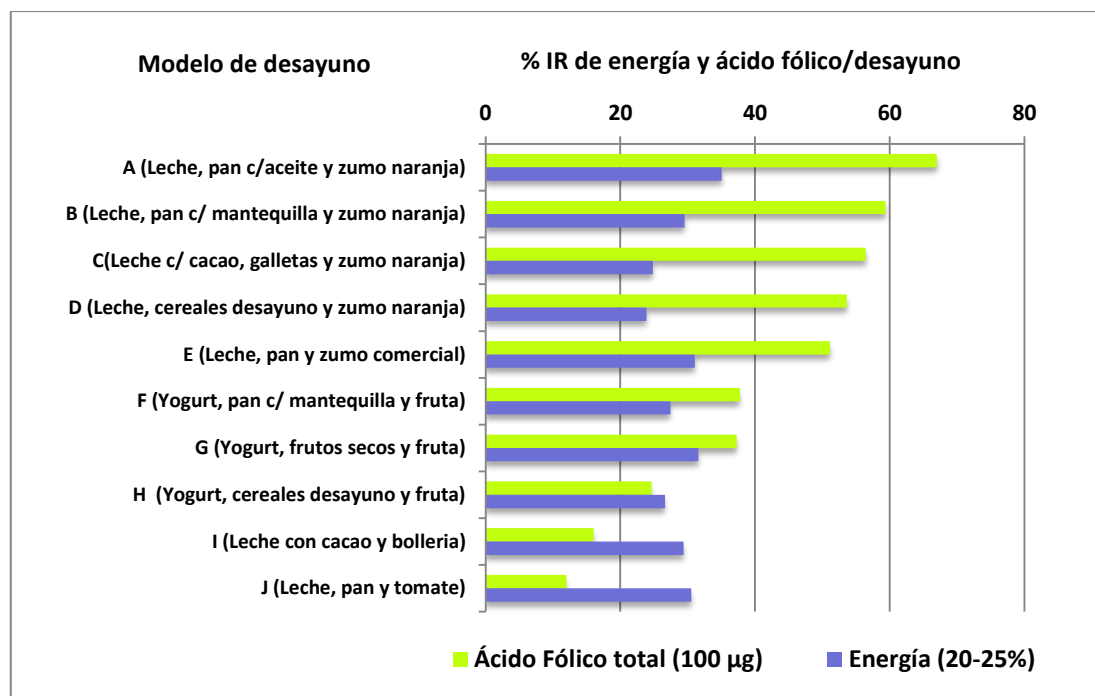
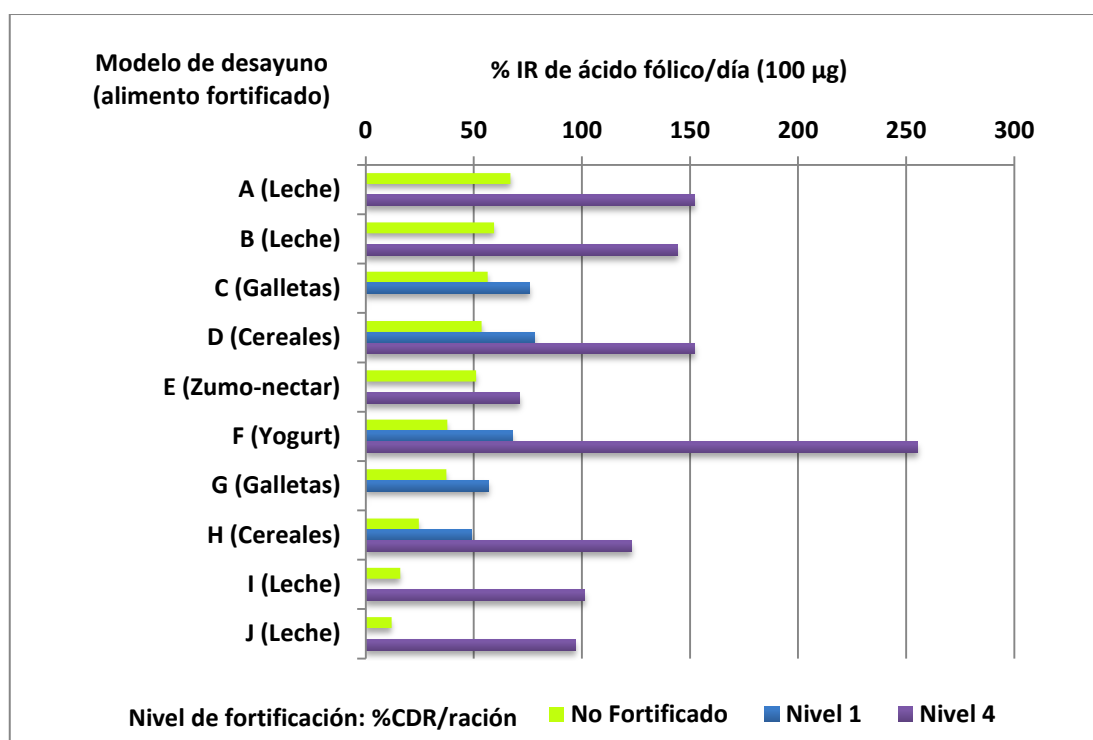


Figura 54. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

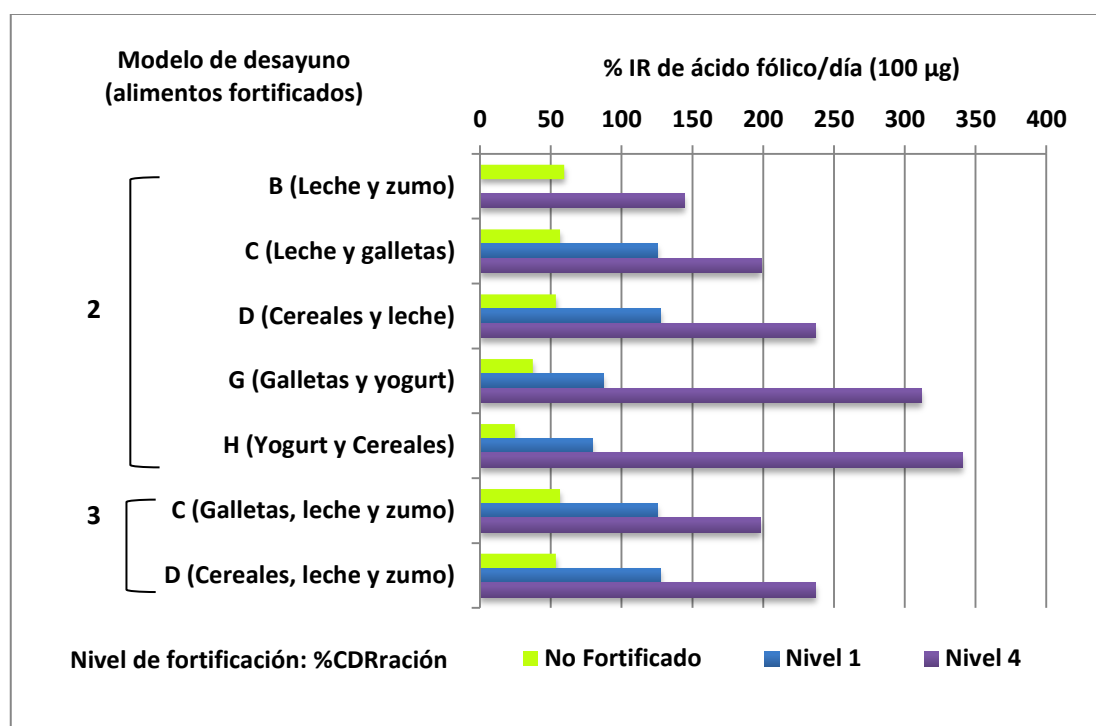
Al calcular el *Escenario 1* de simulación para los distintos modelos de desayuno (**Figura 55**) observamos que la contribución a las IR de ácido fólico aumenta hasta un 150% al sustituir la *leche* no fortificada por *leche* fortificada con ácido fólico en un Nivel 4 (como ya se expuso, la *leche* no se fortifica con Nivel 1 ni 2) en el Modelo A de desayuno, situación similar se obtiene cuando la sustitución se realiza con *cereales de desayuno* fortificados al mismo nivel (Modelo D). Sin embargo, el alimento que realiza un mayor aporte de ácido fólico es el *yogurt* fortificado con el Nivel 4, ya que supera en 2,5 veces las IR de ácido fólico de este grupo de edad. También podemos observar cómo el aporte del Nivel 1 de fortificación del *yogurt* aporta un 68% de las IR de ácido fólico frente al 37% del desayuno con *yogurt* no fortificado. Otros aportes importantes son los que implica la sustitución de la *leche* fortificada con el Nivel 4 en los modelos I y J, ya que mediante su inclusión se alcanzaría aproximadamente el 100% de las IR de ácido fólico frente al 12-16% de los modelos con *leche* sin fortificar.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 55. *Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.*

En la simulación de acuerdo al *Escenario 2* (**Figura 56**) encontramos como es lógico que la inclusión del *yogurt* con Nivel 4 de fortificación en los modelos G y H, al adicionar sus aportes de ácido fólico a los *cereales de desayuno* y a las galletas fortificadas, respectivamente, contribuyen a las IR en un 310 y 340%, es decir, la inclusión de estos dos alimentos fortificados triplican las IR totales de ácido fólico de los niños y niñas entre 1 y 3 años.

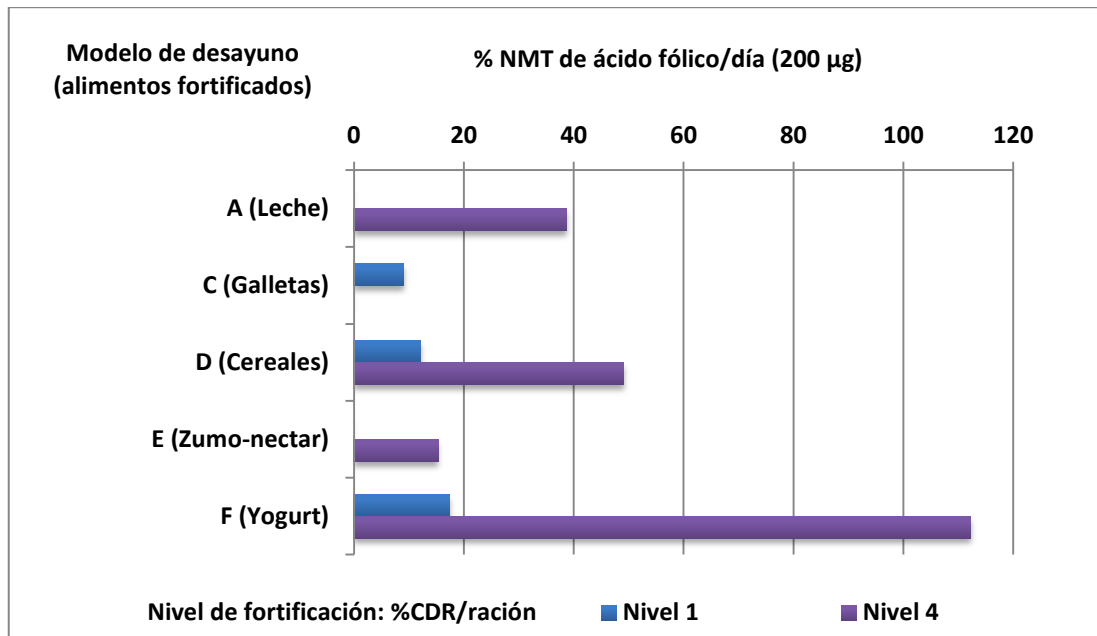


Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 56. *Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.*

Por otro lado, la inclusión de dos alimentos en los modelos C y D alcanzan entre el 200 y el 237% de las IR. Es importante en este punto especificar que el de ácido fólico del zumo comercial fortificado es similar al contenido en folatos naturales de un zumo de naranja natural. Así, los modelos C y D que incluyen tres alimentos fortificados son el ejemplo claro de que no siempre incluir el sustituto fortificado supondrá obtener mayor aporte de la vitamina, ya que aportan la misma cantidad de ácido fólico que los modelos C y D que incluyen dos alimentos fortificados, esto es, debido al zumo comercial.

El gráfico de la **Figura 57** representa la proporción en la que se superan los Niveles Máximos tolerables de Ingesta (NMT) de ácido fólico mediante la inclusión de un alimento fortificado (*Escenario 1*). Lógicamente es el alimento de mayor contenido en ácido fólico, el *yogurt* fortificado supera estos niveles en un 12%.

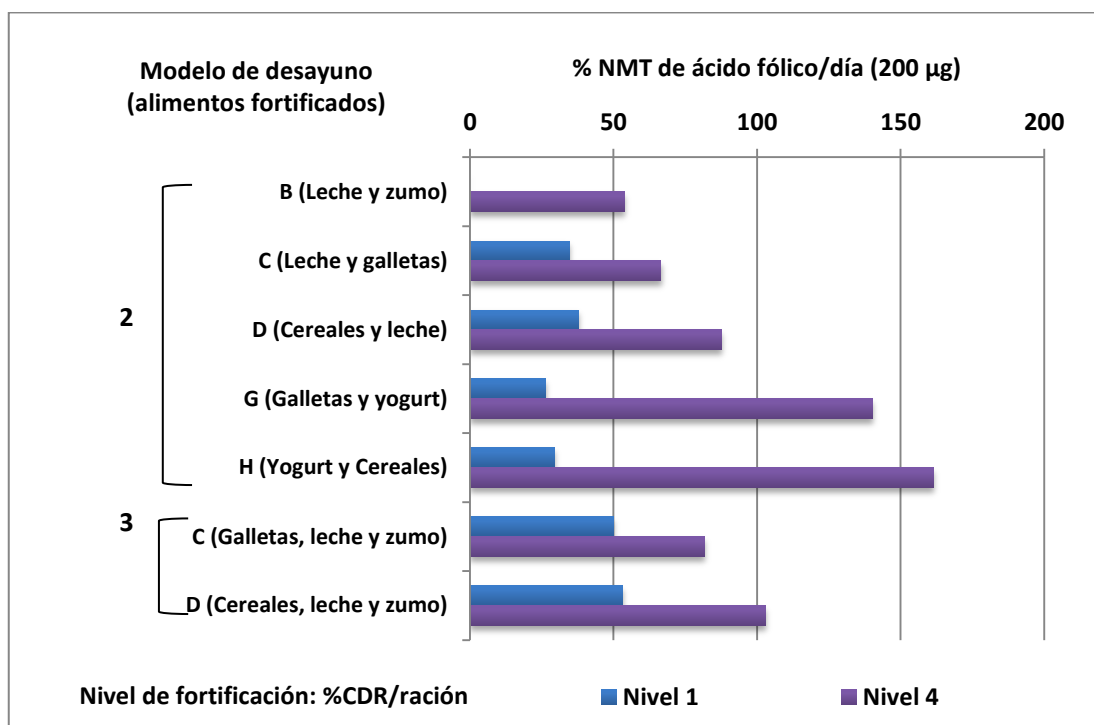


Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 57. *Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.*

En la **Figura 58** que representa el *Escenario 2*, observamos que los modelos G y H superarían de forma potencial el NMT, en un 40 y un 61% respectivamente, el Modelo H que incluye *yogurt* y *cereales de desayuno* fortificados con el Nivel 4 es que el mayor aporte de ácido fólico supondría. Por otro lado, si comparamos el Modelo D con el Nivel 4 de fortificación observamos que el que incluye 3 alimentos, supera el NMT en un 3% mientras que su equivalente de 2 alimentos se encuentra un 20% por debajo del límite. En este caso, y volviendo al aporte de folatos naturales del zumo de naranja natural, hay que especificar que la forma natural de la vitamina B₉ no se considera para el cálculo de los NMT, únicamente el ácido fólico, que si aporta el *zumo* comercial fortificado, por tanto y a modo de resumen, ambos modelos aportan IR de ácido fólico similares pero solo el que incluye tres

alimentos fortificados se encontraría cerca del límite del NMT de ingesta para este grupo de edad.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 58. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

Los niños y niñas entre 1 y 3 años son el grupo que tiene mayor riesgo de alcanzar y superar el nivel máximo tolerable de ingesta (NMT) debido a que sus Ingestas Recomendadas (IR) difieren del NMT en sólo 100 µg de ácido fólico. Mediante la inclusión de un único alimento fortificado, los yogures fortificados del nivel 4 superarían el NMT en un 12% (112% del NMT).

Si consideramos la inclusión de 2 o 3 alimentos fortificados, el nivel de fortificación 4, en las combinaciones de 2 alimentos: *yogurt y cereales de desayuno* (H) *yogurt y galletas* (G) superarían el NMT en un 61 y un 40%, respectivamente. También la inclusión potencial de 3 alimentos fortificados con el nivel 4 (D, *leche, cereales y zumo*) alcanzaría el NMT de los niños de 1 a 3 años (103% del NMT).

b. Niños y niñas de 4 a 5 años

Para este grupo de edad los modelos de desayuno no fortificados diseñados aportan entre un 6 y un 33% de las IR de ácido fólico y entre un 17 y 25% de la energía total diaria recomendada (**Figura 59**). Al aumentar dos veces los requerimientos de ácido fólico respecto al segmento anterior de edad proporcionalmente disminuye el aporte del contenido en folato naturales de los desayunos no fortificados.

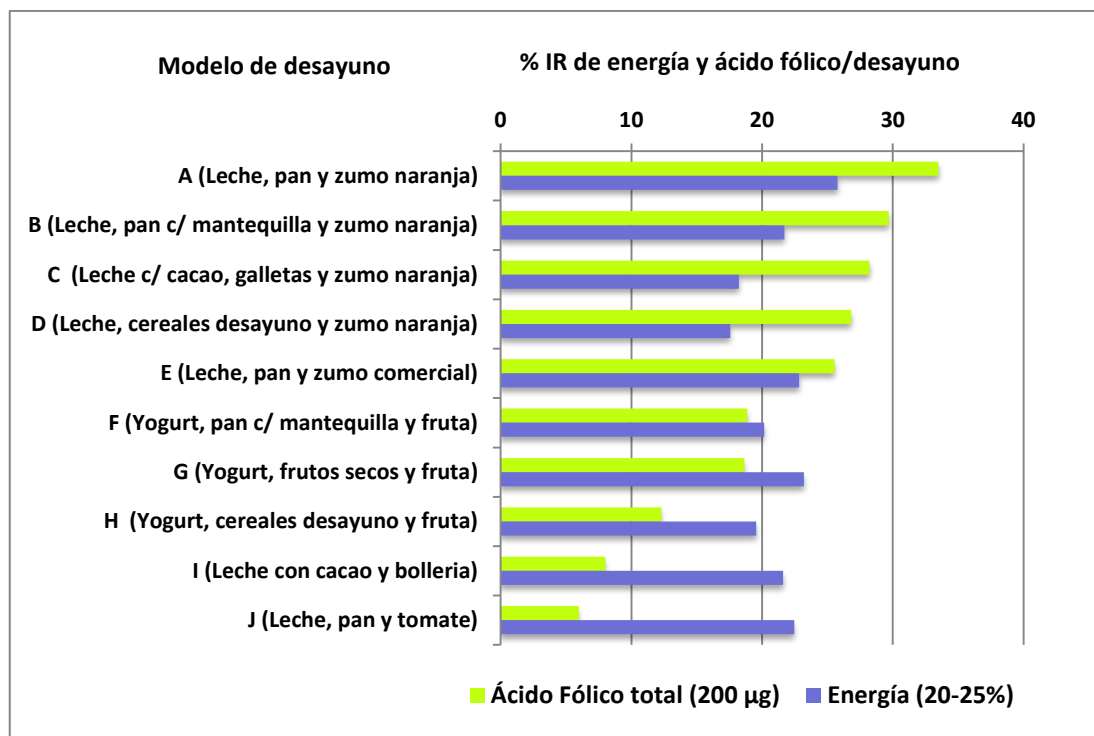
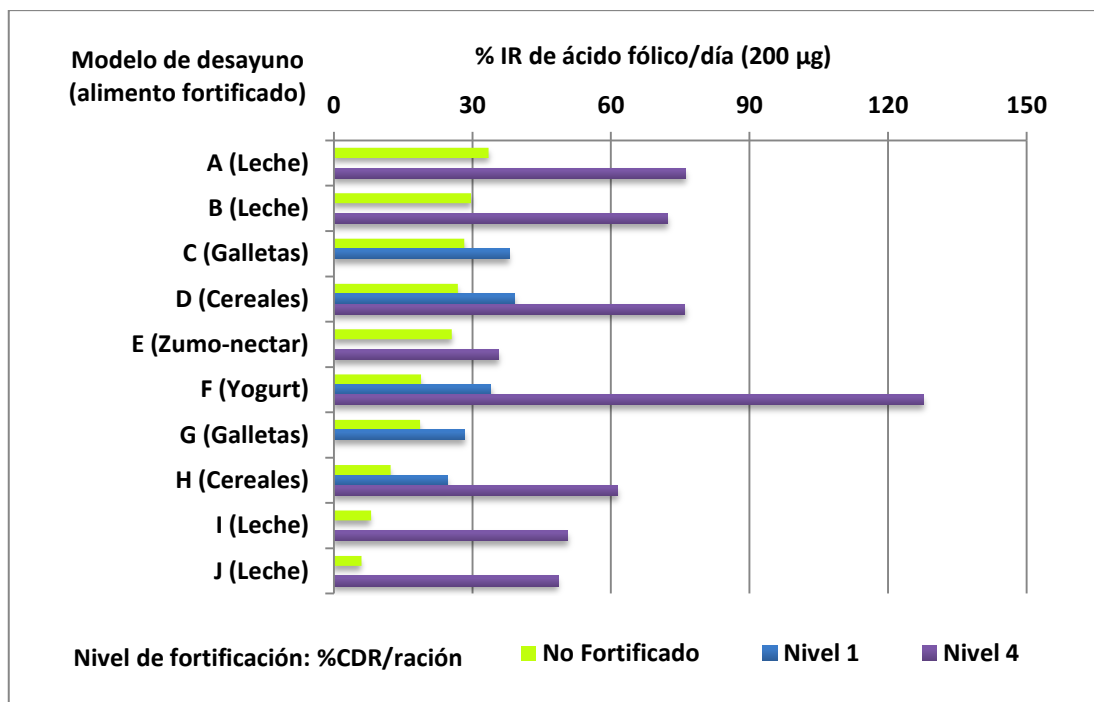


Figura 59. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

En la **Figura 60** se representa el aporte de ácido fólico obtenido teóricamente a partir de la inclusión de un alimento fortificado y podemos observar que los modelos que incluyen un alimento fortificado, como *galletas* o *cereales*, con el Nivel 1 contribuyen entre un 25 y un 40% a las IR. Además, los modelos A, B, D y H, que incluyen bien *leche* o *cereales* fortificados con el Nivel 4 suponen el 50% de las IR, mientras que el Modelo F (*yogurt*) supera los requerimientos de este grupo de edad en un 28%.

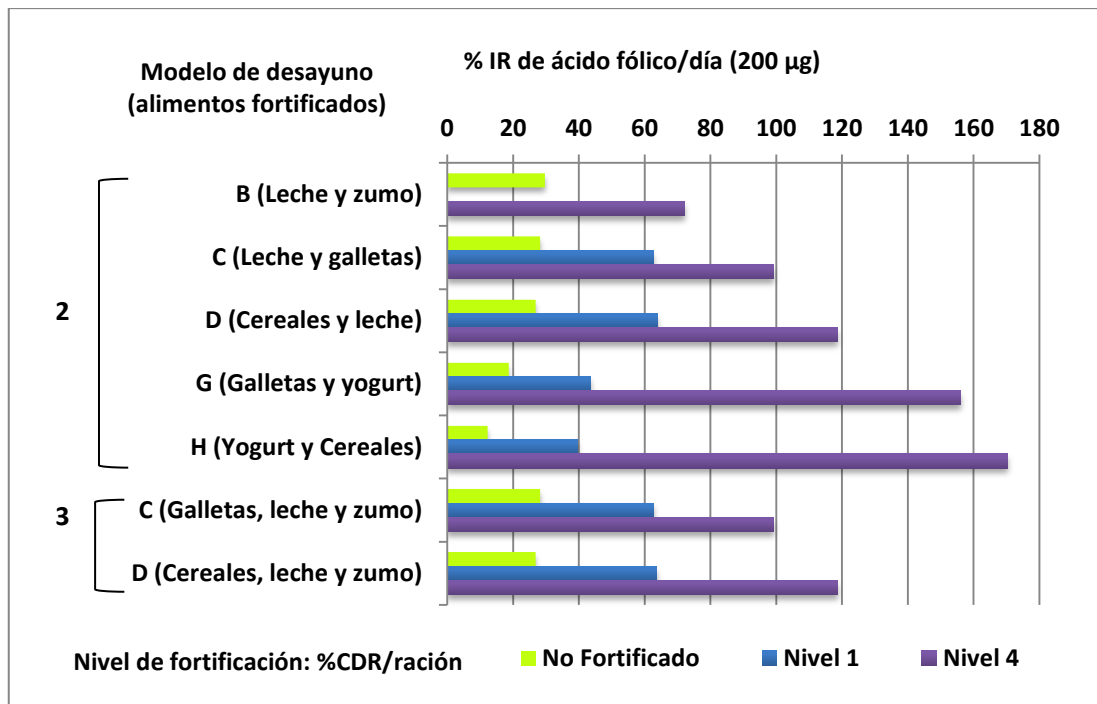


Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 60. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

En el *Escenario 2* (**Figura 61**) la sustitución de dos alimentos tales como la *leche* y las *galletas* o bien la *leche* y *cereales de desayuno* por sus equivalentes fortificados (modelos C y D) con el Nivel 1 contribuyen al 60% de las IR de ácido fólico, y si consideramos la fortificación de los mismos alimentos pero con el Nivel 4, el aporte sería aproximadamente del 100-110% de las IR.

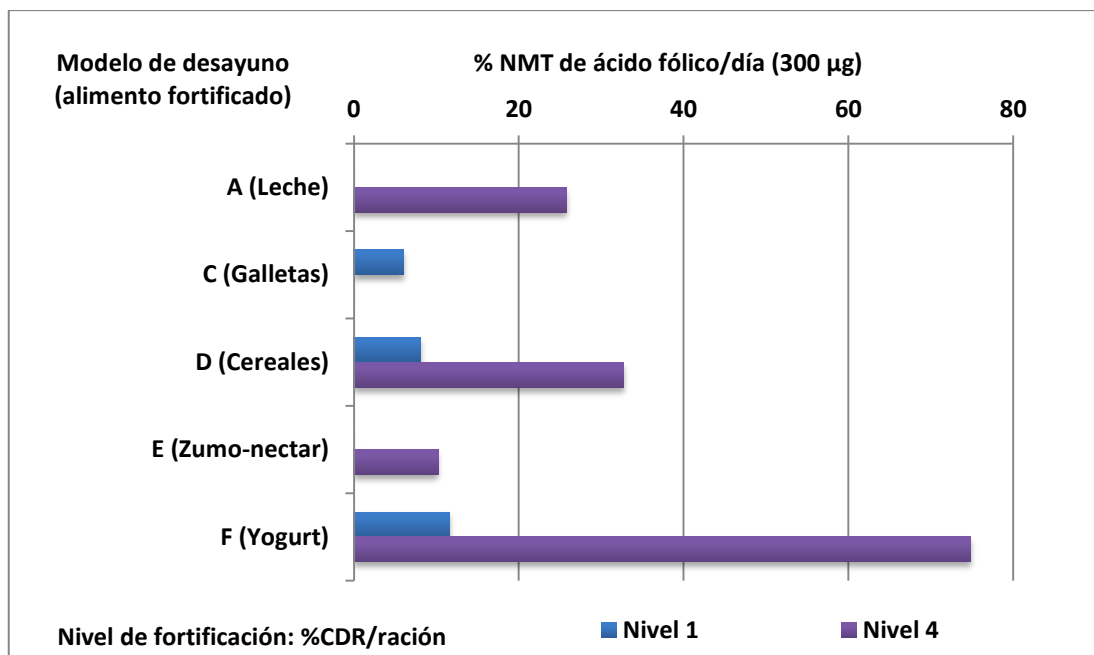
Si estudiamos la inclusión conjunta de tres alimentos con los mismos modelos (**Figura 61**) encontramos aportes equivalentes dado el contenido en folatos naturales de zumo de naranja, ya citado. Los modelos que incluyen *yogurt* con *galletas* (G) o *yogurt* con *cereales* (H) superan las IR en un 56 y un 70%, respectivamente.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

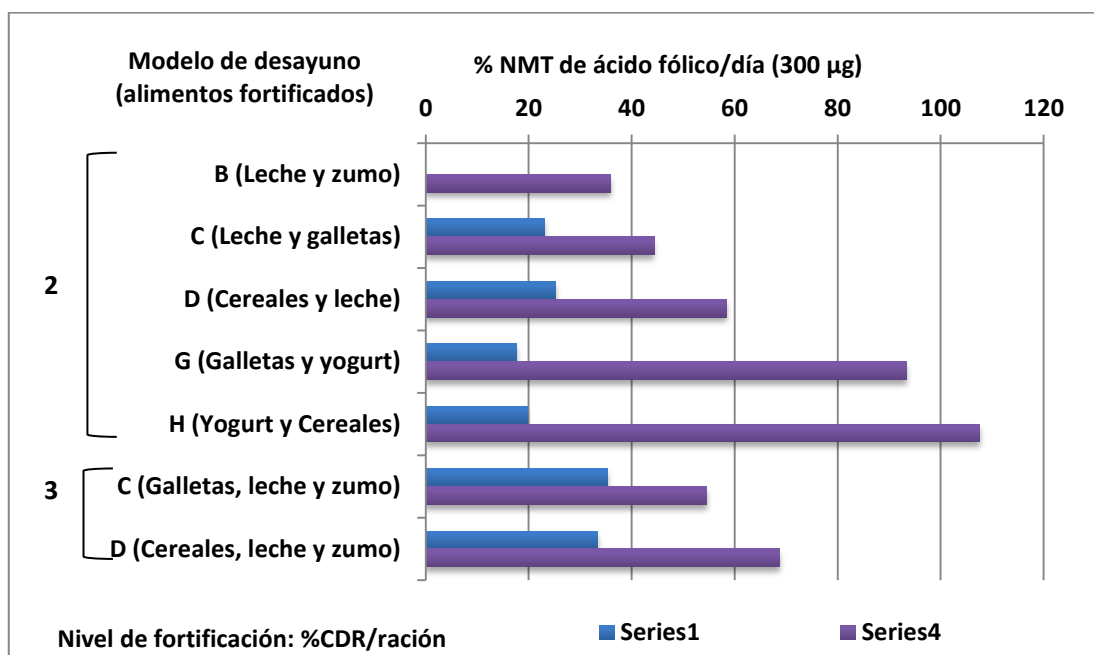
Figura 61. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

Cuando analizamos los niveles del NMT de ingesta alcanzados mediante el *Escenario 1* (**Figura 62**) observamos que en ningún Modelo se superan dichos valores. En el *Escenario 2* (**Figura 63**) únicamente el Modelo H donde el yogurt y los cereales se fortifican en el Nivel 4, supera el NMT de ingesta en un 8% aproximadamente, el Modelo G si bien se encuentra en valores cercanos, no los supera.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 62. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 63. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

c. Niños y niñas de 6 a 9 años

En los modelos de desayuno no fortificados representados en la **Figura 64** se analizan del porcentaje de las Ingestas Recomendadas de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno. En este grupo las raciones de alimentos se calculan como un 75% de las establecidas para un adulto [213] pero se observa que con estas no se alcanza en muchos casos el 20% de la energía. Los aporte de folatos naturales van del 8 al 40% de las recomendaciones de ácido fólico (IR), siendo superiores en los Modelos A, B, C y D.

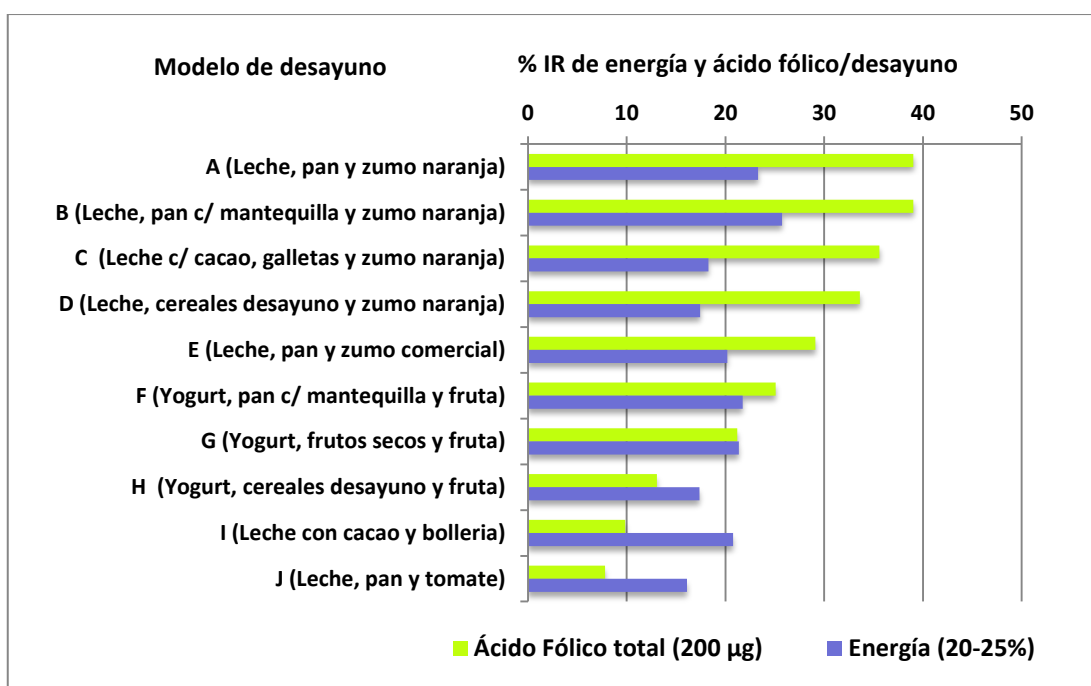
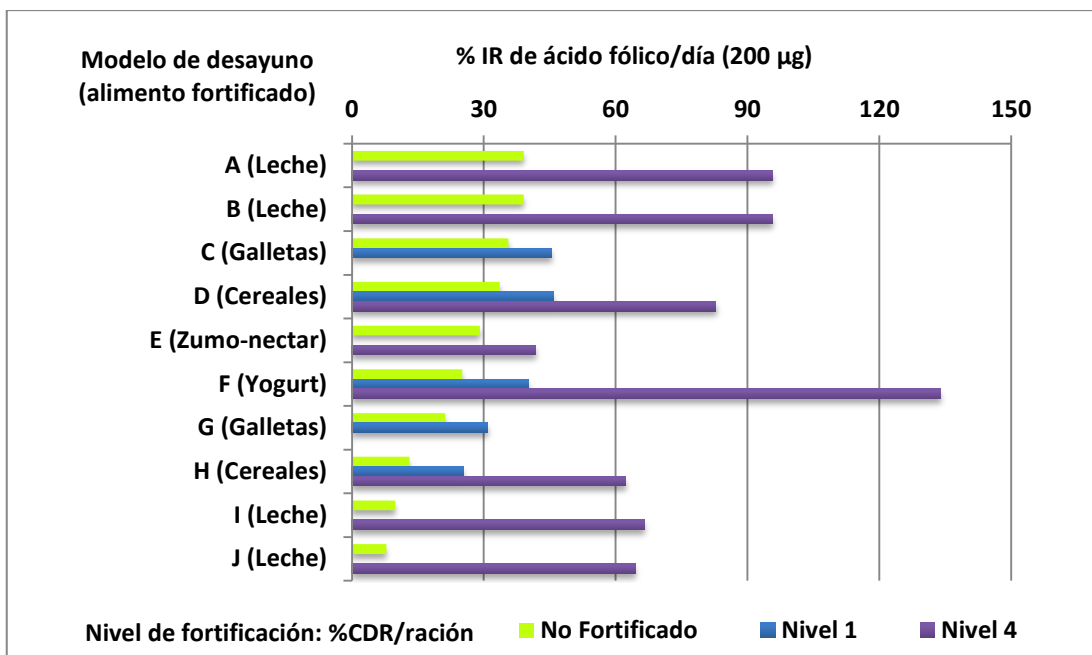


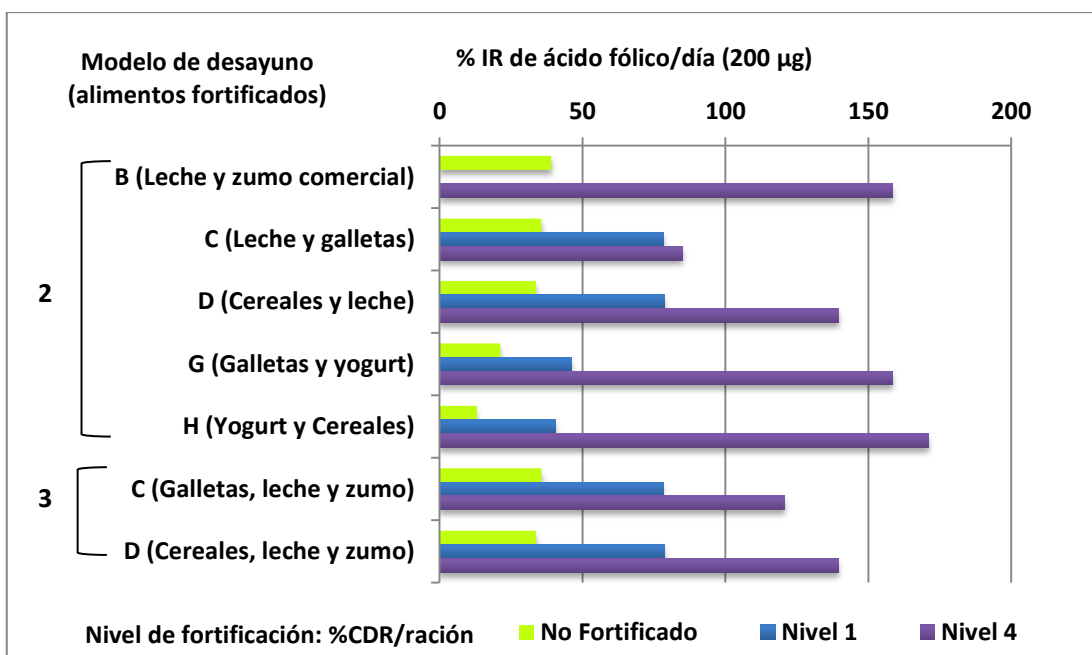
Figura 64. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

Al analizar los escenarios que incluyen alimentos fortificados se observa que los modelos A y B aportan más del 90% de las IR de ácido fólico mediante la inclusión de *leche* fortificada con el Nivel 4 (**Figura 65**). Los modelos C y D fortificados en el Nivel 1 cubren más del 40% de las IR con la inclusión de una ración de *galletas* o cereales fortificados con ácido fólico. El modelo F que incluye *yogurt* fortificado con el Nivel 4 contribuye en un 134% a las IR. El aporte de los modelos H, I y J es también destacable ya que alcanza más del 60% de las IR mientras que los modelos equivalentes sin fortificar van del 8 al 13% de las IR.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

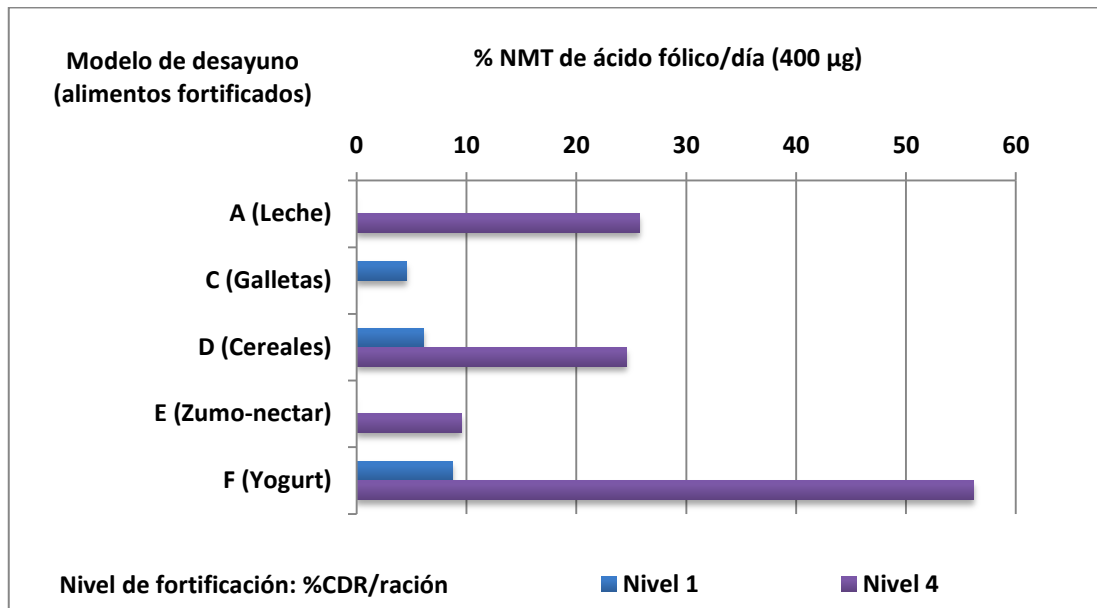
Figura 65. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

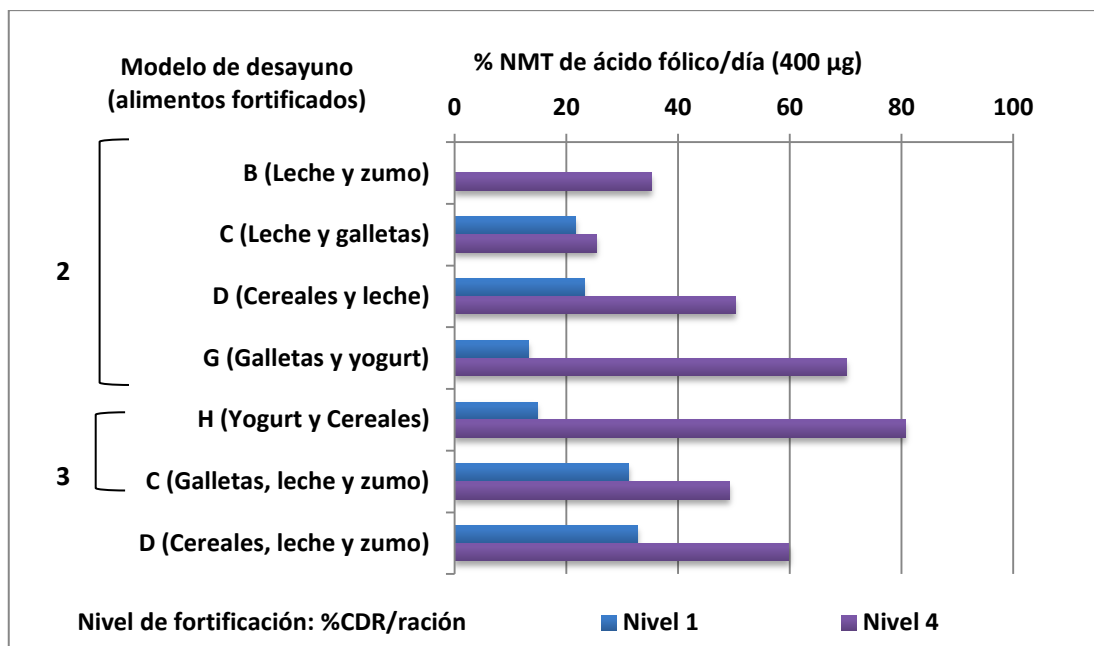
Figura 66. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

En el *Escenario 2* (**Figura 66**) la inclusión conjunta de dos alimentos fortificados en los modelos B, G y H superan los requerimientos diarios en más del 50% sin embargo si atendemos a los Niveles Máximos tolerables de ingesta representados para los mismos modelos en la **Figura 68** se observa que en ningún caso se superan dichos niveles. La inclusión de un alimento tampoco presenta valores de ingestas de ácido fólico cercanas al NMT (**Figura 67**).



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 67. *Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.*



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 68. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

d. Niños y niñas de 10 a 12 años

A partir de esta edad se considera apropiado utilizar las raciones establecidas para los adultos [91], si bien observamos que para los elevados requerimientos de energía diaria de este segmento de edad utilizando las raciones de adultos, los desayunos solo aportarían entre el 15 y el 25% de la energía total. El aporte de los modelos de desayuno sin fortificar para los niños de 10 a 12 años supera el 30% de las IR de ácido fólico en los casos A, B y C (Figura 69). Por el contrario, en los modelos H, I y J contribuye en menos del 10% de las IR para la vitamina.

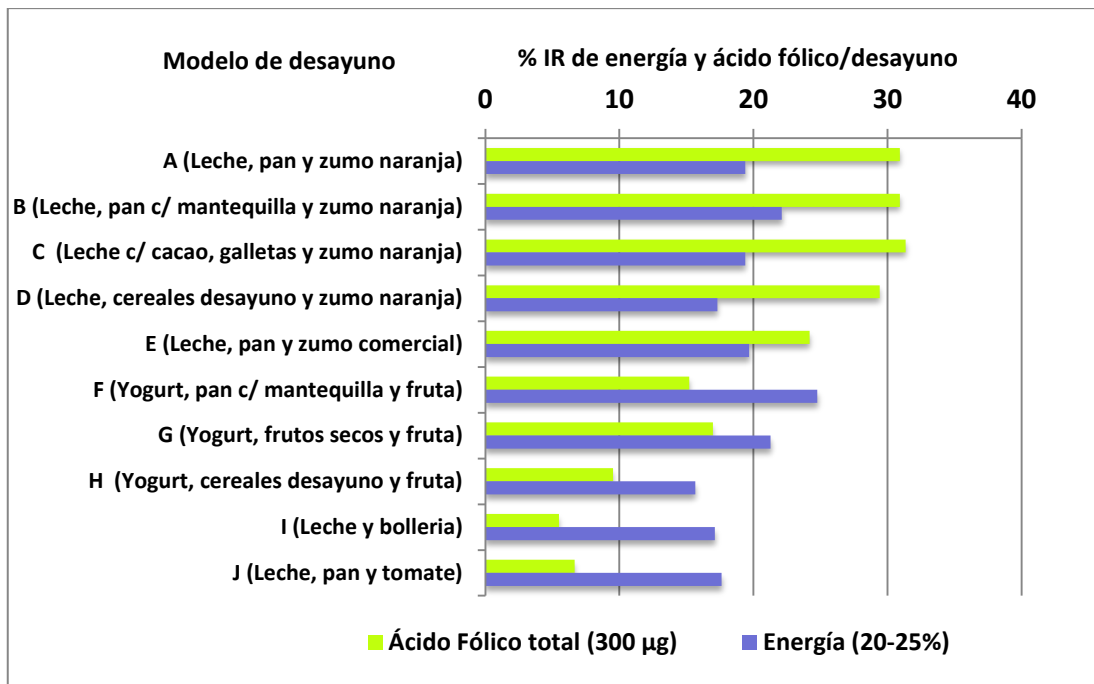
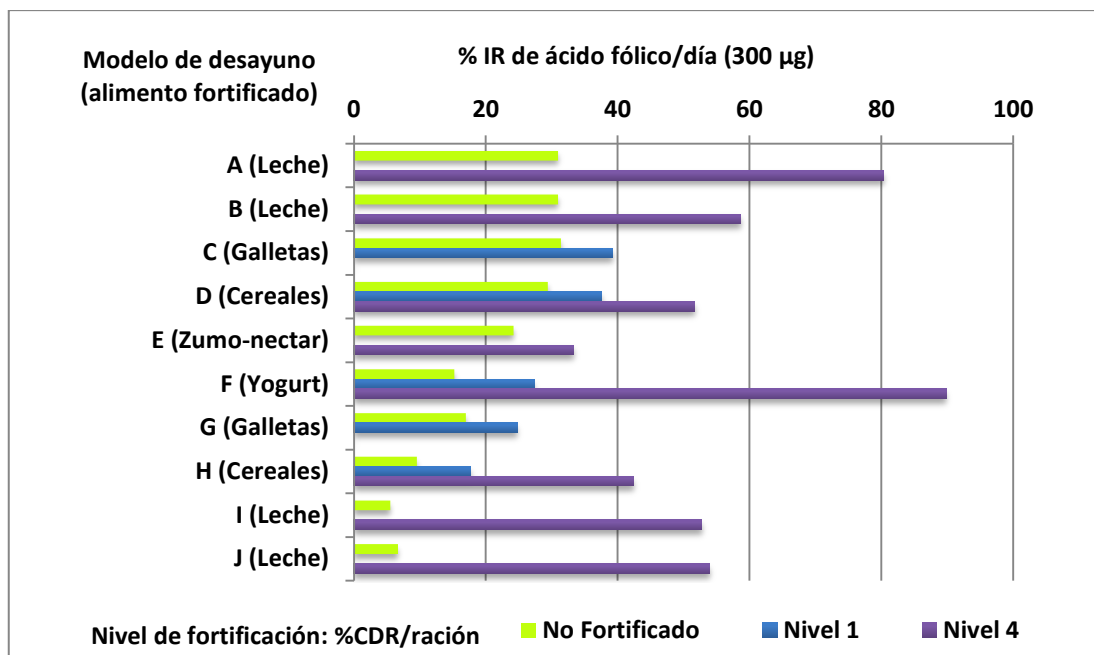


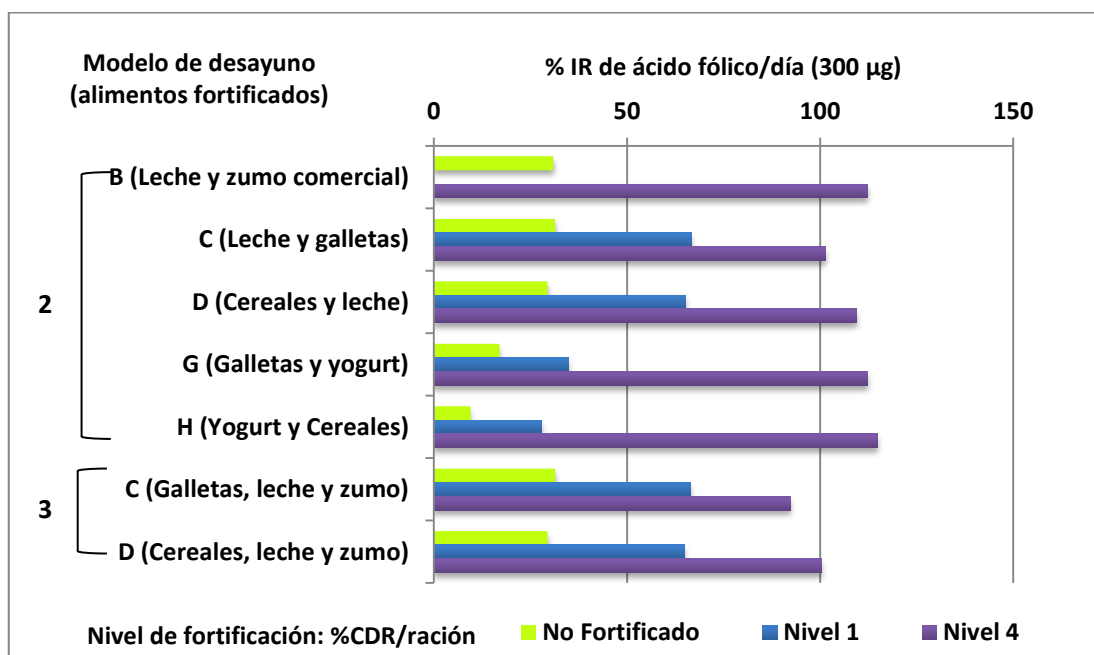
Figura 69. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

Al realizar la simulación de ingesta mediante el *Escenario 1* (Figura 70) obtenemos unos aportes del 17 al 27% de las IR de ácido fólico con los modelos H, G y F fortificados con el Nivel 1. Al aplicar el Nivel 4 de fortificación los modelos A y F superan el 80% del aporte de las IR, mediante la inclusión de *leche* y *yogurt* respectivamente. El modelo E que incluye zumo comercial fortificado aporta un 33% de los requerimientos de ácido fólico y el modelo H, con *cereales de desayuno* fortificados con el Nivel 4, un 42%.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 70. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

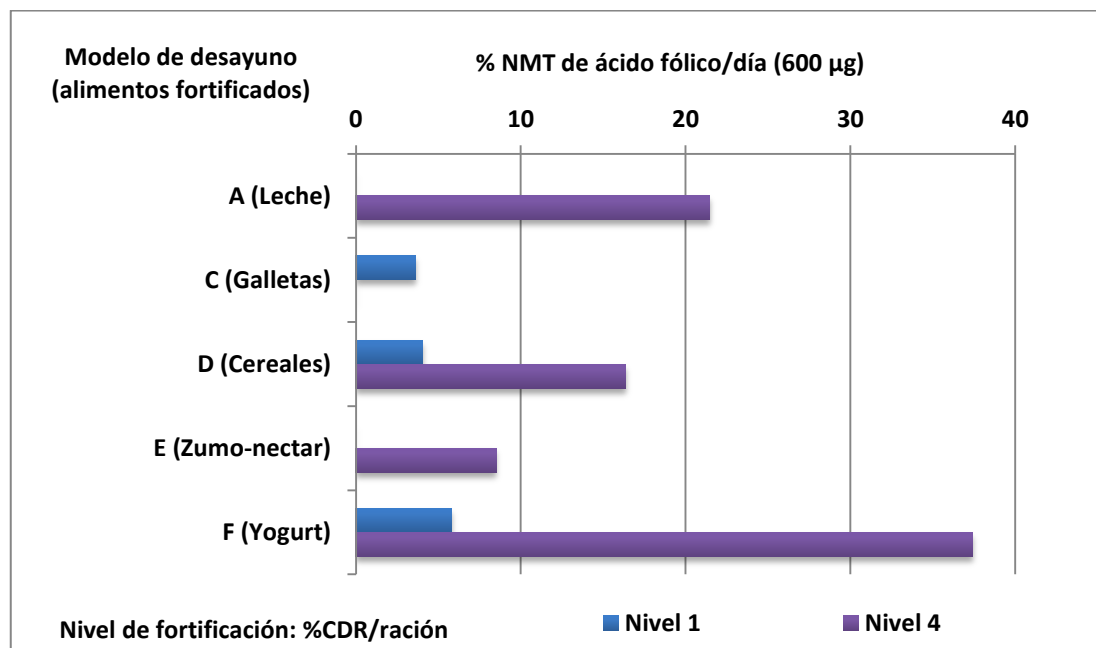


Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 71. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

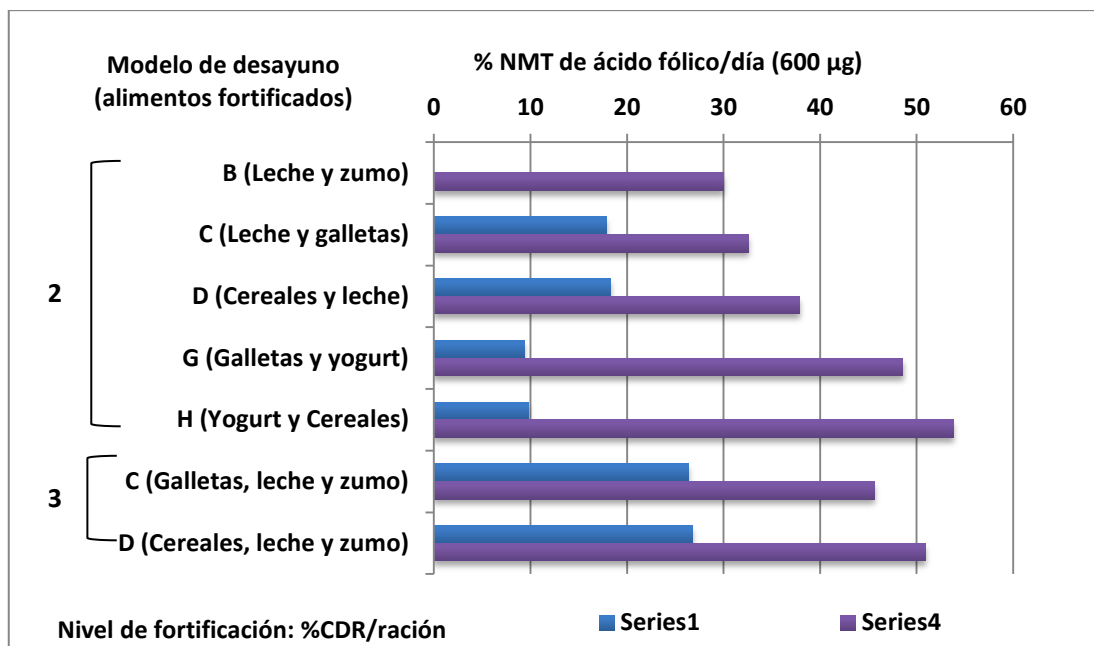
En el *Escenario 2* (**Figura 71**) todos los modelos fortificados con el Nivel 4 superan el 100% de las IR de ácido fólico, excepto el que incluye *galletas* (modelo C, 3 alimentos). Asimismo, los modelos C y D, ya sea mediante la inclusión de 2 o de 3 alimentos fortificados aporta más del 60% de las IR de la vitamina; esto supone para todos estos casos, el doble de lo que aportarían los mismos desayunos pero sin alimentos fortificados (29-31% IR).

Las **Figuras 72 y 73** representan los aportes de ambos niveles de fortificación para los distintos modelos de desayuno fortificados (*Escenarios 1 y 2*) y como en ningún caso se superan los Niveles Máximos Tolerables de ingesta de ácido fólico para este segmento de edad.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 μg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 72. *Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.*



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 μg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 73. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje del Nivel Máximo Tolerable de Ingesta (NMT) de ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

e. Chicas de 13 a 15 años

En este caso los requerimientos de energía diarios son menores y los de ácido fólico mayores con respecto al segmento anterior de edad. Además, las diferencias en cuanto a las IR de energía y el género, son más marcadas (250 kcal). El aporte de los modelos de desayuno sin fortificar (**Figura 74**) para la vitamina alcanzan el 25% de las IR como máximo (modelos A y B) y como mínimo un 5% (modelo J).

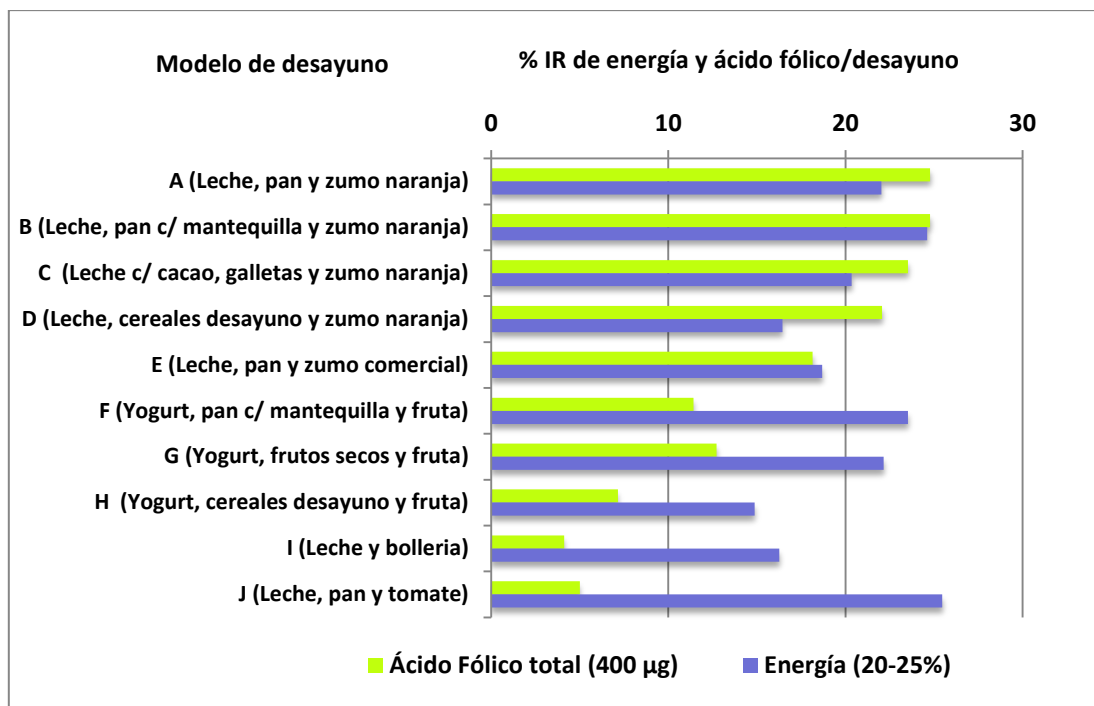
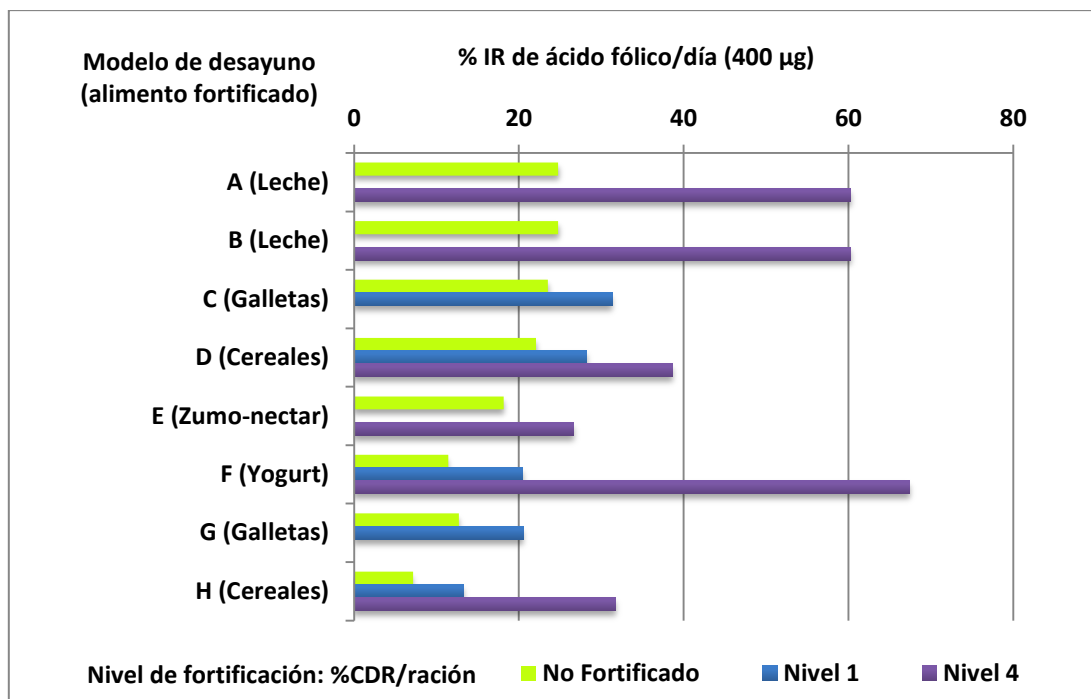


Figura 74. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

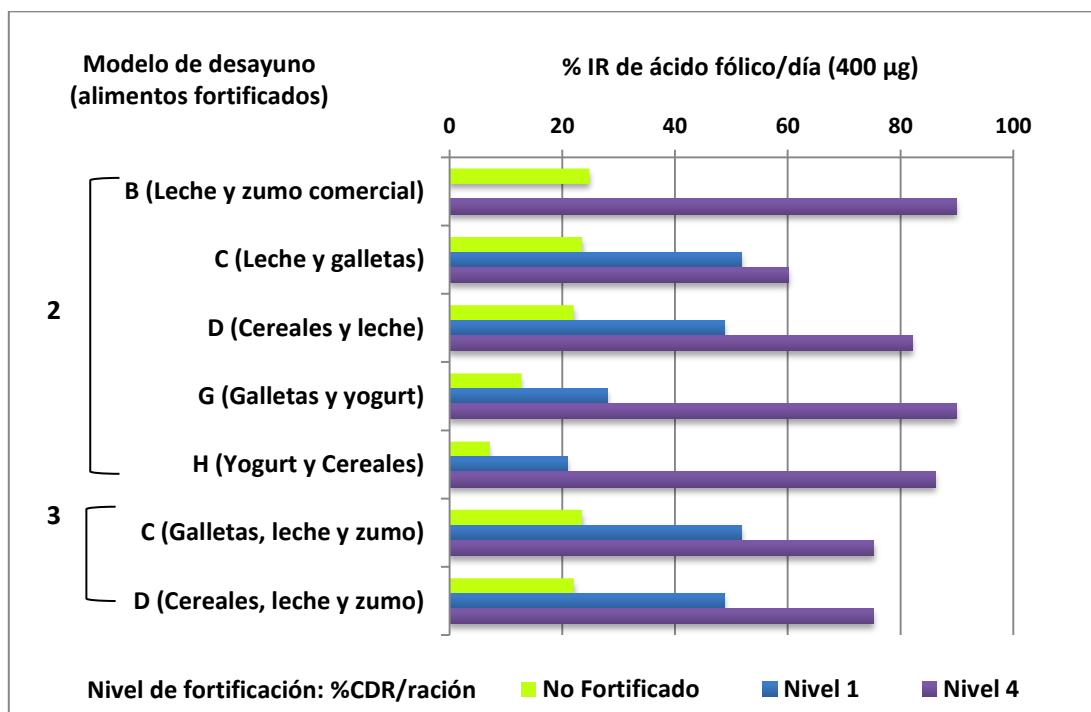
En la **Figura 75** se observa que como aporte máximo de ácido fólico mediante la inclusión de un alimento fortificado con Nivel 4 (*Escenario 1*, Modelo F, *yogurt*), se alcanza un 67% de las IR, lo cual constituye un incremento de 6 veces el aporte de folatos del Modelo F no fortificado.

En el *Escenario 2* (**Figura 76**) que presenta la inclusión conjunta de dos o tres alimentos, el aporte de los modelos B, G y H fortificados con el Nivel 4 es de entre 86 y 90% de las IR de ácido fólico frente al 7-25% de los mismos modelos sin fortificar. Si consideramos los modelos fortificados con el Nivel 1 el aporte es de entre el 22 y el 52% de las IR. En ningún caso la inclusión conjunta de dos o tres alimentos supera el Nivel Máximo Tolerable de ingesta de ácido fólico.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 75. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 76. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

f. Chicos de 13 a 15 años

Los modelos de desayuno no fortificados aportan para este segmento de edad entre un 4 y un 25% de las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico (**Figura 77**). Como en casos anteriores, la inclusión de una ración de zumo de naranja natural en los modelos A, B y C es determinante para alcanzar mayores concentraciones de folatos.

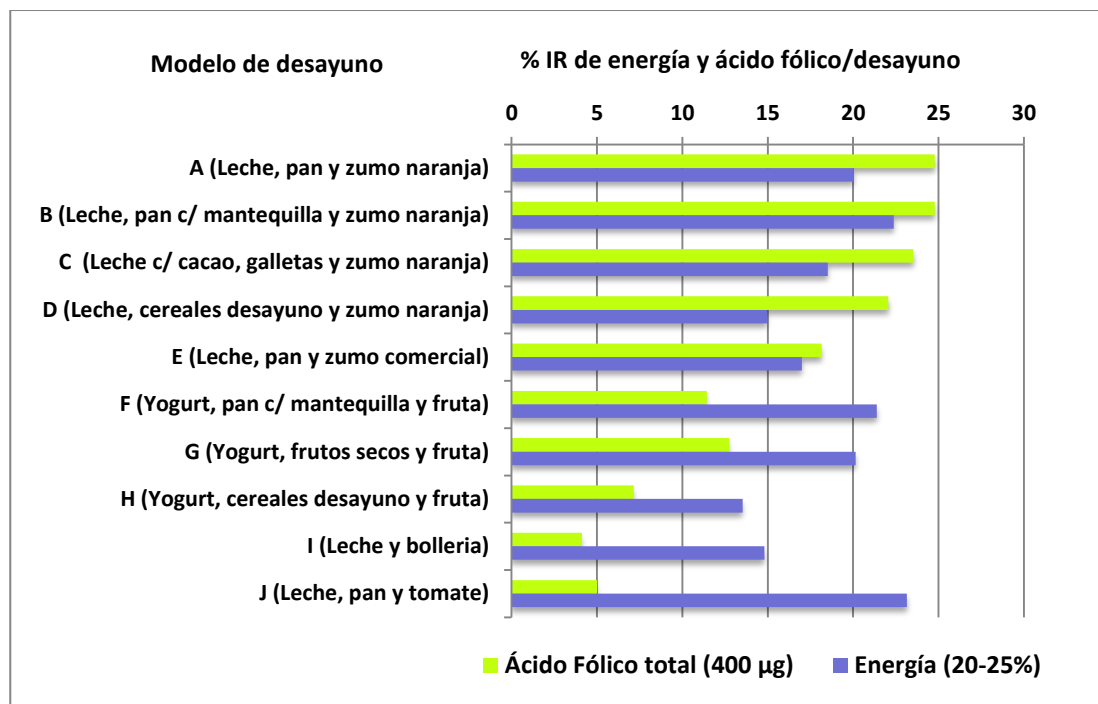
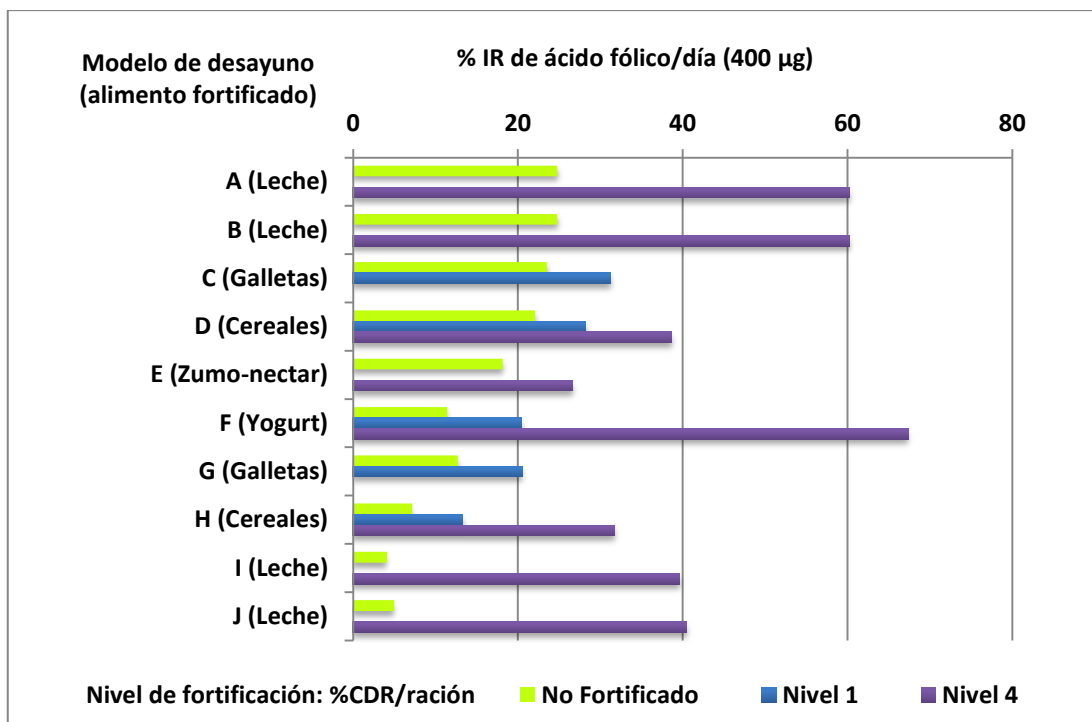


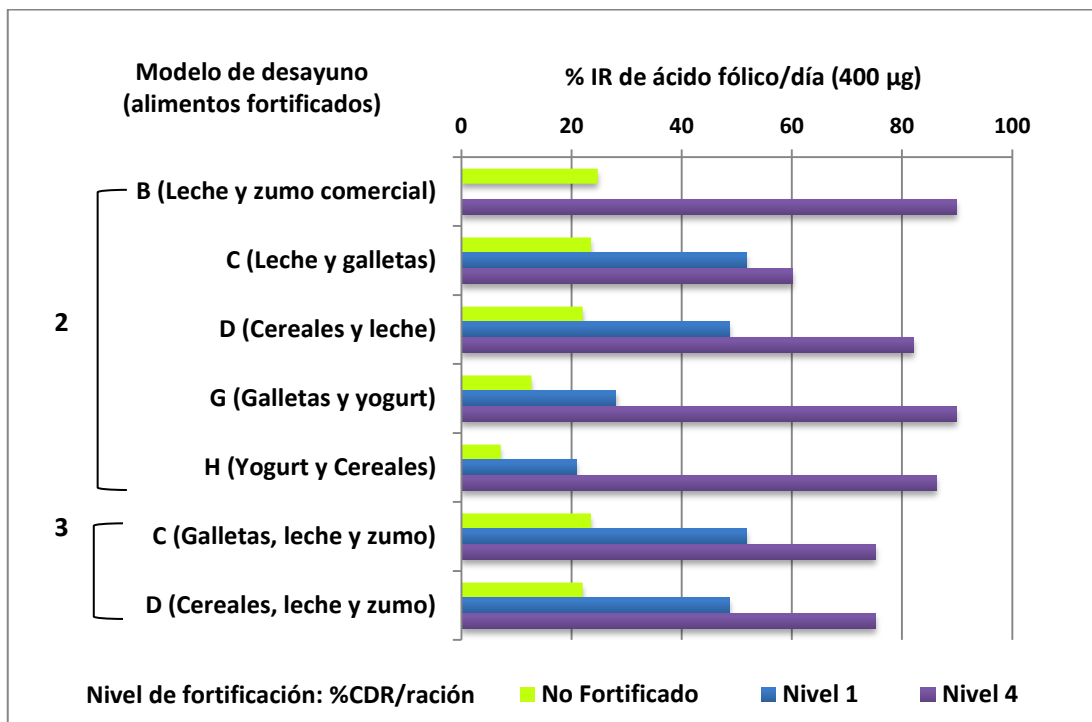
Figura 77. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

Con la inclusión de un alimento fortificado en el Nivel 4 (*Escenario 1*, **Figura 78**) se obtiene un aporte que va del 26% en el caso del Modelo E, al 67% en el caso del Modelo F. Esto da lugar a un incremento de hasta 6 veces el aporte con los mismos modelos no fortificados. Si consideramos el Nivel 1 de fortificación en los modelos F y G, su aporte a las IR de ácido fólico es del doble de los mismos modelos sin fortificar. Las diferencias más significativas las encontramos en los modelos de desayuno que menos folato natural aportan, I y J (4-5%) donde la inclusión de *leche* fortificada con el Nivel 4 supone un aporte del 40% de las IR, es decir diez veces. En el *Escenario 2* (**Figura 79**) la inclusión conjunta de dos o tres alimentos fortificados contribuyen a las IR de ácido fólico entre un 60 y un 90% (modelos D y F, respectivamente).



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 78. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 79. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

3.1.2. Mujeres en edad fértil (16 a 49 años)

El grupo diana por excelencia para los alimentos fortificados es el segmento de mujeres en edad fértil. En este caso la contribución a las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico mediante los modelos de desayuno no fortificados (**Figura 80**) es de entre el 5 y el 23%. El aporte energético de los diez modelos diseñados cubre el 16-25% de las necesidades diarias.

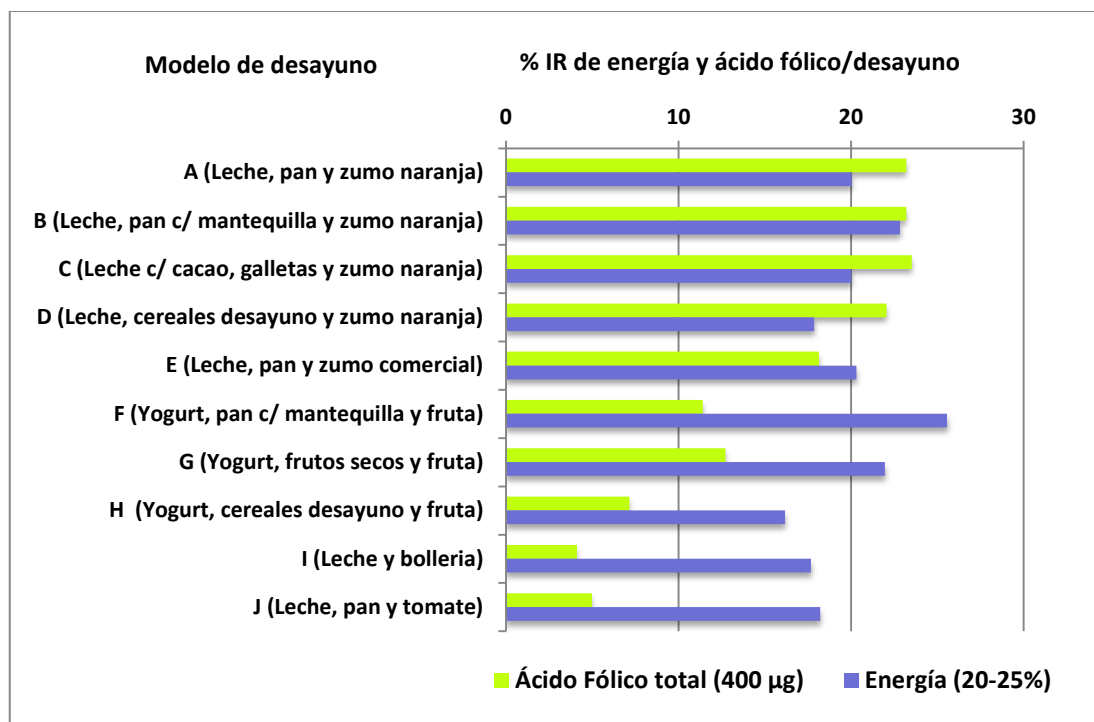
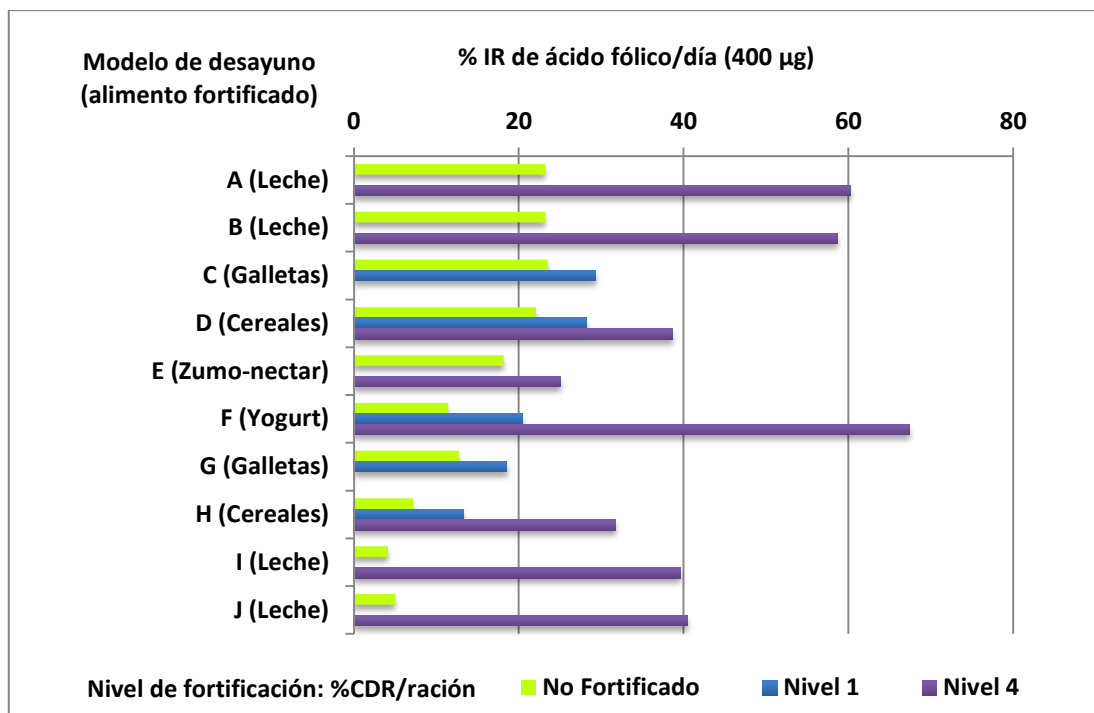


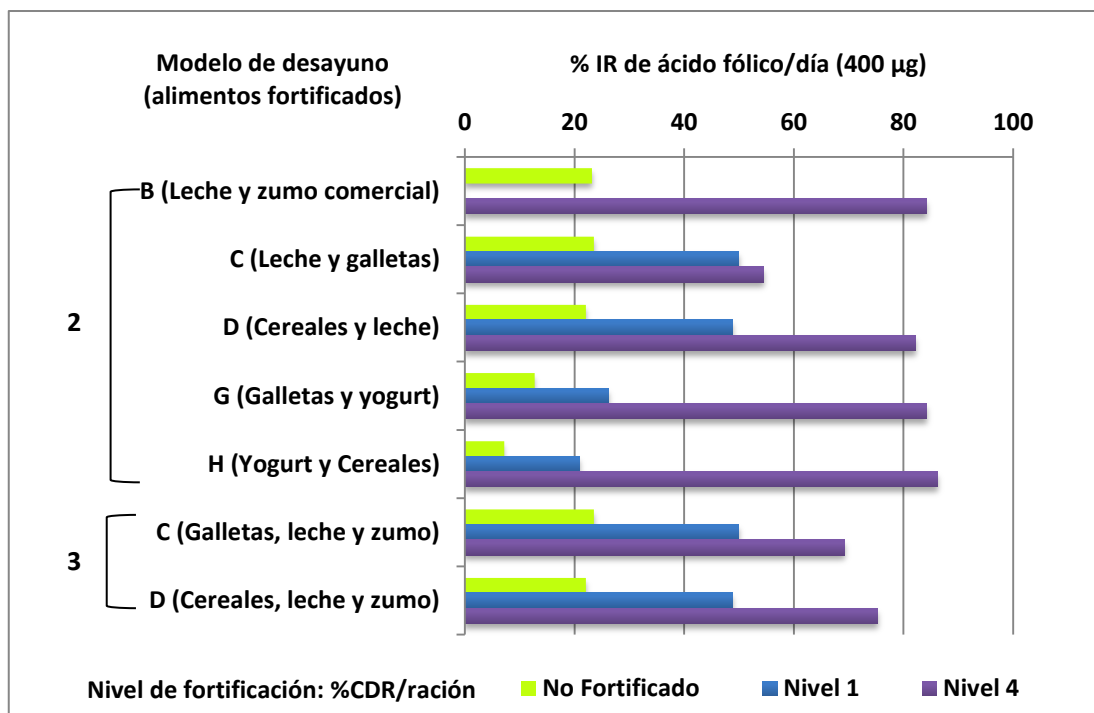
Figura 80. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

En la **Figura 81** se representa la simulación de inclusión de un alimento (*Escenario 1*), aquí se observa que los modelos A, B y F con un Nivel 4 de fortificación, contribuyen en mayor porcentaje a las IR de ácido fólico, ya que aportan más del doble del contenido en folatos de los mismos modelos de desayuno sin fortificar. En el *Escenario 2* (**Figura 82**), cuatro modelos superan el 80% de las IR de ácido fólico (B, D, G y H), triplicando así el aporte de los modelos no fortificados. Los modelos C y D que incluyen dos o tres alimentos fortificados con el Nivel 1 aportan una media del 50% de las IR de ácido fólico, es decir, duplican el aporte de los modelos no fortificados.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 81. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

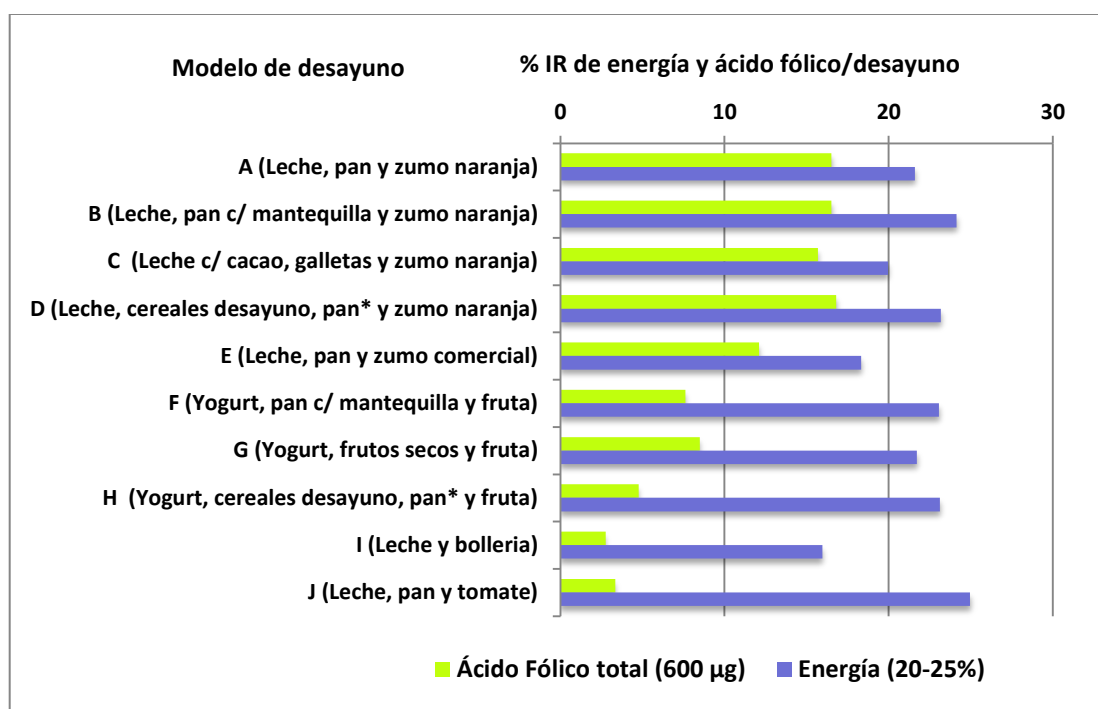


Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 82. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

3.1.3. Gestación

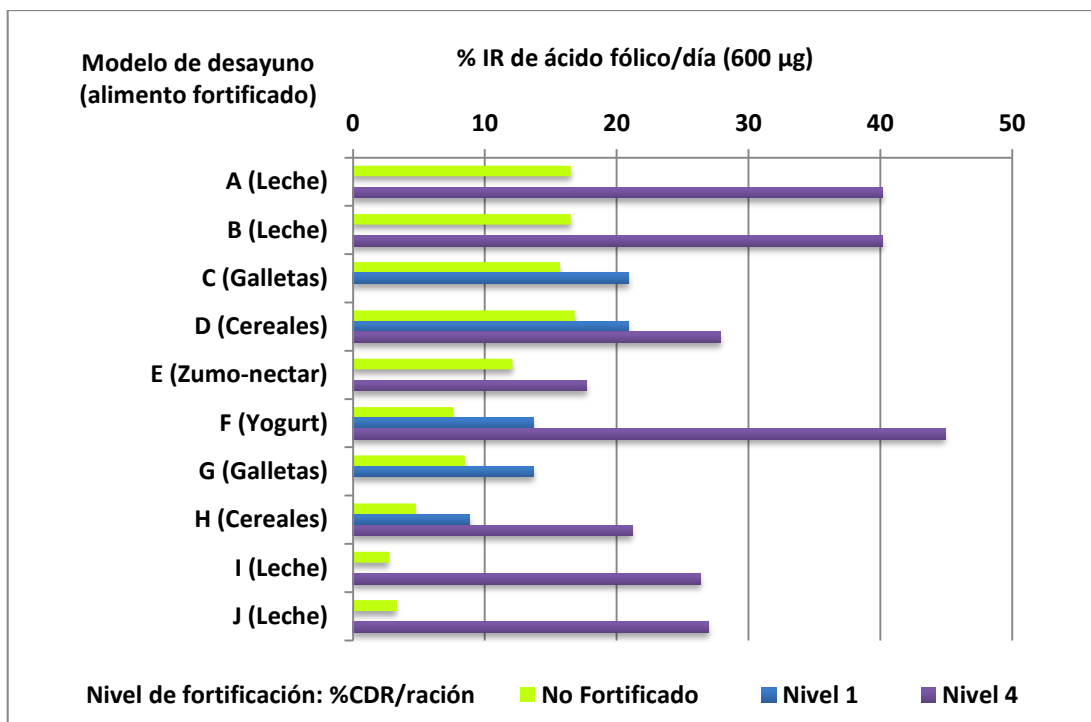
Los modelos de desayuno no fortificados estudiados (**Figura 83**) pueden aportar un porcentaje del 16-25% de los requerimientos energéticos diarios de una mujer embarazada. Sin embargo el aporte de folatos disminuye al aumentar las Ingestas Recomendadas, así, la contribución va del 3 al 16% frente al 5-23% que suponen estos modelos para las mujeres en edad fértil no gestantes.



* Se duplica la ración de pan por los mayores requerimientos energéticos de la mujer gestante.

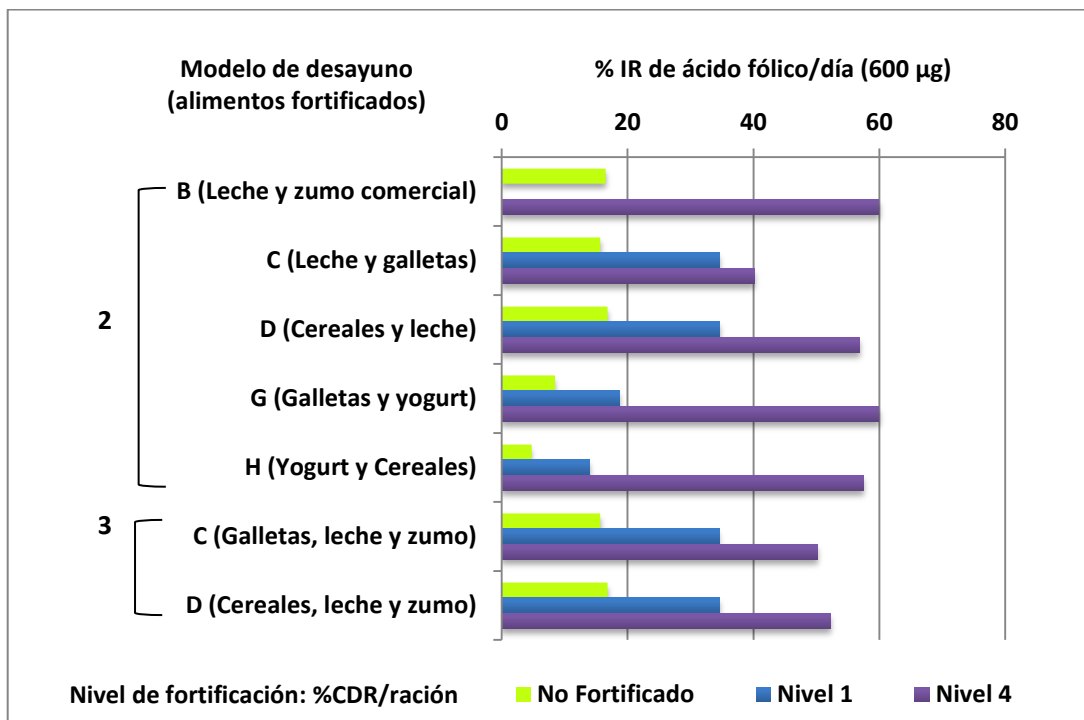
Figura 83. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

En la **Figura 84** podemos observar el aporte de ácido fólico a las IR de la mujer gestante cuando se incluye un alimento fortificado. Si este pertenece al Nivel 1 de fortificación aporta entre el 8 y el 21% de las IR (modelos H y C-D), mientras que con el Nivel 4 se alcanza entre el 17 y el 45% (modelos E y F). Al incluir dos alimentos fortificados (**Figura 85**) el aporte a las IR asciende al 40-60%, y mediante los modelos de tres alimentos a un 50-52%.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 84. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 85. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

3.1.4. Lactancia

Durante la este periodo es también esencial mantener el aporte de folatos. La problemática de este grupo es la tendencia a limitar la ingesta para recuperar el peso anterior al embarazo. Sin embargo los requerimientos de energía son mayores que en la gestación y los de ácido fólico disminuyen en 100 µg. Los modelos de desayuno planteados aportarían entre el 14 y el 25% de los requerimientos energéticos y entre un 3.3 y un 20% de las IR de ácido fólico de una madre lactante. El modelo I, compuesto de una ración de *leche* y bollería es el de menor aporte energético y de folatos (**Figura 86**).

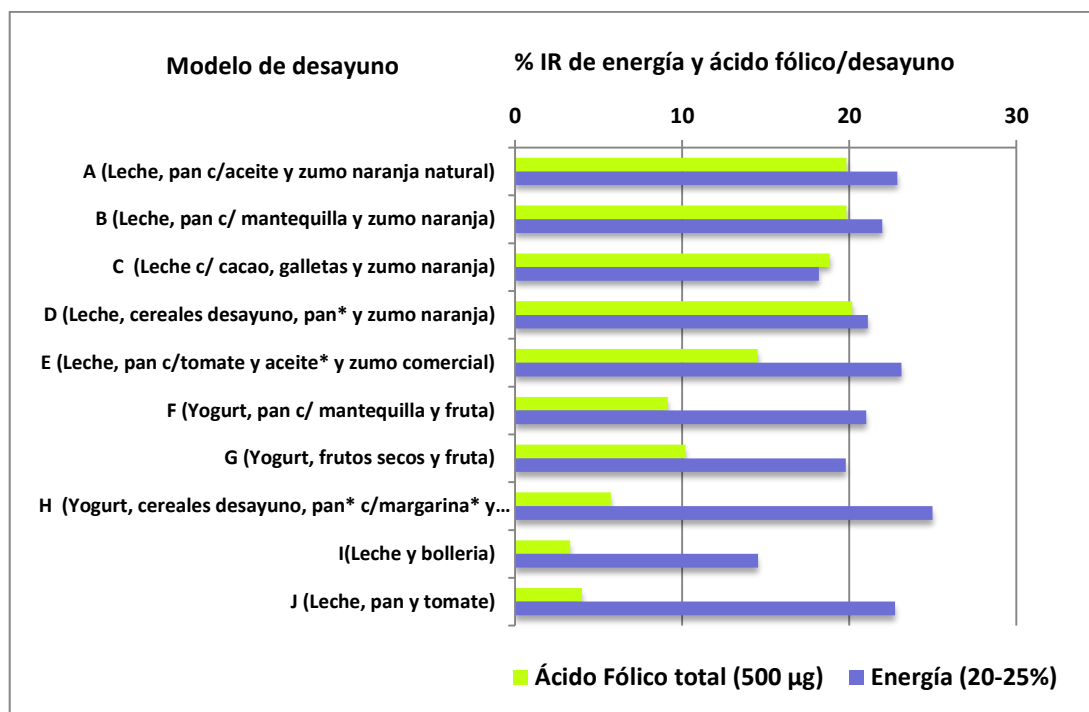
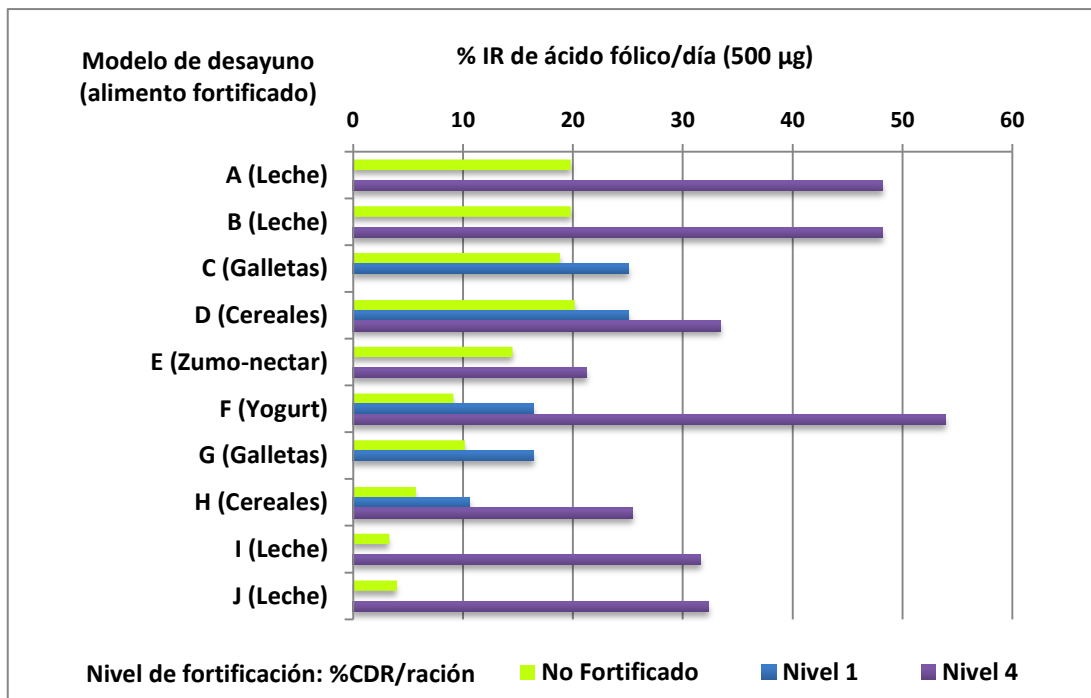


Figura 86. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

En la **Figura 87** se exponen las contribuciones de ácido fólico obtenidas en el *Escenario 1* de simulación de ingesta, donde los modelos C y D fortificados con el Nivel 1 alcanzarían entre un 25% de las IR, frente a al 20% de sus equivalentes no fortificados. Por el contrario, los modelos que incluyen *leche* fortificada con el Nivel 4, en el caso de los modelos A y B duplican, y en los modelos I y J suponen diez veces el aporte de los modelos equivalentes no fortificados, alcanzando hasta

un 48% y un 32% de las IR de ácido fólico, respectivamente. El modelo F es el que presenta un mayor aporte: 53% de los requerimientos de la vitamina.

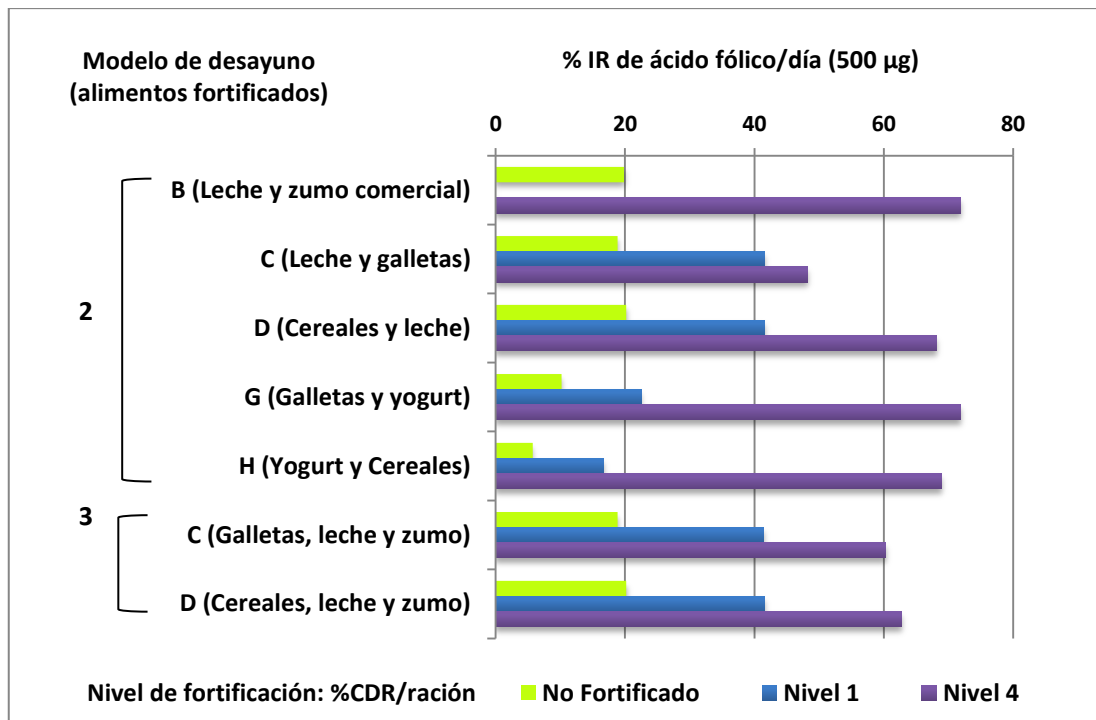


Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 87. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

En el *Escenario 2 (Figura 88)*, la simulación de inclusión de 2 o de 3 alimentos fortificados con el Nivel 1 contribuye en un 41% de las IR de ácido fólico en los modelos C y D, esto es debido al aporte de folatos naturales del zumo de naranja natural equivalente al nivel medio de los zumos analizados.

Los modelos B, G y H con dos alimentos fortificados con el Nivel 4 contribuyen a alcanzar el 70-72% de las recomendaciones de ácido fólico para una madre lactante, mientras que los correspondientes modelos no fortificados aportan entre el 5 y el 20%.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 88. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

3.1.5. Mujeres y hombres: adultos y personas mayores

a. Hombres entre 16 y 49 años

Si bien este segmento incluye un grupo heterogéneo en cuanto a edad y situación fisiológica, las recomendaciones de ácido fólico se mantienen constantes para los hombres entre los 16 y 49 años, siendo de 400 µg de ácido fólico. Cantidad igual a la recomendada para las mujeres en edad fértil (mismo segmento de edad). Por el contrario, sus requerimientos de energía son superiores a los de las mujeres. En la **Figura 89** se representa el aporte de los distintos modelos de desayuno a los requerimientos de ácido fólico, donde se observa que los modelos A, B, C y D contribuyen en torno al 25% a las Ingestas Recomendadas (IR). Los modelos que menor proporción de vitamina aportan son los I y J con menos del 5% de las IR.

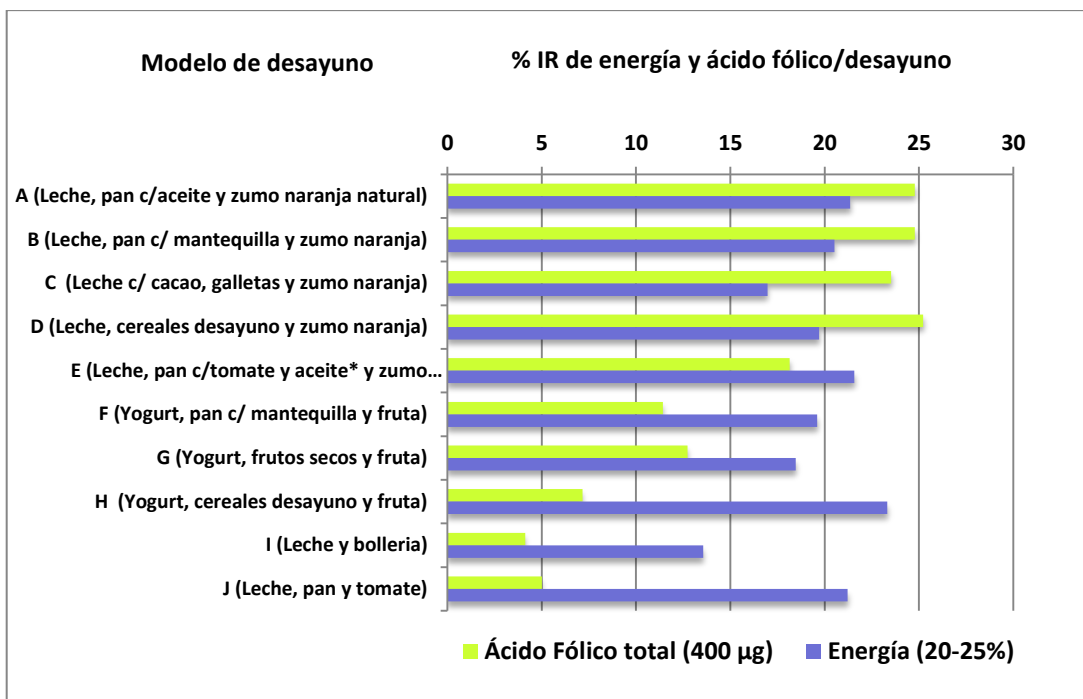
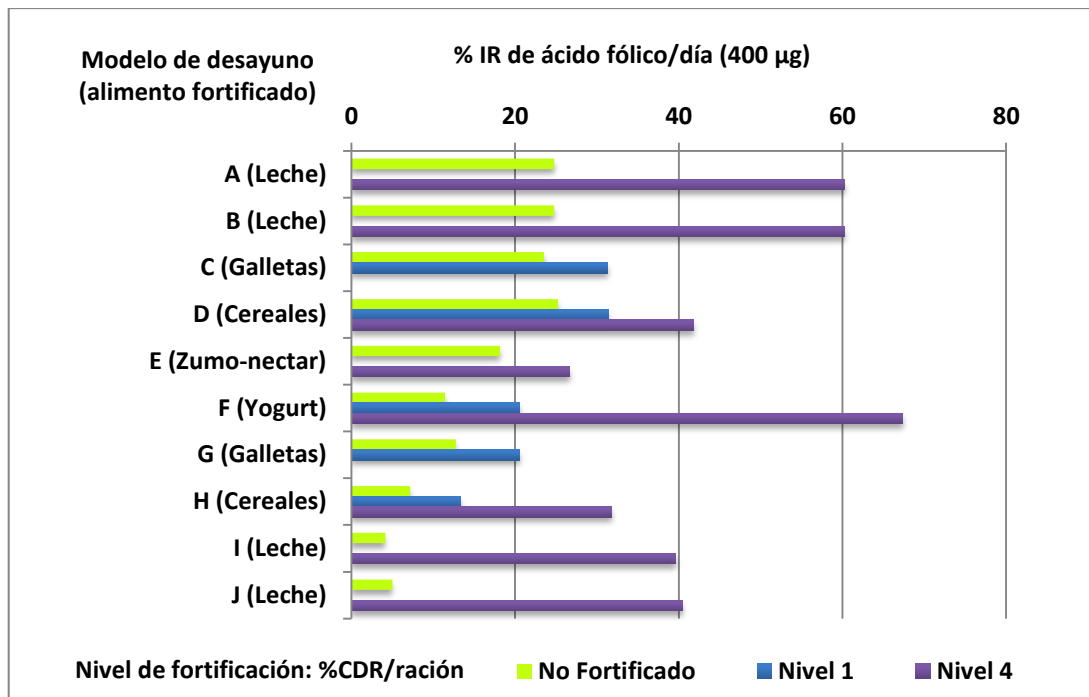


Figura 89. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

Mediante la inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico (*Escenario 1, Figura 90*) se podrían alcanzar hasta un 67-60,2% de las IR (modelos F, A y B, respectivamente) cuando dichos alimentos presentan el Nivel 4 de fortificación. En el caso de los modelos I y J, incluyendo una ración de *leche* fortificada aportarían hasta un 40% de las IR, frente al 5% de los mismos modelos sin fortificar.

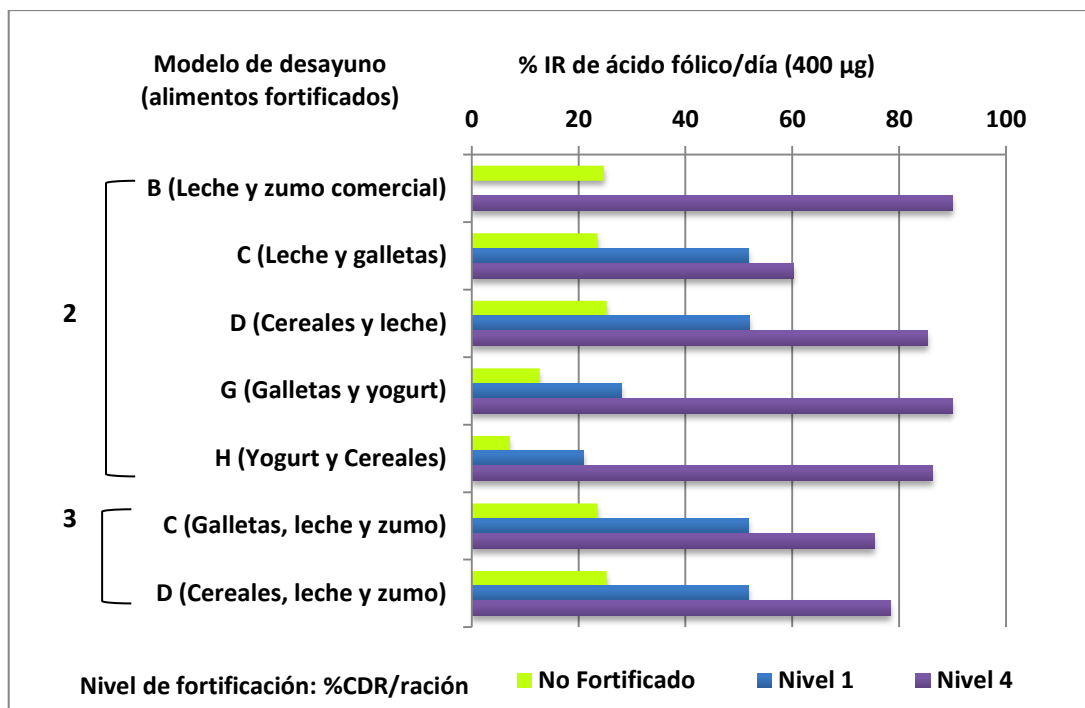


Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico ($200\ \mu\text{g}$) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 90. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

La inclusión de dos alimentos fortificados con ácido fólico en el Nivel 4 supondría entre el 60 y el 90% de las IR, tal como se observa en los modelos C y B-G, respectivamente (**Figura 91**). El modelo H fortificado con el Nivel 4 supone el mayor incremento frente al modelo sin fortificar, aportando 11 veces su contenido en ácido fólico (86.2 frente a 7.2%). En el Nivel 1 de fortificación se observaría una contribución a las IR del 20 al 52% en los modelos H y C-D, respectivamente.

En los modelos que incluyen tres alimentos fortificados con ácido fólico, C y D, el aporte a las IR es en ambos del 52% para el Nivel 1 de fortificación, y entre el 75 y el 78% para el Nivel 4, suponiendo en este último caso, 3 veces el aporte de ácido fólico de los mismos desayunos sin fortificar (**Figura 91**).



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 91. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

b. Hombres entre 50 y 59 y mayores de 60 años

Los requerimientos diarios (IR) de ácido fólico de este heterogéneo grupo de edad (400 µg) no varían frente a las de los de hombres del anterior segmento. Si bien, disminuyen los requerimientos energéticos (≈ 400 kcal). Los modelos de desayuno planteados sin inclusión de alimentos fortificados (**Figura 92**), supondrían un aporte de entre el 5 y el 25% de las IR en los modelos J y A respectivamente. Dichos modelos aumentarían su aporte hasta un 40 y un 60% de las IR si uno de los alimentos del desayuno es sustituido por su homónimo fortificado con ácido fólico en el Nivel 4 de fortificación (**Figura 93**).

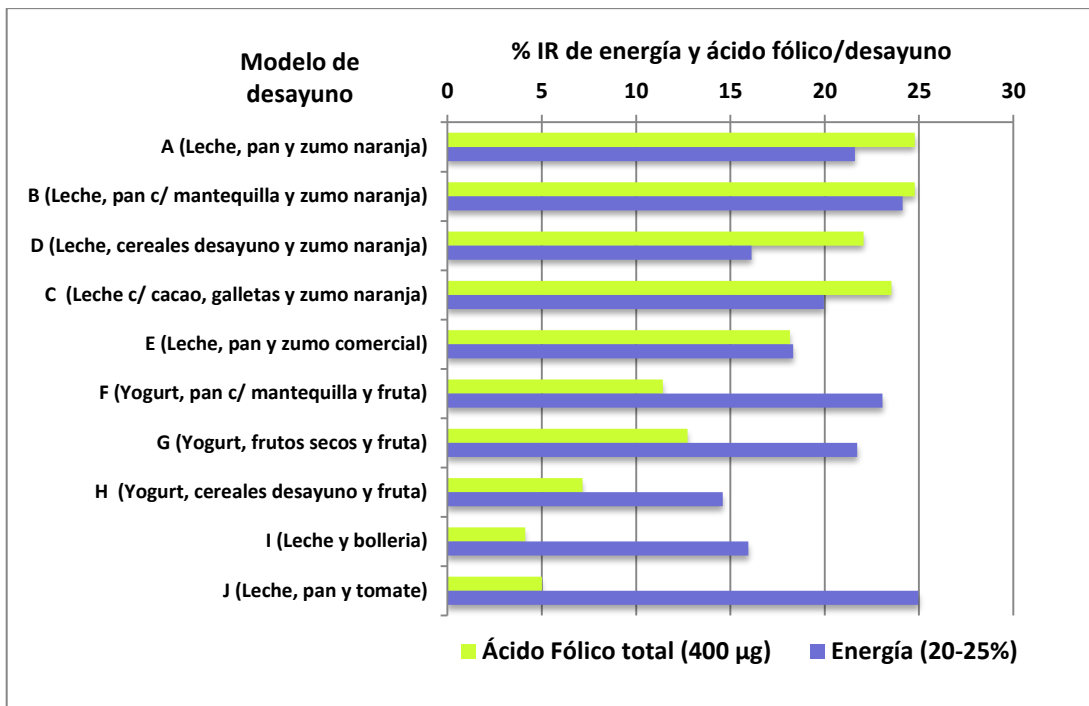
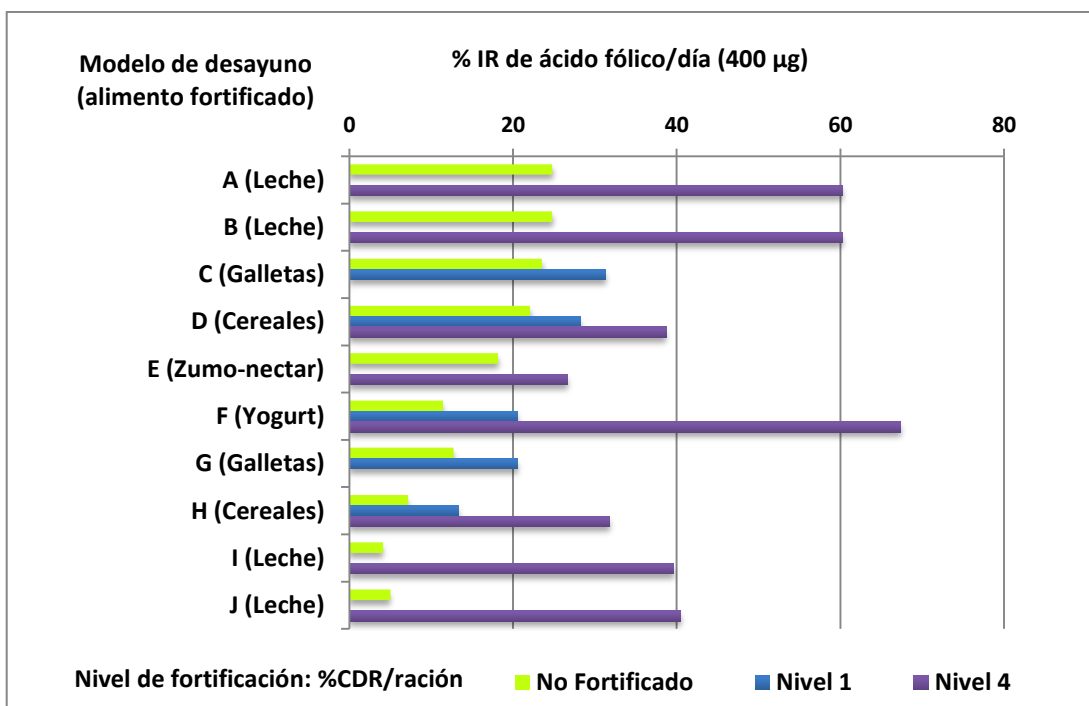


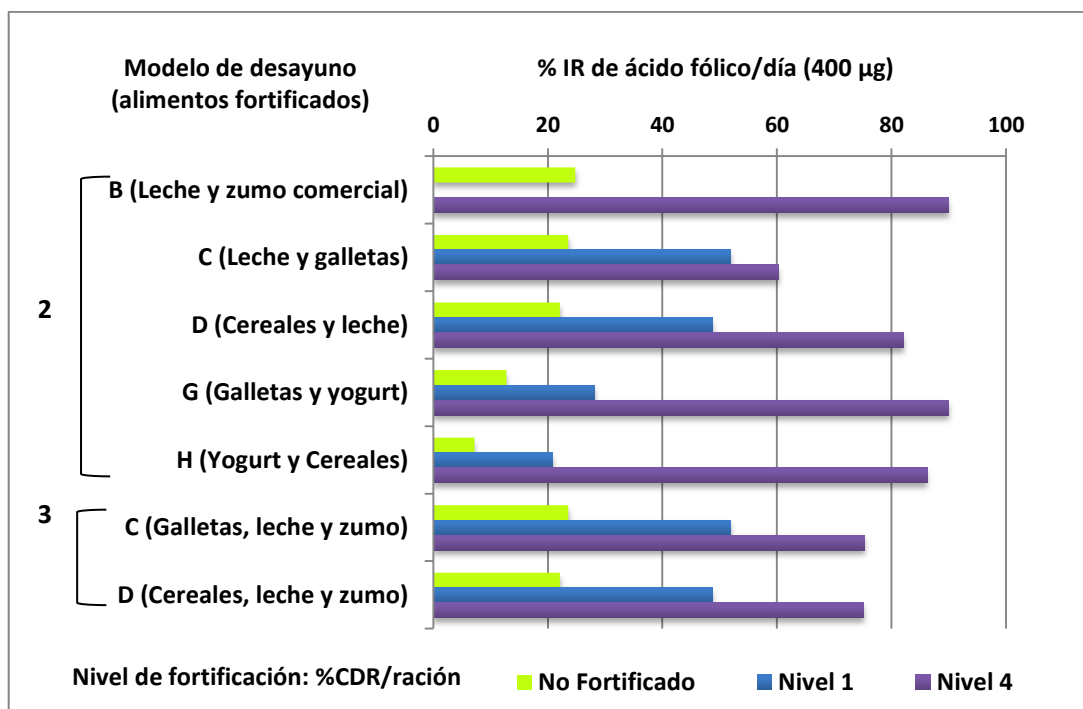
Figura 92. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 93. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

En el caso de sustituir dos alimentos del desayuno por alimentos fortificados con ácido fólico en el Nivel 4 (**Figura 94**), los aportes a las Ingestas Recomendadas se verían incrementados hasta un 60-90% (modelos C y B-G, respectivamente); aunque si consideramos el Nivel 1 de fortificación el aporte a las IR solo alcanzaría el 28-31% (modelos D y C, respectivamente).



Nivel 1: $\leq 16\%$ y Nivel 4: $\geq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 94. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

Si por el contrario, se incluyen tres alimentos fortificados, observamos que los aportes a las IR serían del 75% en el caso del Nivel 4 de fortificación (modelos C y D), mientras que con el Nivel 1 de fortificación se alcanzarían entre el 49-52% de las IR (**Figura 94**).

c. Mujeres entre 50-59 y mayores de 60

Tal como en el caso de los hombres, en el presente grupo los requerimientos diarios (IR) de ácido fólico no varían frente a los de las mujeres entre 16 y 49 años, a la vez que disminuyen los requerimientos energéticos. En la **Figura 95** se presentan los aportes a las Ingestas Recomendadas de ácido fólico (IR) que se alcanzarían con los modelos de desayunos sin alimentos fortificados propuestos. Estos varían entre el 4 y el 23.5% de las IR (modelos I y C, respectivamente).

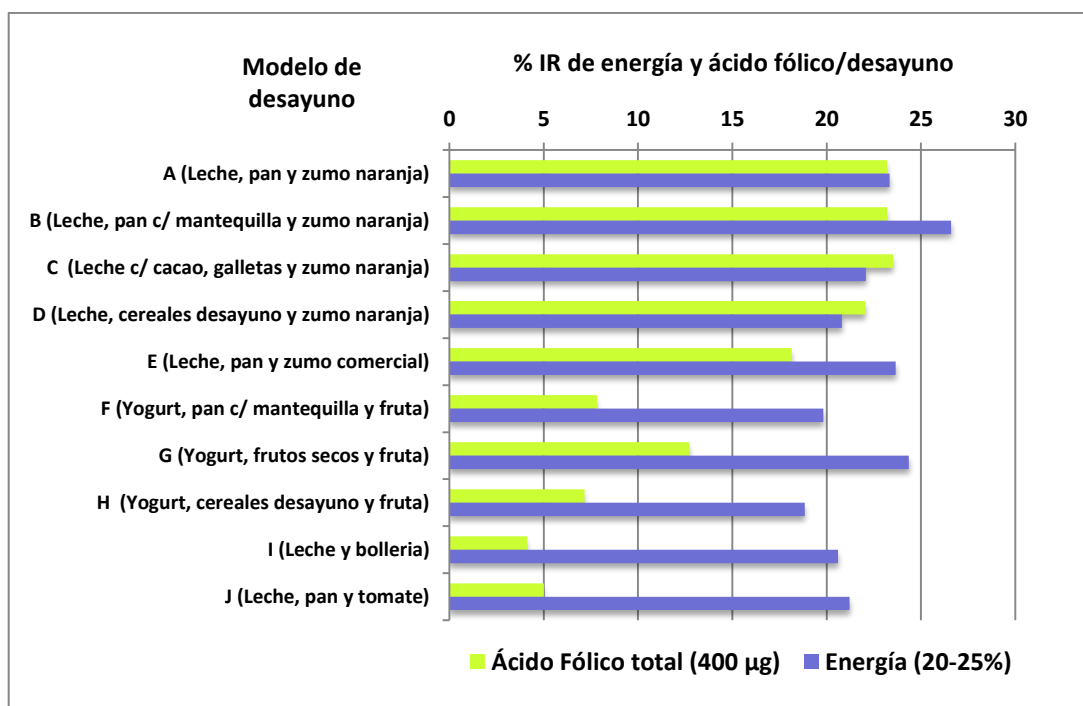
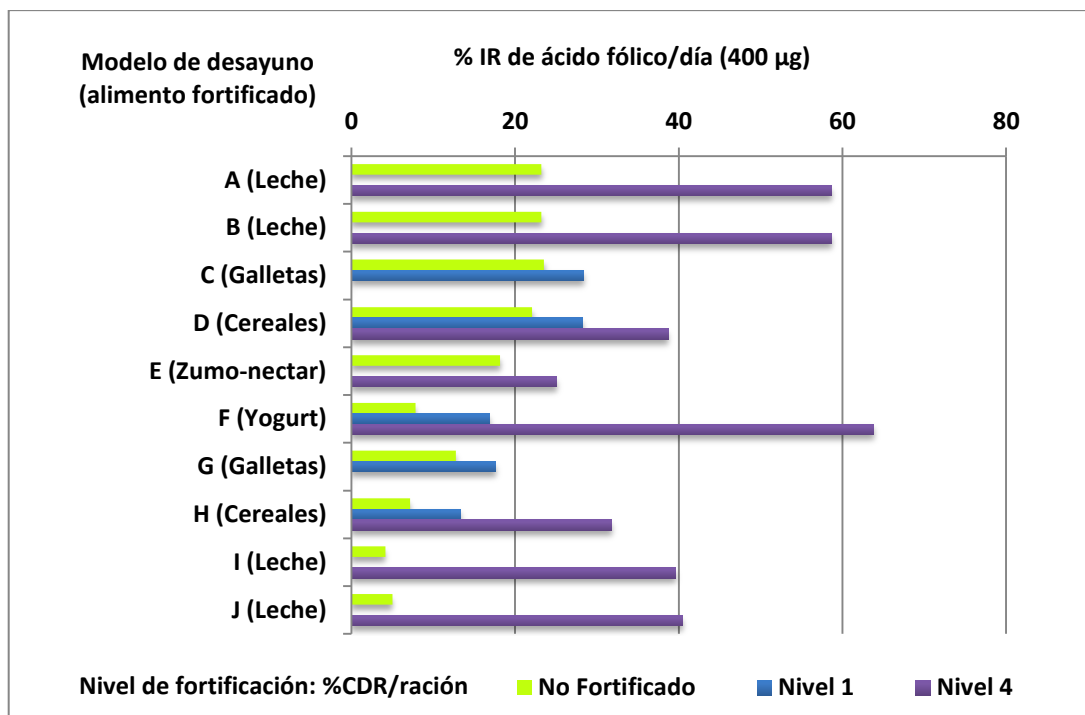


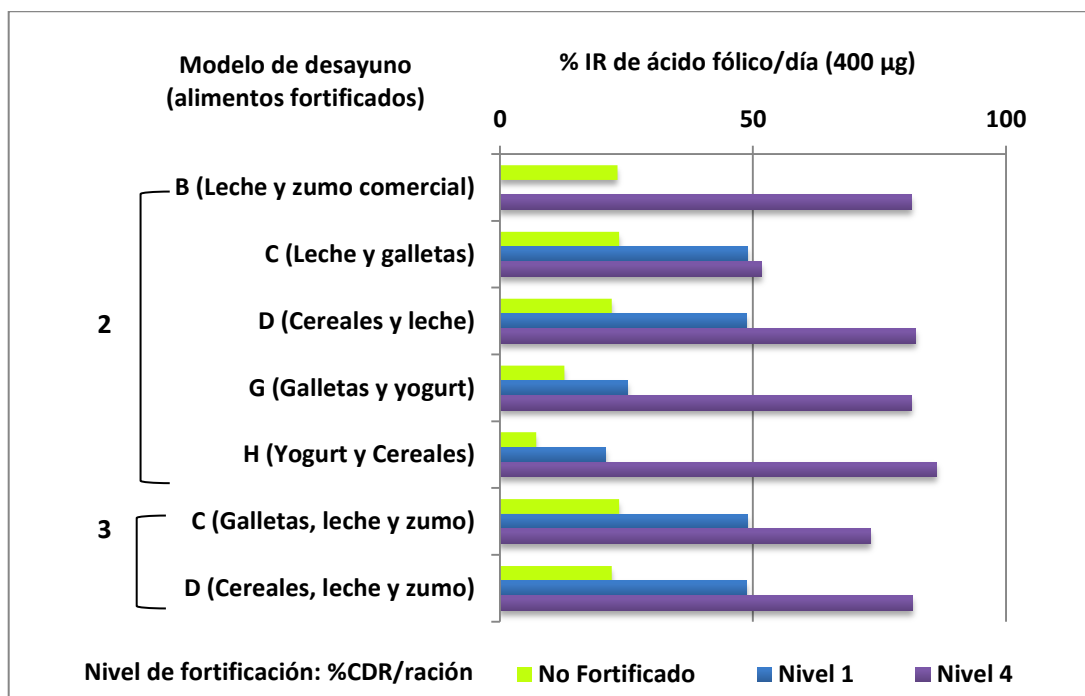
Figura 95. Modelos de desayuno no fortificados: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) de energía y ácido fólico que aportan en el desayuno.

Si atendemos al *Escenario 1* donde sustituimos uno de los alimentos de cada modelo, por un alimento fortificado con ácido fólico, observamos que, para el Nivel 4 de fortificación, los modelos F y E alcanzarían entre 64 y el 25% de las IR, respectivamente (**Figura 96**). En el caso del modelo F, esto representa un incremento de 8 veces lo que aporta el mismo desayuno sin el alimento fortificado, una ración de *yogurt*.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 96. Escenario 1: Inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.



Nivel 1: ≤ 16 % y Nivel 4: ≥ 35 % de la Cantidad Diaria Recomendada de ácido fólico (200 µg) [172] por ración declarada por el fabricante.

Figura 97. Escenario 2: Inclusión de dos o tres alimentos fortificados con ácido fólico: análisis del porcentaje de las Ingestas Recomendadas (IR) ácido fólico que aportan en el desayuno según el nivel de fortificación.

En el *Escenario 2* la inclusión de dos alimentos con el Nivel 1 de fortificación en los modelos G y H aporta 20-25% de las IR de ácido fólico (**Figura 97**) y si consideramos dos o tres alimentos en los modelos C y D observamos un aporte de aproximadamente el 50% de las IR de ácido fólico. En todos los casos anteriores, la sustitución implica duplicar la contribución de los desayunos sin fortificar. Para el Nivel 4 de fortificación, la inclusión de dos alimentos en los modelos B, D, G y H aporta entre el 81 y el 86% de las IR de ácido fólico, mientras que la inclusión de tres alimentos en los modelos C y D contribuye entre un 73 y un 82% a las recomendaciones.

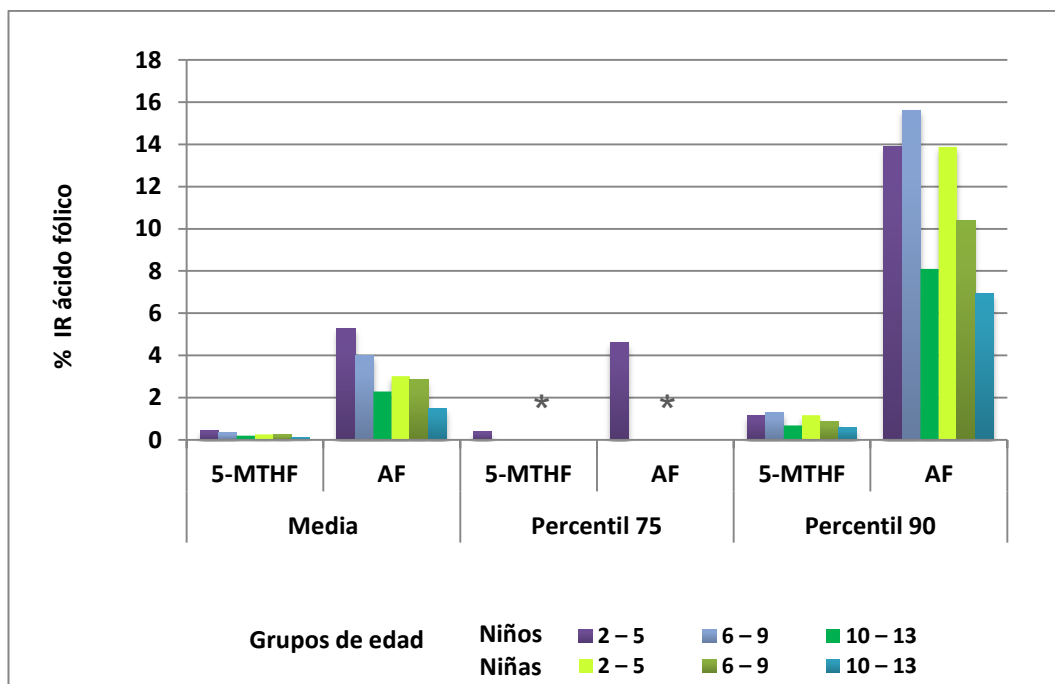
3.2. Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población infantil y adolescente española: Estudio enKid.

3.2.1. Cereales y derivados

1. Cereales de desayuno

Nivel de fortificación 1

Considerando el consumo medio de *cereales de desayuno* fortificados con ácido fólico en la población infantil, el Nivel de fortificación 1 ($69,4 \pm 14,6 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g de *cereales de desayuno*) aportaría un $\leq 5,3\%$ de las IR de ácido fólico, siendo este aporte mayor en el grupo los niños de 2 a 5 y de 6 a 9 años y menor en las niñas de 10 a 13 años, tal como se observa en la **Figura 98**. En el percentil 90 (P90) del consumo, son los niños de 6 a 9 y las niñas de 2 a 5 los que recibirían un mayor aporte de ácido fólico, 15,6 y 14% de sus IR, respectivamente; siendo menor la contribución a las IR de los niños y niñas de 10 a 13 años, con un 8 y un 7%, respectivamente.

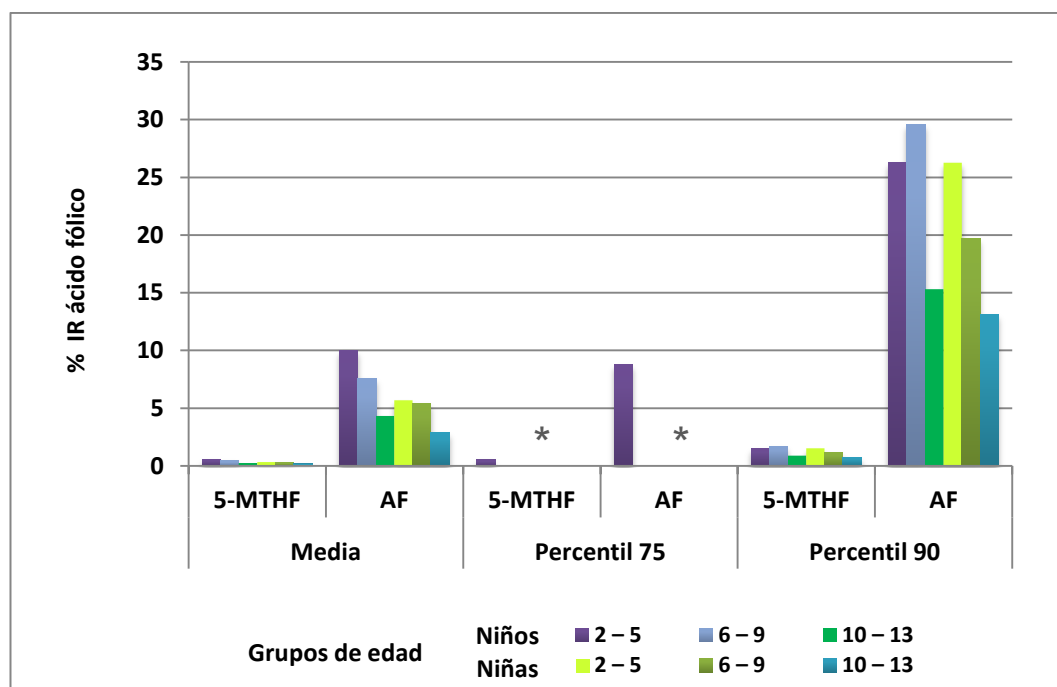


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 98. Cereales de desayuno, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Nivel de fortificación 2

En este caso, y debido a que el consumo es el mismo, y sólo cambia el nivel de fortificación de los *cereales de desayuno* (Nivel 2: $131,3 \pm 20,8$ μg de ácido fólico/100 g de *cereales de desayuno*), los mismos grupos de población alcanzan aportes de ácido fólico mayores/menores. Se observa un aporte medio del 10% de las IR de ácido fólico en el grupo de los niños de 2 a 5 años de edad, mientras que en el P90 los niños de 6 a 9 y los niños y niñas de 2 a 5 podrían ingerir entre el 25 y el 30% de sus IR de ácido fólico mediante el consumo de *cereales de desayuno* (Figura 99).



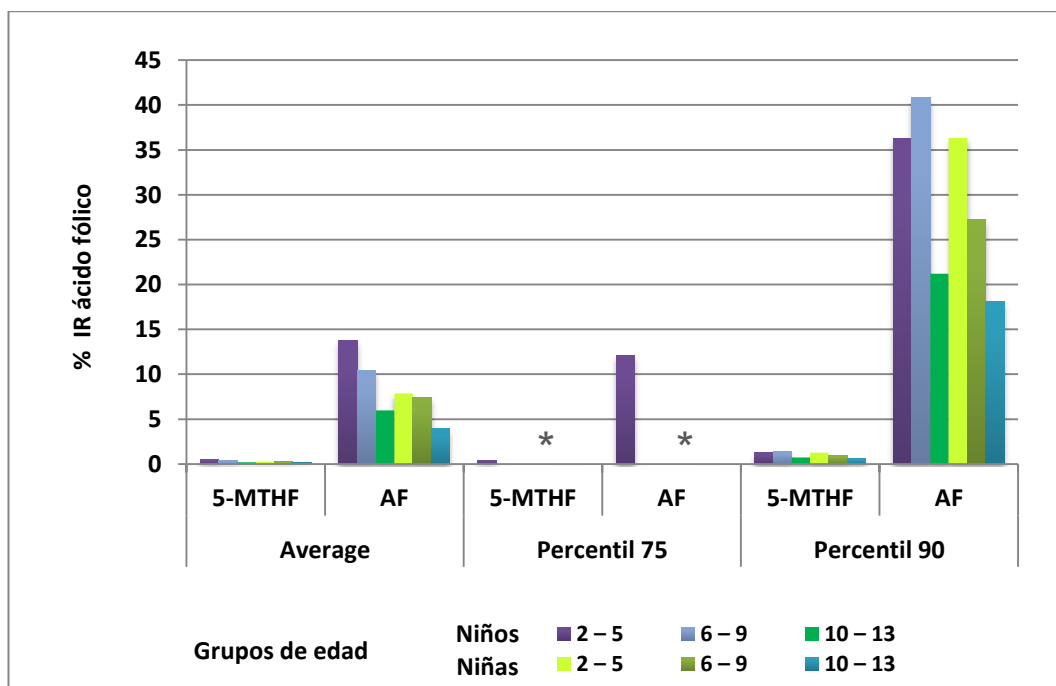
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 99. Cereales de desayuno, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Nivel de fortificación 3

En el Nivel 3 de fortificación (Figura 100), cuyo contenido es de $181,7 \pm 23,8$ μg de ácido fólico/100 g, los *cereales de desayuno* podrían aportar como media, de acuerdo a los datos de consumo, un máximo del 10 al 15 % de las IR de los niños de 6 a 9 y de 2 a 5 años, respectivamente. Si consideramos el nivel más alto

de consumo en el P90 el aporte puede alcanzar entre el 35 y el 40% de las IR de los niños de 6 a 9 y los niños y niñas de 2 a 5. Cabe mencionar que, a este nivel de fortificación, las niñas de 6 a 9 recibirían un aporte de más del 25% de sus IR de ácido fólico por ración de *cereales de desayuno* consumida.

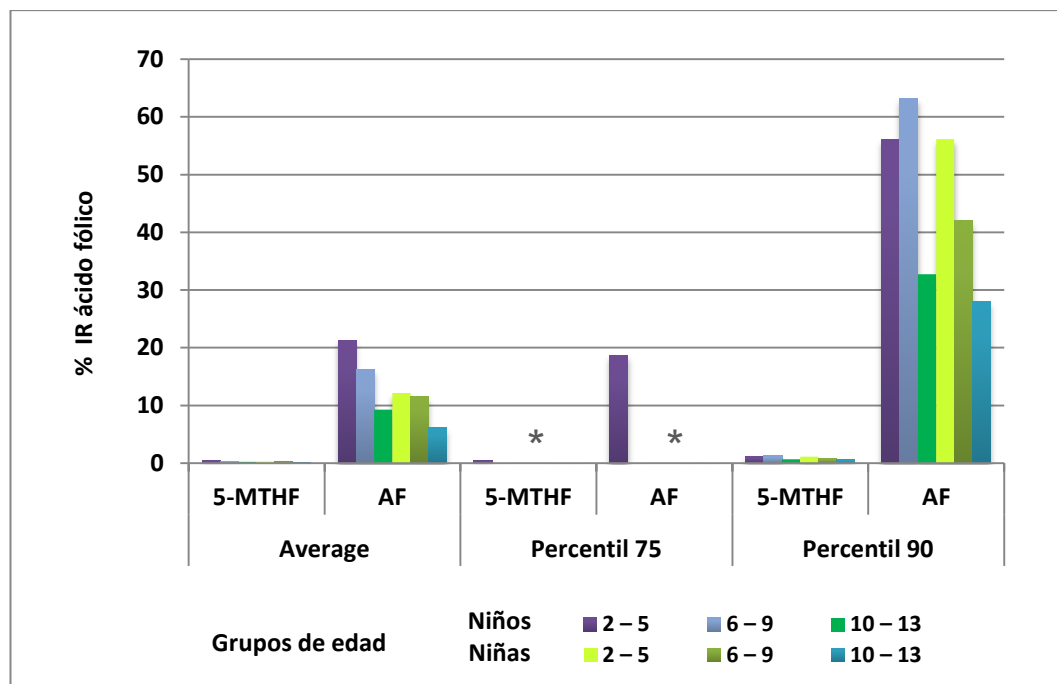


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 100. Cereales de desayuno, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Nivel de fortificación 4

En el nivel más alto de fortificación encontrado para los *cereales de desayuno* (Nivel 4: $280,6 \pm 62,2$ μg de ácido fólico/100 g) el aporte medio a las IR de ácido fólico podría alcanzar entre un 10 y un 20%, siendo el mayor aporte, para los niños de 2 a 5 años. En el P90 de consumo el aporte se situaría entre el 50 y 62 % de las IR de ácido fólico, siendo el menor (<30%) para las niñas de 10 a 13 años (**Figura 101**).



5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

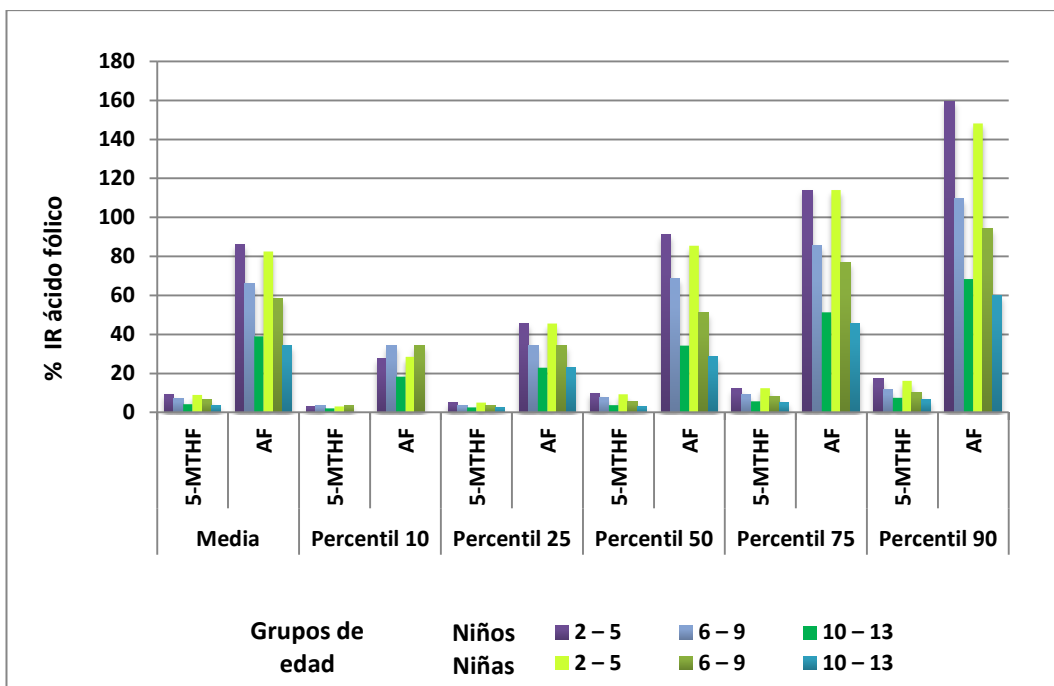
Figura 101. Cereales de desayuno, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

3.2.2. Lácteos y derivados

1. Leche

Nivel de fortificación 3

El contenido medio de ácido fólico encontrado en las distintas *leches* analizadas para el Nivel 3 de fortificación es de $34,2 \pm 0,4$ μg de ácido fólico/100 ml. En los niveles de consumo medios observados en la población infantil del estudio enKid dicho nivel de fortificación aportaría entre el 80 y el 90% de las IR de ácido fólico para los niños y niñas de 2 a 5 años, y entre el 20 y el 30% en los niños y niñas de 10 a 13 dado su menor consumo de *leche* (**Figura 102**). En el nivel más bajo de consumo representado por el percentil 10 (P10) el aporte de ácido fólico alcanza un 20% y un 30% de las IR para los niños y niñas de 2 a 5 y de 10 a 13, respectivamente. En el P90 encontramos que el consumo de *leche* podría aportar entre 140-160% de las IR para los niños y niñas de 2 a 5 años.

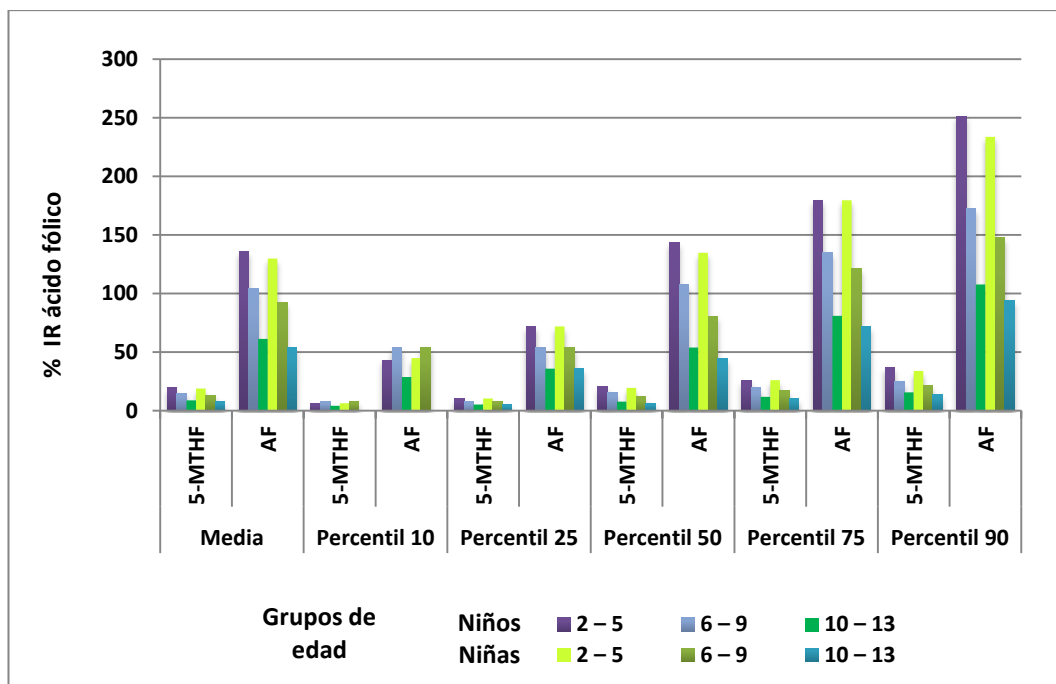


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 102. Leche, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Nivel de fortificación 4

En el nivel superior de fortificación de las *leches*, Nivel 4: $53,9 \pm 22,6 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g, observamos que incluso en el P10 de consumo el aporte de ácido fólico podría alcanzar el 50% de las IR de los niños y niñas de 6 a 9 años (**Figura 103**). En el nivel medio de consumo de *leche*, su ingesta superaría el 100% de las IR de ácido fólico en los niños y niñas de 2 a 5 años y en los niños de 6 a 9. En el mayor nivel de consumo las IR alcanzan entre el 200 y el 250% de las IR para los niños y niñas de menor edad y entre un 90 a un 100% en los mayores, un aporte elevado si consideramos que proviene de la ingesta de un único alimento.



5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 103. Leche, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Los resultados obtenidos indican que los niveles máximos tolerables de ingesta (NMT) podrían superarse, aproximadamente en un 16-25% en el P90 de consumo de los niños y niñas de menor edad (2 a 5 años) (**Figura 104**), lo cual es significativo si consideramos que procede de la ingesta de un alimento exclusivamente. Al considerar el nivel medio de consumo observamos que dicho grupo de edad se encuentra por debajo del NMT, por lo que solo los grandes consumidores podrían realizar ingestas excesivas de ácido fólico mediante el consumo de *leche* fortificada.

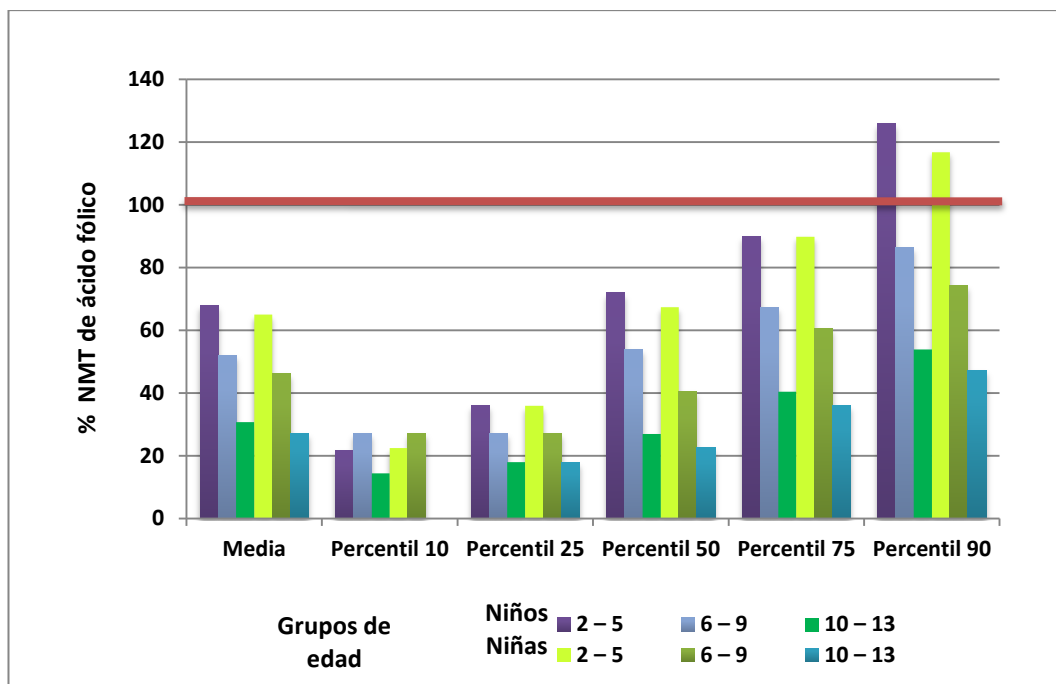
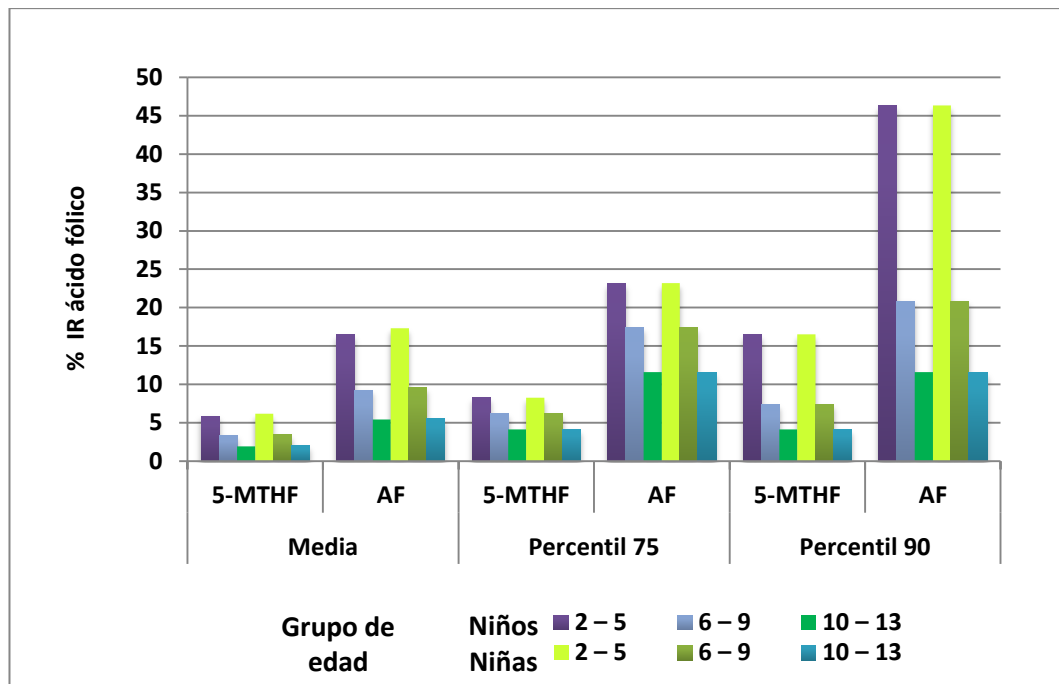


Figura 104. Leche, Nivel 4 de fortificación: Niveles Máximos Tolerables de Ingesta de ácido fólico alcanzados en población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

2. Yogurt

Nivel de Fortificación 1

El consumo medio de yogures nos indica que a un nivel de fortificación de $27,8 \pm 0,1 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g (Nivel 1), que el grupo de edad de 2 a 5 años podría recibir un mayor aporte de la vitamina, alcanzando un porcentaje superior al 15% en ambos sexos (**Figura 105**). El grupo de edad de 10 a 13 años alcanzaría un aporte del 5%. En el P90 de consumo el grupo de edad de 2 a 5 años alcanzaría hasta un 45% de sus IR de ácido fólico, mientras que los niños y niñas de mayor edad solo cubrirían el 10-12% según sus niveles de consumo de yogurt.



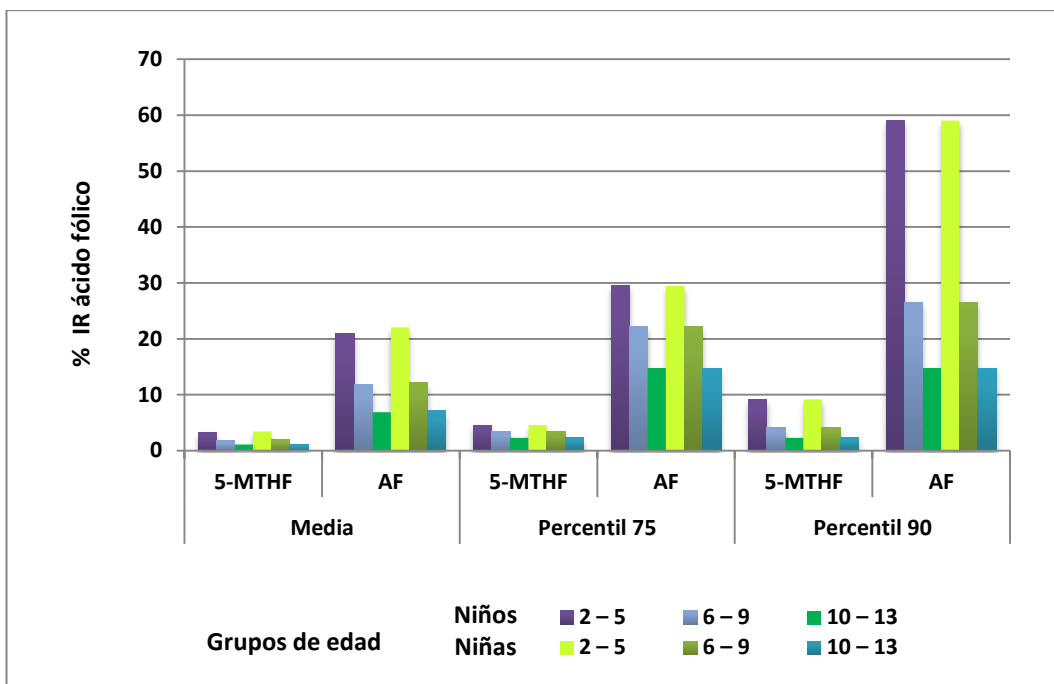
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 105. Yogurt, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Nivel de Fortificación 2

Los niveles de fortificación 2 y 3 son muy similares debido a las raciones de consumo que establecen los fabricantes (nota: y que hace que los productos se clasifiquen en un nivel u otro: %CDR/ración declarada), así el Nivel 2 presenta $35,4 \pm 10,7 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g y el Nivel 3, $38,1 \pm 6,8 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g. Por tanto, los resultados para ambos niveles de fortificación de acuerdo a los datos de consumo de yogures de la población infantil del estudio enKid, alcanzarían aportes de IR aproximados (**Figuras 106 y 107**).

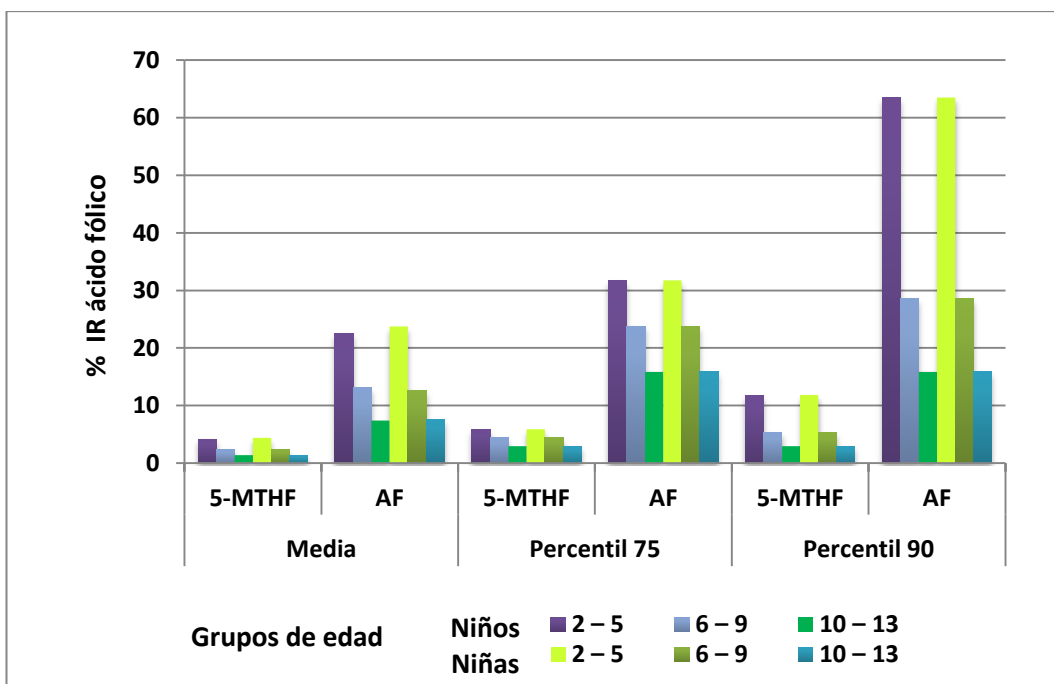
En el nivel medio de consumo, el grupo de edad de 2 a 5 años alcanzaría el 20-22% de sus IR de ácido fólico, aunque el grupo de 10 a 13 años no llegaría al 10% de sus IR. En el P90 de consumo, niños y niñas de 2 a 5 años presentarían los mayores aportes, alrededor de un 60% de sus IR. Por el contrario los niños de mayor edad cubrirían un 15% de sus IR.



5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 106. Yogurt, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Nivel de Fortificación 3

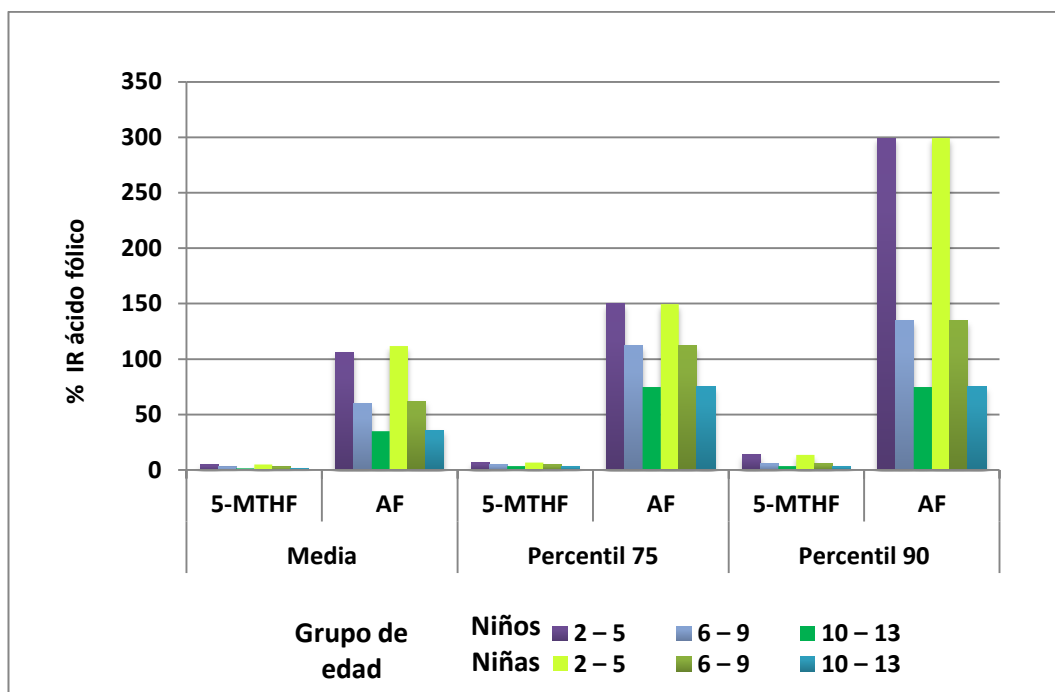


5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 107. Yogurt, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Nivel de Fortificación 4

En el nivel superior de fortificación encontrado en los yogures del mercado español (Nivel 4: $179,6 \pm 29,4$ μg de ácido fólico/ 100 g), podemos observar que el consumo medio del grupo de edad de 2 a 5 años aportaría $\geq 100\%$ de sus IR de ácido fólico, mientras que para los niños de mayor edad (10 a 13) aportaría alrededor de un 40% de sus IR (**Figura 108**). En el P90 o nivel más alto de consumo de yogures, los niños y niñas de menor edad recibirían un aporte de 3 veces el total de sus IR de ácido fólico (300%), los niños y niñas de mayor edad, sin embargo, cubrirían solo un 75% de sus IR.



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 108. Yogurt, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

Dado el elevado nivel de fortificación que supone la cantidad de ácido fólico analizada en los yogures, volvemos a observar que se superan los Niveles Máximos Tolerables de ingesta (NMT) (**Figura 109**), concretamente el grupo de edad de 2 a 5 años (niños y niñas) superan en un 50% los niveles establecidos (150% del NMT).

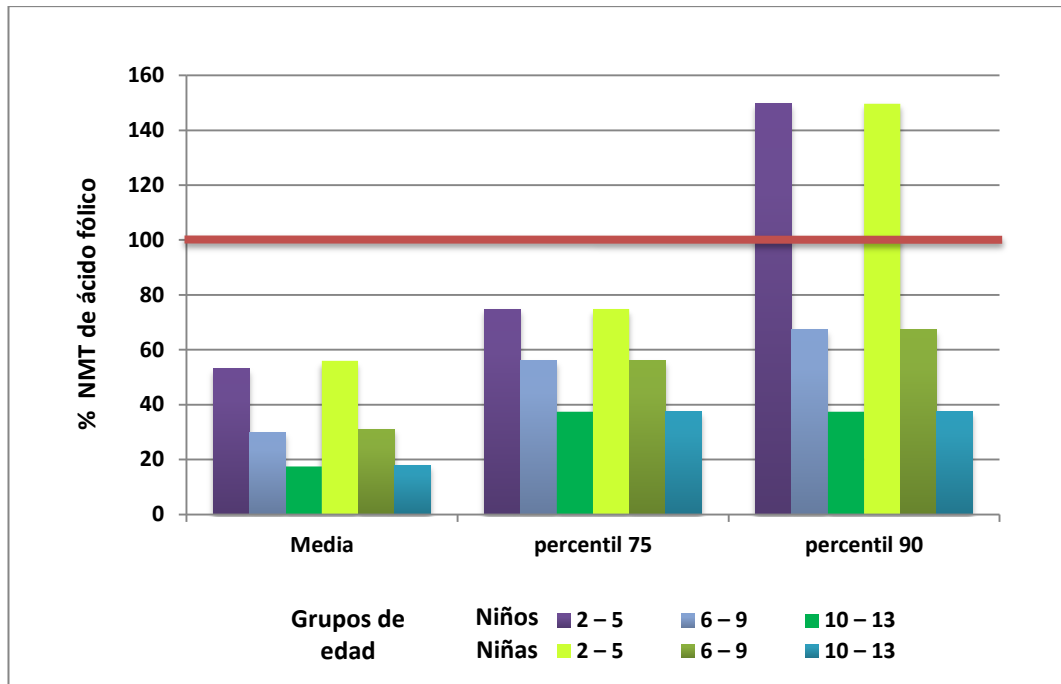


Figura 109. Yogurt, Nivel 4 de fortificación: Niveles Máximos Tolerables de Ingesta de ácido fólico alcanzados en población infantil y adolescente, estudio enKid [2].

3.3. Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población adulta de la Comunidad de Madrid: Estudio ENUCAM

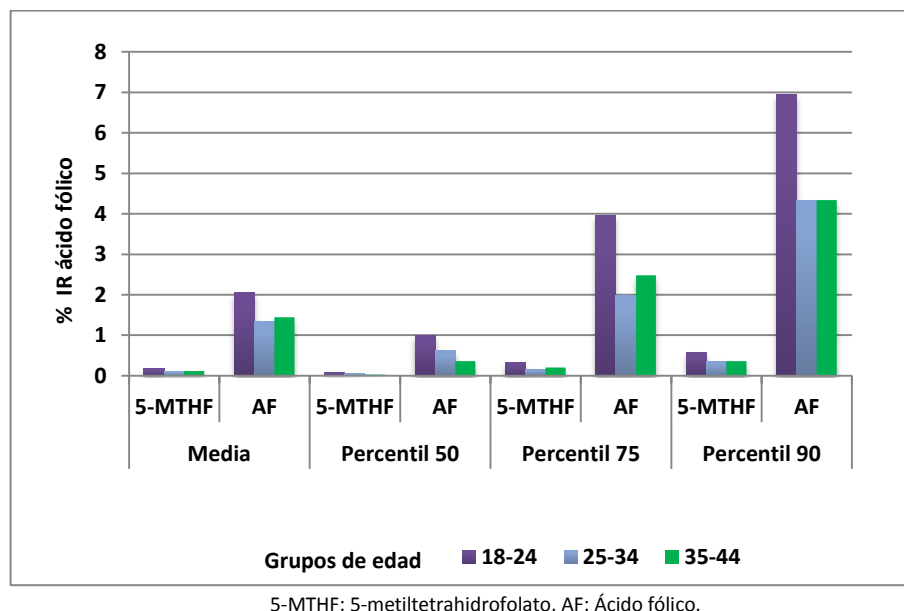
3.3.1. Cereales y derivados

a. Mujeres en edad fértil (18-44 años)

1. Cereales de desayuno

Nivel de fortificación 1

Los datos de consumo medio de *cereales de desayuno* obtenidos del estudio ENUCAM [3] indican que estos alimentos, fortificados con el Nivel 1 establecido en nuestro trabajo (Nivel 1: $69,4 \pm 14,6$ μg de ácido fólico/100 g) aportarían como máximo un 2% de las ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico de las mujeres de 18 a 24 años, dado su mayor consumo de este alimento. En el percentil 90 de consumo (P90) dicho grupo de edad alcanzaría casi un 7% de sus IR mientras que los restantes grupos apenas superarían el 4% de sus IR (**Figura 110**).

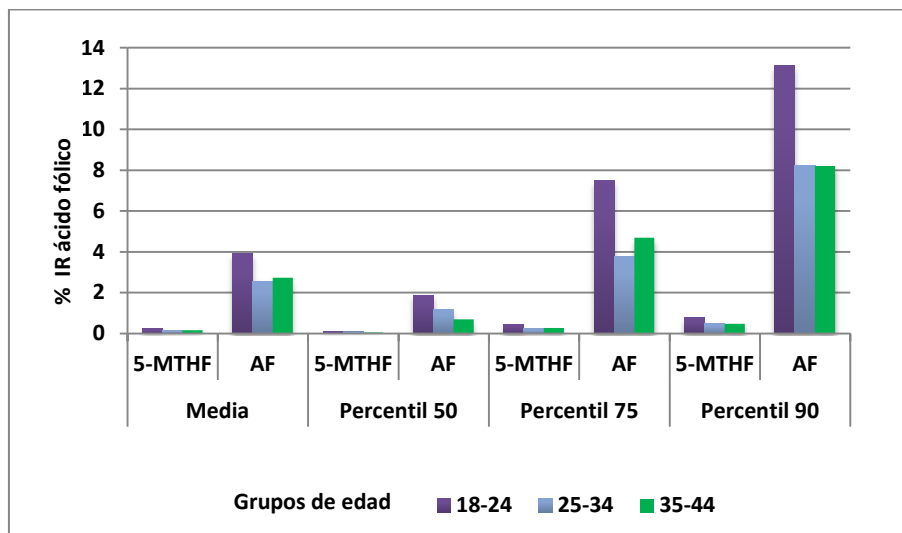


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 110. Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 1, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 2

Para el Nivel de fortificación 2, que aportaría unos $131,3 \pm 20,8 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g, las IR de las mujeres en edad fértil obtenidas mediante el consumo medio de *cereales de desayuno*, serían de entre el 2 y el 4%, mientras que para el P90 de consumo alcanzarían entre el 8 y el 13% (**Figura 111**).

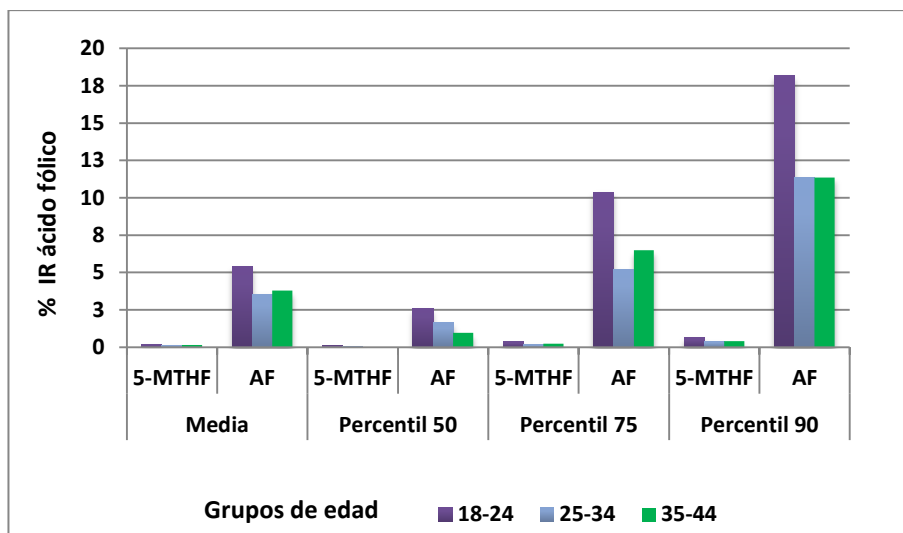


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 111. Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 2, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 3

Considerando el consumo medio de *cereales de desayuno* fortificados en el Nivel 3 ($181,7 \pm 23,8 \mu\text{g}$ de ácido fólico/ 100 g) los datos indican que aportarían entre el 3 y el 5% de las IR de las mujeres en edad fértil. En el percentil de mayor consumo (P90) el aporte de ácido fólico podría alcanzar entre el 10 y el 18% de las IR (**Figura 112**).

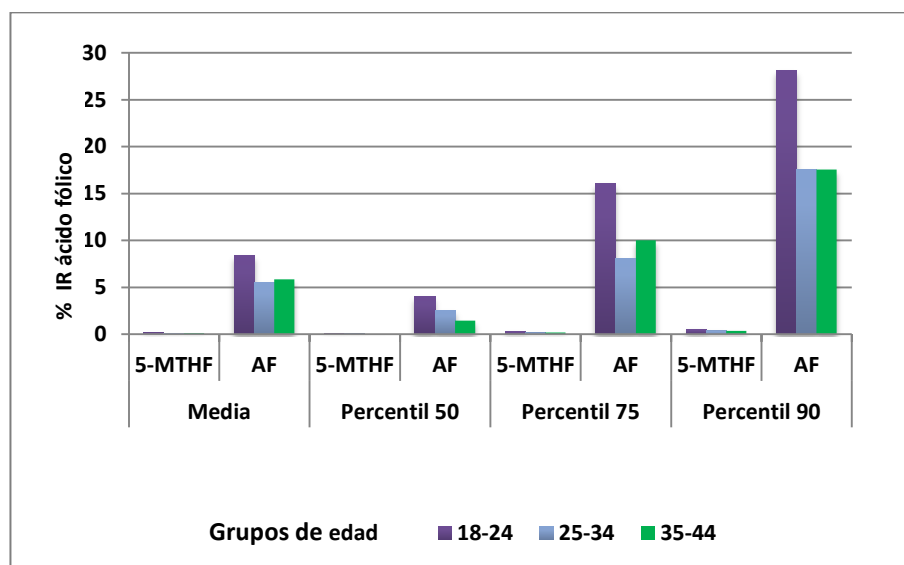


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 112. Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 3, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 4

Para el consumo medio, el nivel de fortificación 4 ($280,6 \pm 62,2$ μg de ácido fólico/ 100 g) aportaría entre un 5 y un 9% de las IR, siendo mayor para el grupo de mujeres más jóvenes. Si consideramos el P90 de consumo el aporte de ácido fólico sería de entre el 15 y el 27% de las IR (**Figura 113**).



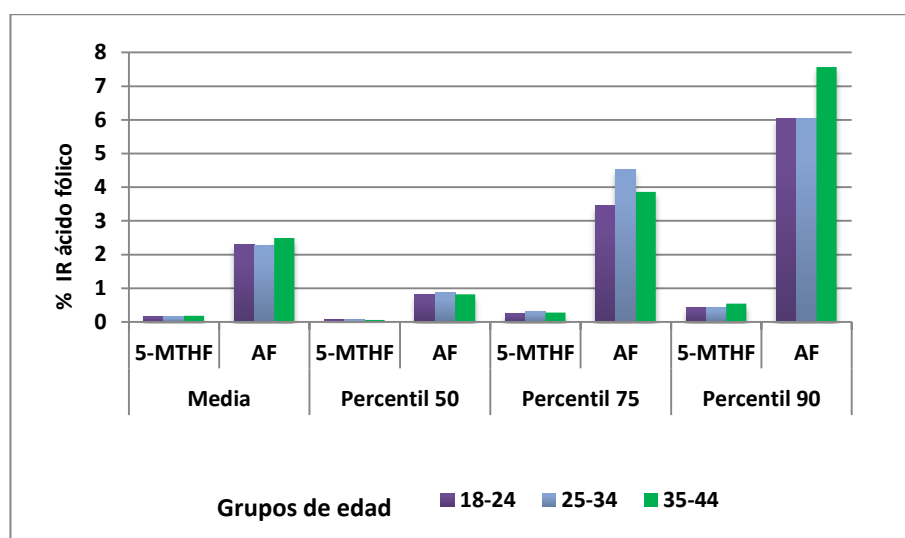
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 113. Cereales de desayuno, Nivel de fortificación 4, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Galletas

Nivel de fortificación 1

De acuerdo con las muestras de *galletas* fortificadas analizadas, en el Nivel de fortificación 1 aportan una media de $60,5 \pm 15,2 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g, por tanto y de acuerdo al consumo medio en el grupo de las mujeres, similar en todos los grupos de edad, aportarían alrededor de un 2% de sus IR de ácido fólico. En el P90 de consumo aportarían entre un 6 y un 7,5% de sus IR (**Figura 114**).

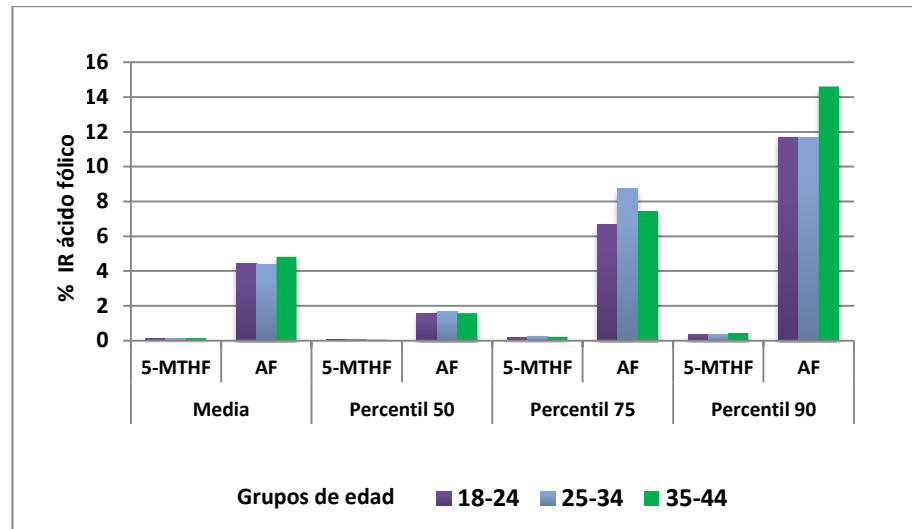


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 114. Galletas, Nivel de fortificación 1, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 2

En este nivel de fortificación (Nivel 2: $116,8 \pm 45 \mu\text{g}$ de ácido fólico/ 100 g) las IR de ácido fólico alcanzarían un 4% como media, y del 10 al 14% en el P90 de consumo.

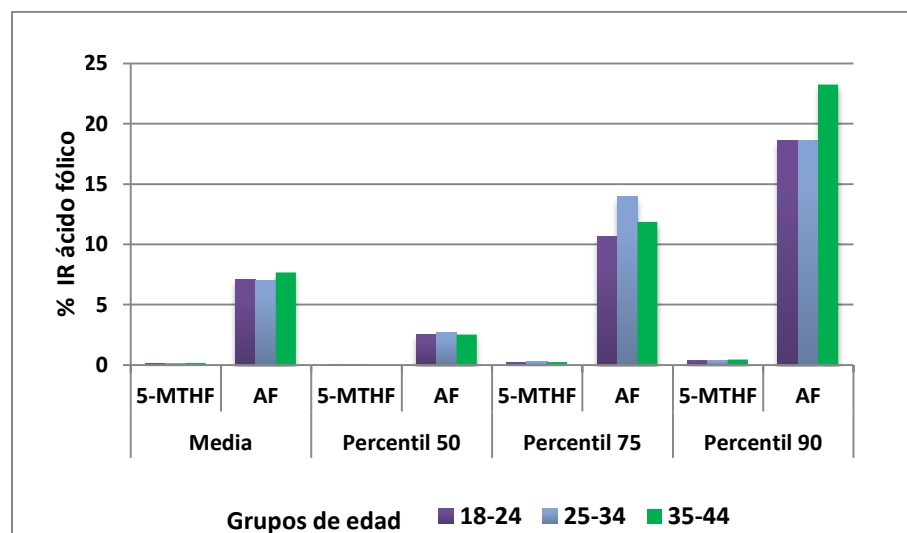


5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 115. Galletas, Nivel de fortificación 2, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 3

Los valores medios de consumo indican que con el Nivel 3 de fortificación de las *galletas* ($186 \pm 0,5 \mu\text{g}$ de ácido fólico/ 100 g) podrían alcanzarse un 6-7% de las IR de ácido fólico. En el caso del P90 de consumo se alcanzarían entre un 18 y un 23% de las IR siendo mayor para las mujeres de 35-44 años.



5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico.

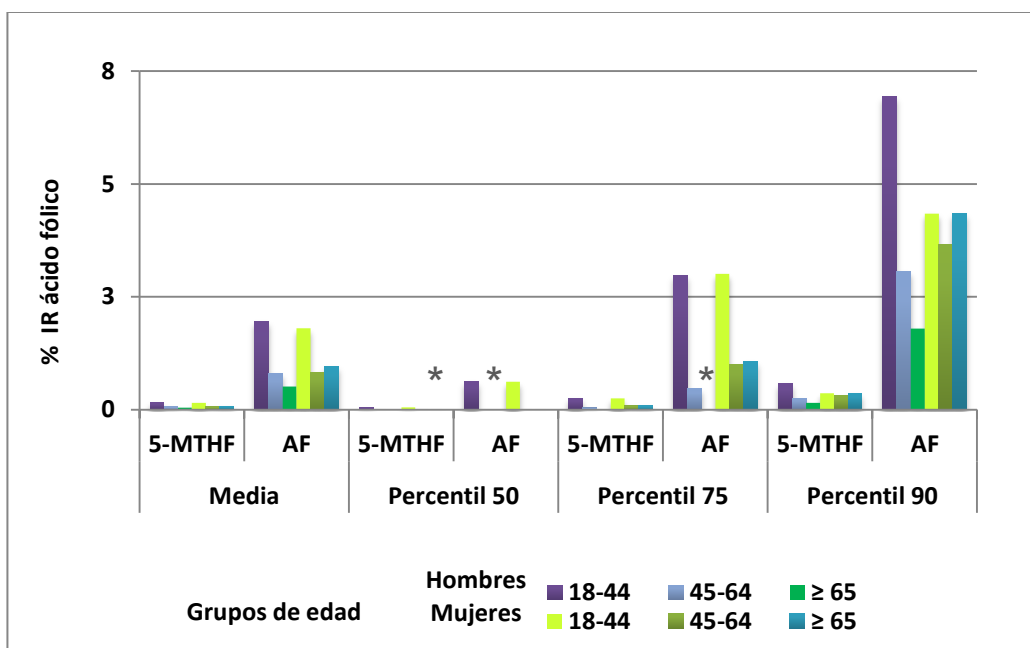
Figura 116. Galletas, Nivel de fortificación 3, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

b. Mujeres y hombres: adultos y personas mayores

1. Cereales de desayuno

Nivel de fortificación 1

De acuerdo a los datos de consumo medio de *cereales de desayuno* del estudio ENUCAM [3], el mayor aporte a las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico lo observamos tanto en hombres como en mujeres de entre 18 y 44 años, siendo de un 1,8-1,9% de sus IR cuando se aplica el Nivel 1 de fortificación ($69,4 \pm 14,6 \mu\text{g}$ de ácido fólico/ 100 g). Este aporte aumentaría en el caso de los hombres del mismo rango de edad, en el percentil 90 de consumo, hasta un 7% de sus IR. Para las personas de mayores de 65 años los aportes son considerablemente inferiores (0,5-1% de las IR) dado el bajo consumo medio de *cereales de desayuno* (Figura 117).

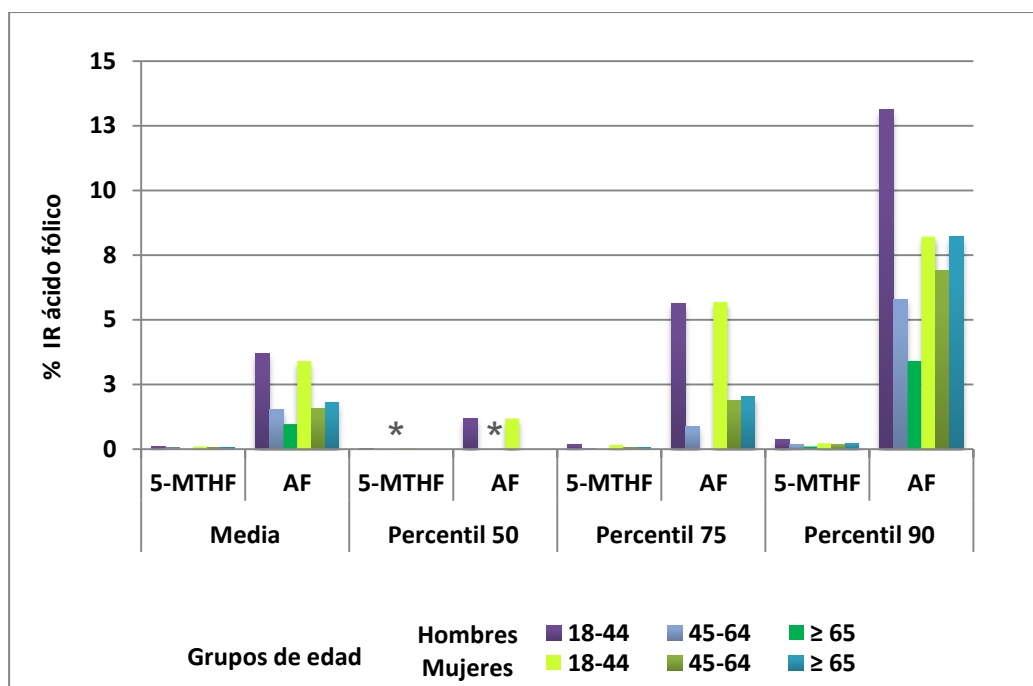


5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 117. Cereales de desayuno, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 2

Para el nivel de fortificación 2 analizado en los *cereales de desayuno* ($131,3 \pm 21$ μg de ácido fólico/100 g) y de acuerdo al consumo medio, el mayor aporte a las IR de ácido fólico corresponde al grupo de edad entre 18 y 44 años (H-M), siendo de un 3.4 al 3,7% de sus IR. En el percentil 90 de consumo, se observa un aporte potencial de hasta el 13% para los hombres de 18 a 44 años.

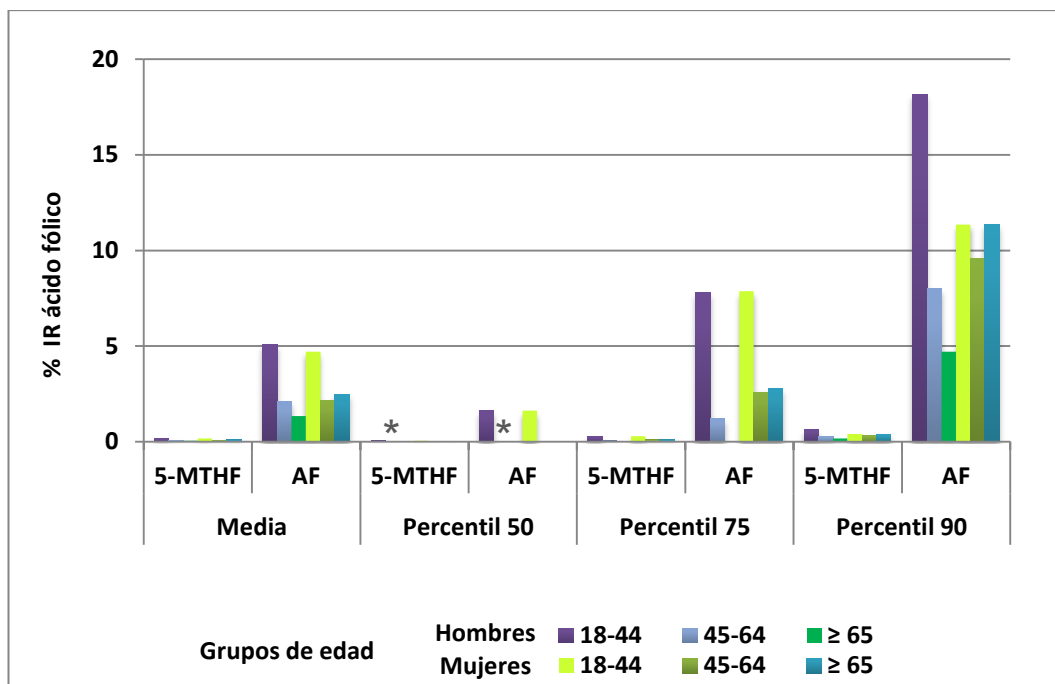


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 118. *Cereales de desayuno, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].*

Nivel de fortificación 3

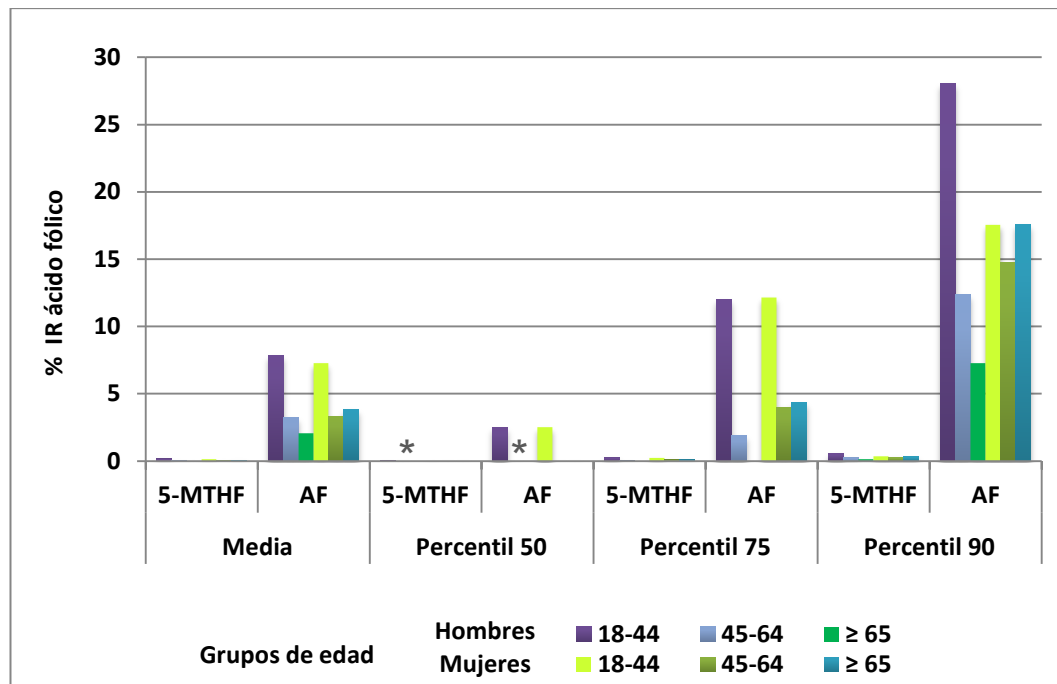
Si consideramos el Nivel 3 de fortificación ($181,7 \pm 23,8$ μg de ácido fólico/100 g) y el patrón de consumo medio, los hombres y mujeres de 18 a 44 recibirían un aporte del 4,7-5,1% de sus IR de ácido fólico mediante la ingesta de *cereales de desayuno*. El consumo medio en las personas de más de 65 años aportaría entre 1,3-2,5% de sus IR siendo mayor en las mujeres. En el P90 de consumo se observa un aporte de más del 15% de las IR para los hombres más jóvenes y de <5% para los mayores de 65 (**Figura 119**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.
Figura 119. Cereales de desayuno, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 4

En el nivel superior de fortificación encontrado para los *cereales de desayuno* (Nivel 4: $280,6 \pm 62,2$ μg de ácido fólico/100 g), el aporte para los H-M más jóvenes sería del 7% de sus IR aproximadamente. En el P90 de consumo se observa que los hombres de 18 a 44 recibirían un mayor aporte a sus IR (28%), dado su mayor consumo de *cereales de desayuno*, a continuación las mujeres del mismo grupo de edad y las mayores de 65 años alcanzarían un 17,5% de sus IR, siendo los hombres mayores de 65 los que menor aporte alcanzarían (7,3%) (Figura 120).



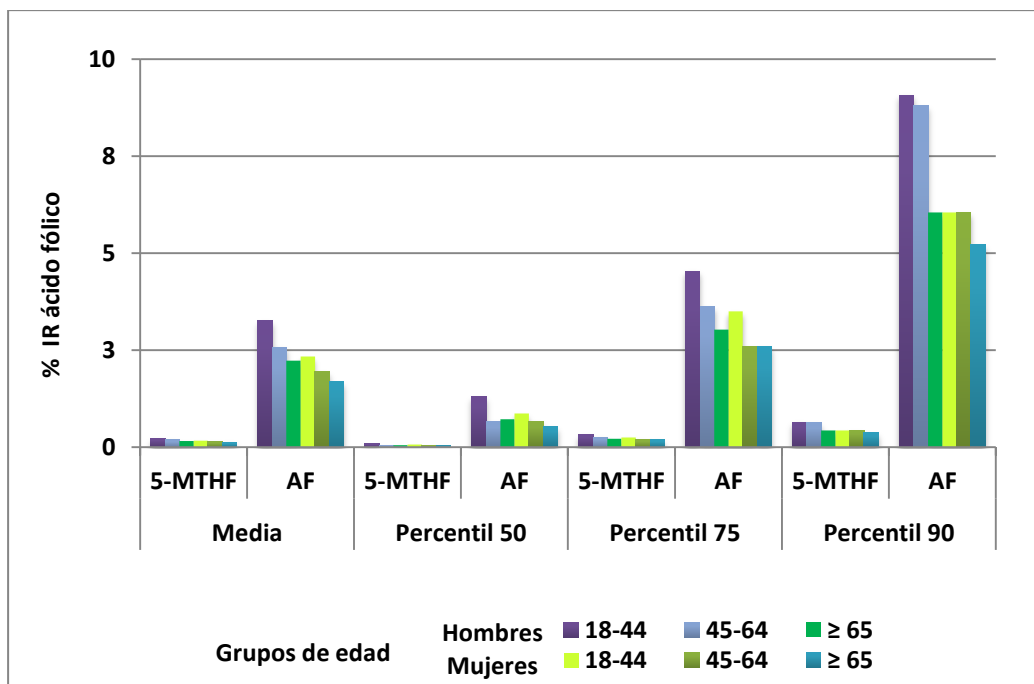
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 120. Cereales de desayuno, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

2. Galletas

Nivel de fortificación 1

El consumo medio de *galletas* es superior en los hombres de 18 a 24 años, donde el Nivel 1 de fortificación ($60,5 \pm 15,2 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g de *galletas*) les aportaría el 3,3% de sus IR de ácido fólico. En el percentil 90 de consumo, el mayor aporte sería nuevamente para los hombres de 18 a 44 y para los de 45 a 64 (9,1 y 8,8 % de sus IR respectivamente) (**Figura 121**).

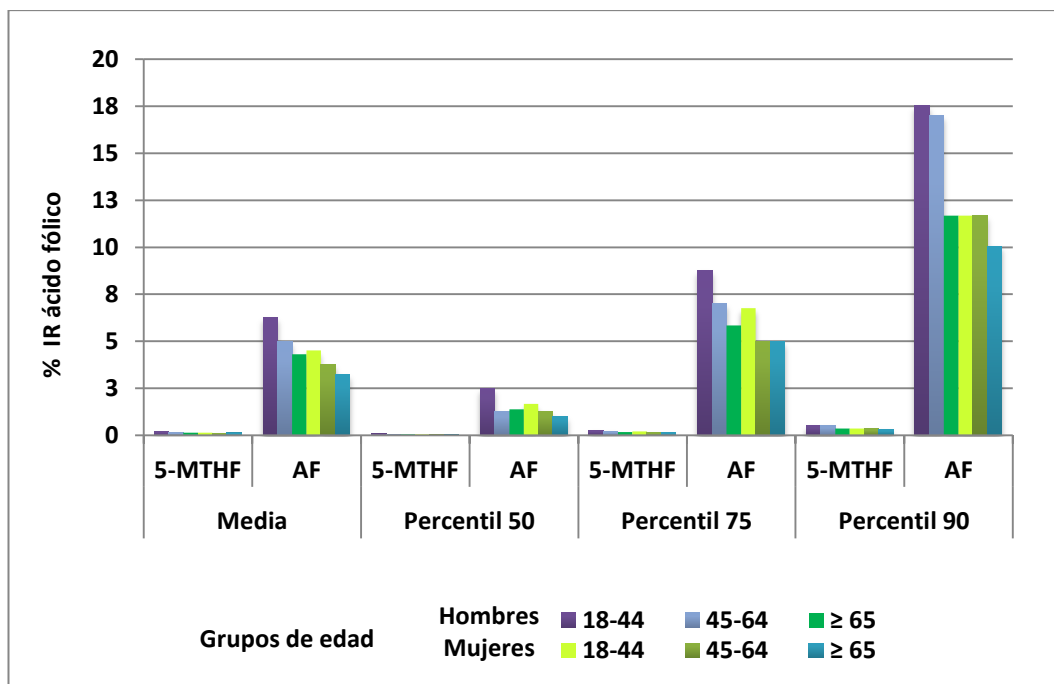


5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 121. Galletas, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 2

Si aplicamos el valor medio de ácido fólico del Nivel 2 de fortificación ($116,8 \pm 45 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g) a los datos de consumo ENUCAM [3] se obtendrían unos aportes del 6,3% de las IR de los hombres de entre 18 y 44 años, segmento que realiza el mayor consumo. Las mujeres de más de 65 años, que realizan menor consumo medio de este alimento, cubrirían un 4,3% de sus IR mediante su ingesta. Para el P90 de consumo se observaría un aporte del 17-17,5% para los hombres de 18 a 44 y para los de 45 a 64 años. Las mujeres de los diferentes rangos de edad, por el contrario, cubrirían entre un 10 y un 11,7% de sus IR de ácido fólico, a dicho percentil de consumo (**Figura 122**).

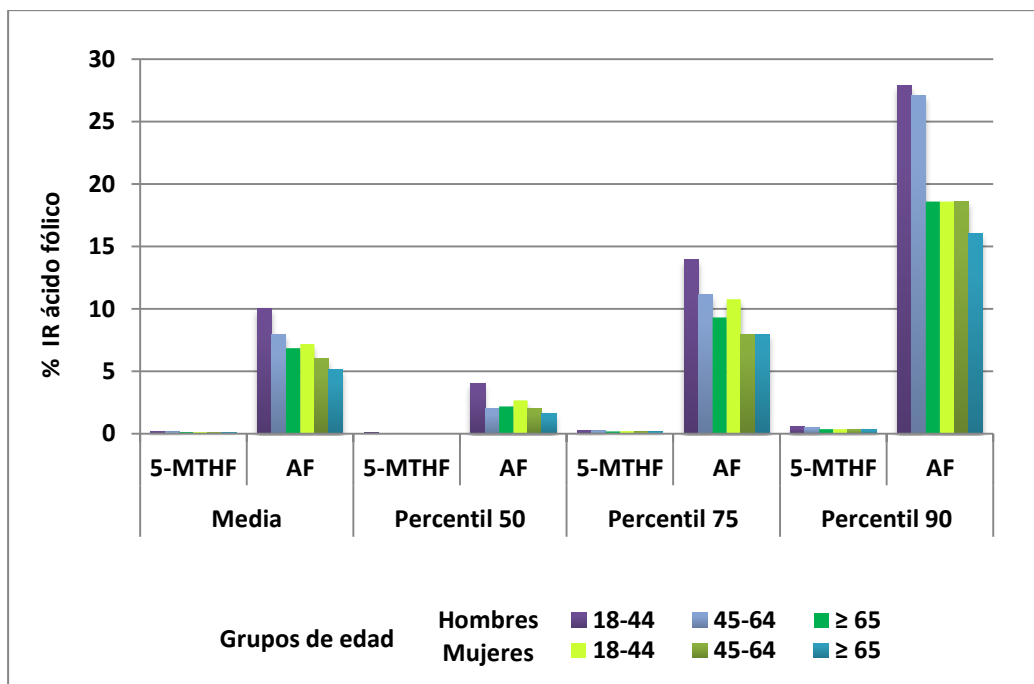


5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 122. Galletas, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 3

En el mayor nivel de fortificación encontrado en las *galletas* analizadas, la media es de $186 \pm 0,5 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 g. A este nivel, en el consumo medio de los hombres entre 18 y 44 años, aportaría un 10% de sus IR de ácido fólico. Asimismo, en el P90 de consumo los hombres cubrirían más del 25% de sus IR. El grupo de las mujeres cubrirían entre un 5 y un 7,2% de sus IR si consideramos la media de consumo de *galletas*; y entre un 16 y un 18% en el P90 (Figura 123).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 123. Galletas, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

3.3.2. Lácteos y derivados

a. Mujeres en edad fértil (18-44 años)

1. Leche de vaca

De acuerdo con los criterios establecidos en nuestro estudio, la *leche* de vaca fortificada analizada sólo presentó niveles de fortificación 3 y 4.

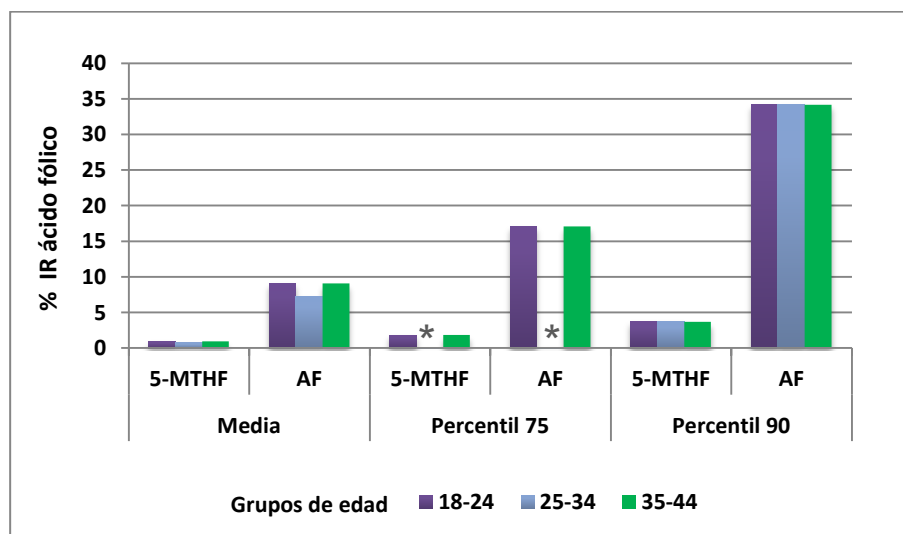
Nivel de fortificación 3

De acuerdo con los datos del estudio ENUCAM, el consumo medio de *leche* en el grupo mujeres de edad fértil se sitúa entre 65 y 162 ml/día, siendo mayor para la *leche* semidesnatada y menor para la *leche* entera. Los grupos de edad de 25 a 34 y de 18 a 24 son los mayores consumidores de *leche* semidesnatada y las mujeres de 35 a 44 años consumen *leche* entera en mayor proporción. Si consideramos el Nivel 3 de fortificación de la *leche* analizada

($34,2 \pm 0,4 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 ml) el aporte a las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico de las mujeres sería:

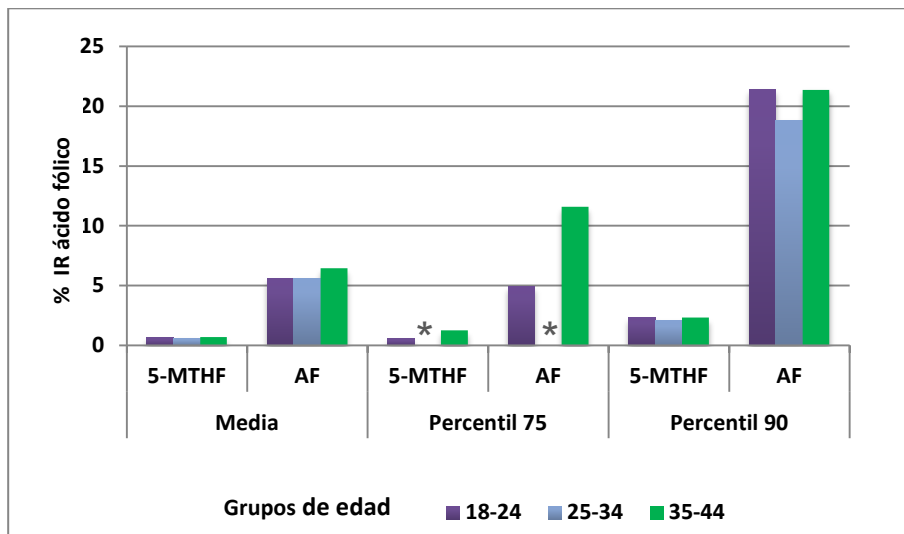
- De entre el 10 y el 13% con el consumo medio de *leche* semidesnatada (**Figura 124**).
- Entre el 7 y el 9% con el consumo medio de *leche* desnatada (**Figura 125**).
- Entre el 5 y el 6% con el consumo de *leche* entera (**Figura 126**).

En el percentil 90 de consumo la *leche* semidesnatada, la más consumida, entre 470 y 500 ml/día, en este caso por las mujeres de 25 a 34 y de 35 a 44 años, lo cual supondría un aporte entre el 34 y el 42% de las IR. La *leche* desnatada, con un consumo de 400 ml/día aportaría un 34% en todos los grupos de edad. El consumo de *leche* entera, entre 220 y 250 ml aportaría entre el 18 y el 21% de las IR de ácido fólico (**Figuras 124, 125 y 126**).



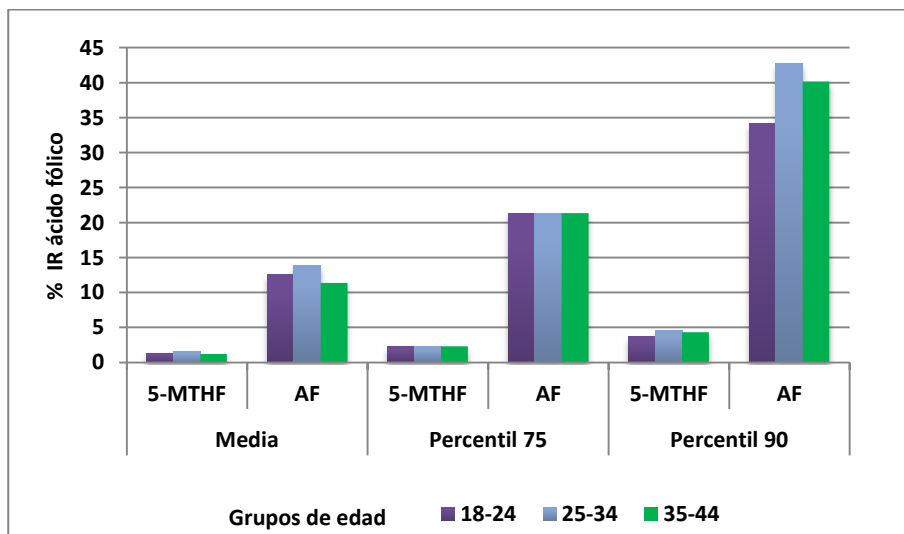
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 124. *Leche desnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].*



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 125. Leche entera, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

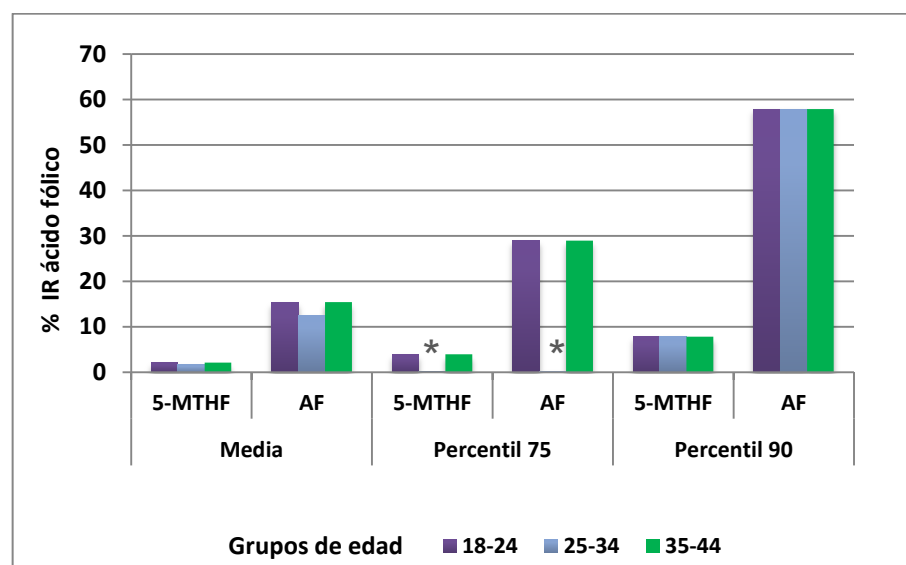
Figura 126. Leche semidesnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 4

En el Nivel 4 de fortificación de la *leche* analizada ($53,9 \pm 22,6$ μg de ácido fólico/100 ml), el aporte a las IR de ácido fólico de las mujeres en edad fértil de acuerdo a su consumo medio de los distintos tipos de *leche*, sería:

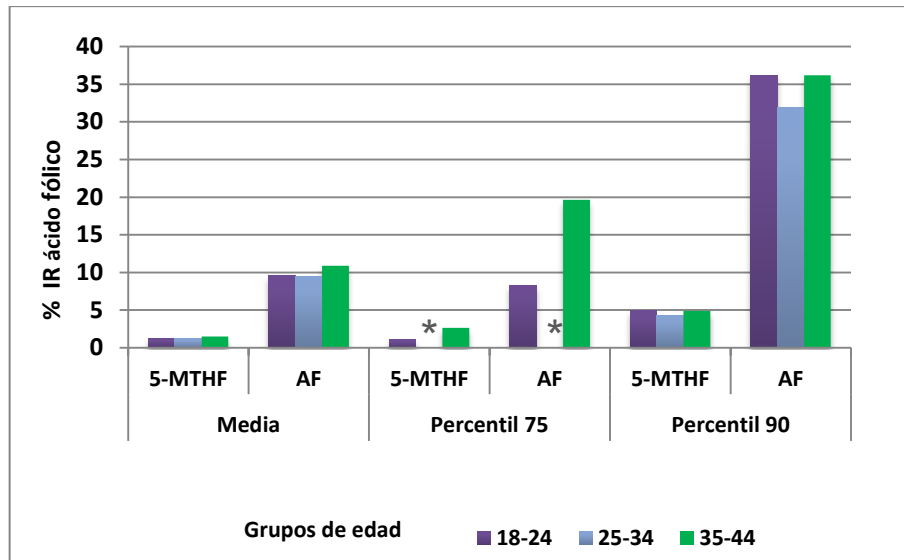
- De entre el 19 y el 23% con el consumo medio de *leche* semidesnatada (**Figura 127**).
- Entre el 12 y el 15% con el consumo medio de *leche* desnatada (**Figura 128**).
- Entre el 9 y el 11% con el consumo de *leche* entera (**Figura 129**).

En el P90 de consumo, la ingesta de *leche* semidesnatada supondría un aporte del 72% de las IR de ácido fólico para las mujeres de 25 a 34 años, la ingesta de *leche* desnatada, un 57% de las IR para todos los grupos de edad considerados, y el consumo de *leche* entera, mayor para los grupos de 18 a 24 y de 35 a 44, aportaría un 36% de las IR de ácido fólico (**Figuras 127, 128 y 129**).



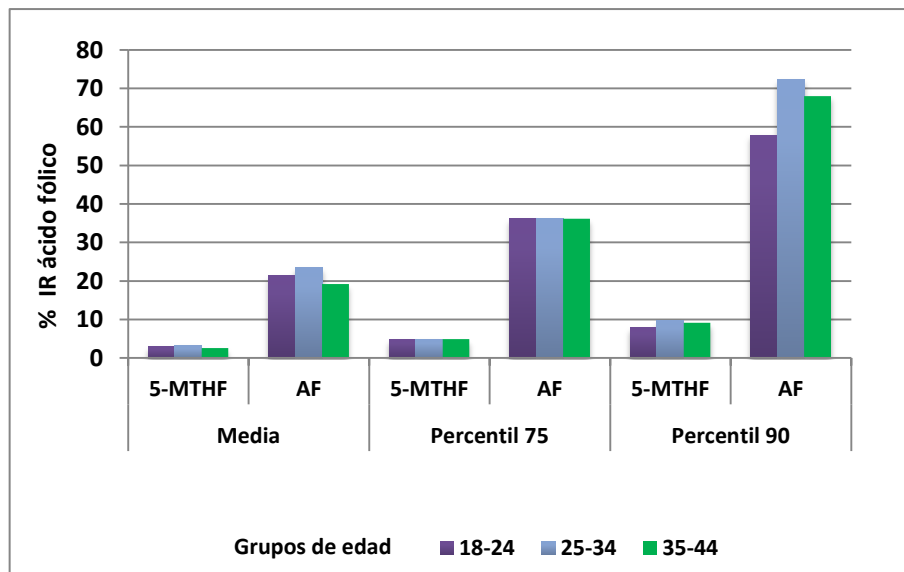
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 127. *Leche desnatada, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].*



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 128. Leche entera, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 129. Leche semidesnatada Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

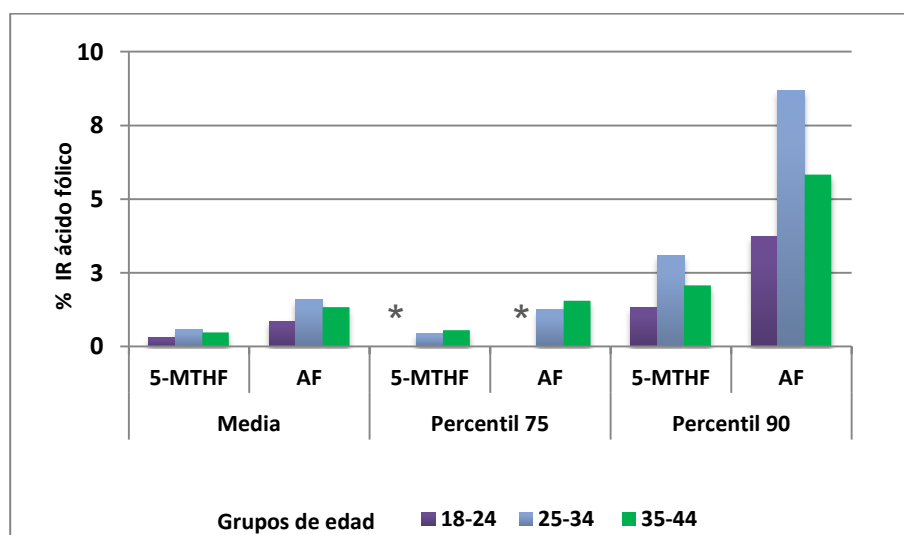
2. Yogures

Nivel de fortificación 1

En el grupo de los yogures, se observa una ingesta media superior de *yogurt* entero para todos los grupos de edad, excepto para las mujeres de 35 a 44 que realizan una ingesta media superior de yogures con *Bífidus*. Para el Nivel 1 de fortificación de los yogures ($28 \pm 0,1 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 ml) el aporte medio de ácido fólico sería:

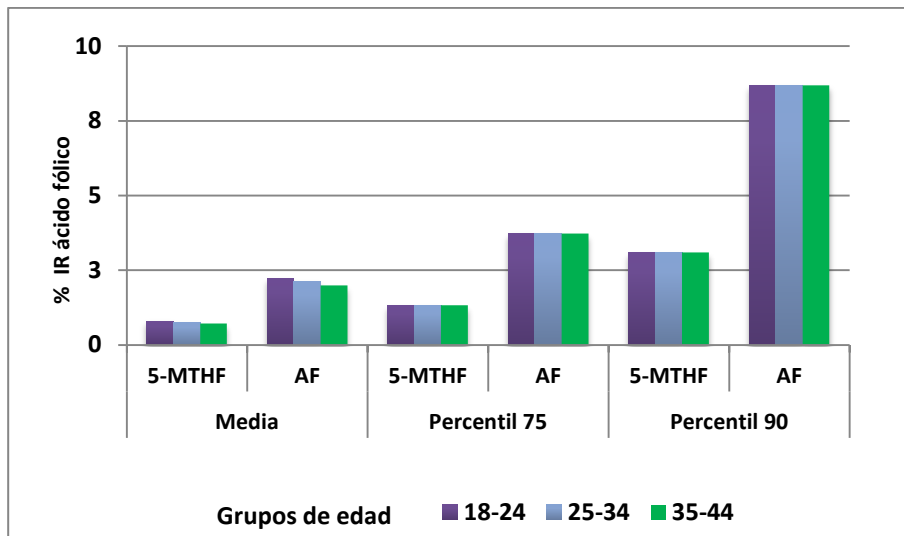
- Del 2% de las IR en el caso del *yogurt* entero (**Figura 130**).
- Entre el 1 y el 3% de las IR para el *yogurt* con *Bífidus* (**Figura 131**).
- Entre el 0,9 y el 1,6% en el caso del *yogurt* desnatado (**Figura 132**).

En el percentil 90 de consumo se observa que en ningún caso se superaría el aporte del 9% a las IR de ácido fólico de las mujeres en edad fértil y las mujeres de 18 a 24 años son las que más bajo aporte recibirían dado su menor consumo de yogures (**Figuras 130, 131 y 132**).



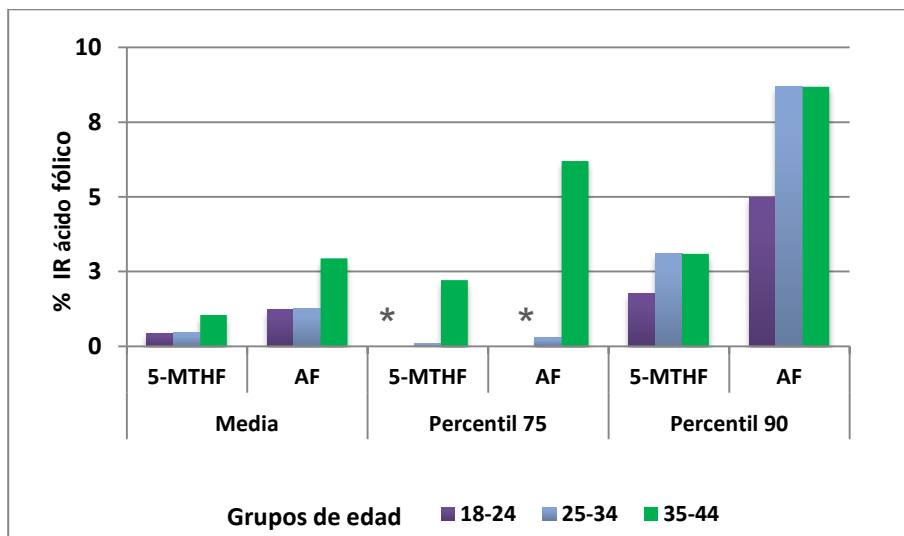
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 130. *Yogurt desnatado, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].*



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 131. Yogurt entero, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



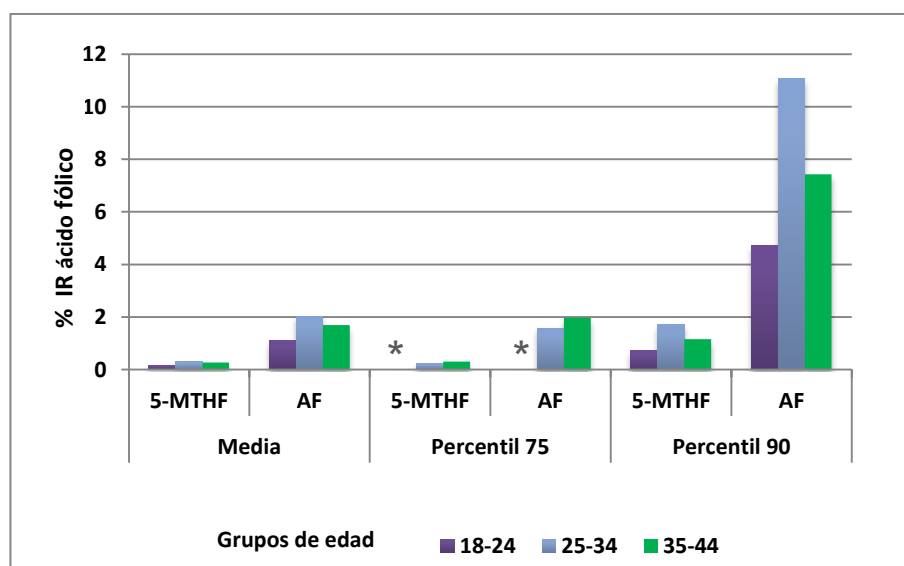
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 132. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 2 y 3

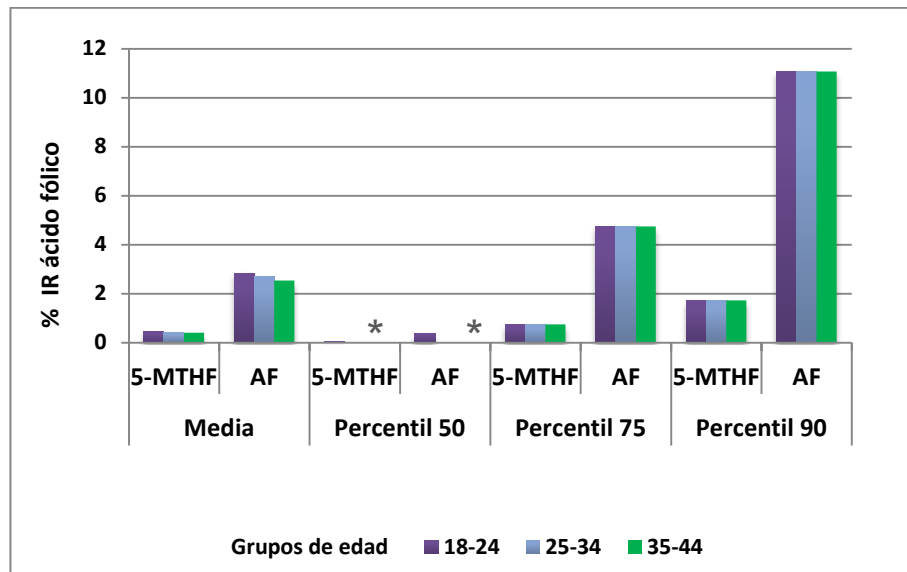
Debido a que los niveles de fortificación 2 y 3 son muy próximos (Nivel 2: $35,4 \pm 10,7$ μg de ácido fólico/100 ml, Nivel 3: $38,1 \pm 6,8$ μg de ácido fólico/100 ml) podemos estudiar sus aportes en conjunto. El consumo medio de *yogurt* entero aportaría entre un 2 y un 3% de las IR para todos los grupos de edad. El *yogurt* fermentado con *Bifidus* supondría un aporte del 3,7 al 4% de las IR para las mujeres entre 35 y 44 años. En el caso del consumo medio de yogures desnatados los aportes a las IR alcanzarían del 1,1 al 2,8% siendo mayor para las mujeres entre 25 y 34 años.

Si consideramos el P90 de consumo de los distintos tipo de yogures observamos el aporte mayoritario con los yogures enteros y con los yogures con *Bifidus*, siendo del 11-12% de las IR en ambos casos, y las mujeres de 25 a 34 y las de 35 a 44 las que recibirían un mayor aporte de acuerdo a su consumo de yogures. Los yogures desnatados en el P90 de consumo aportarían entre el 11 y el 12% de las IR de ácido fólico únicamente a las mujeres entre 25 y 34 años.



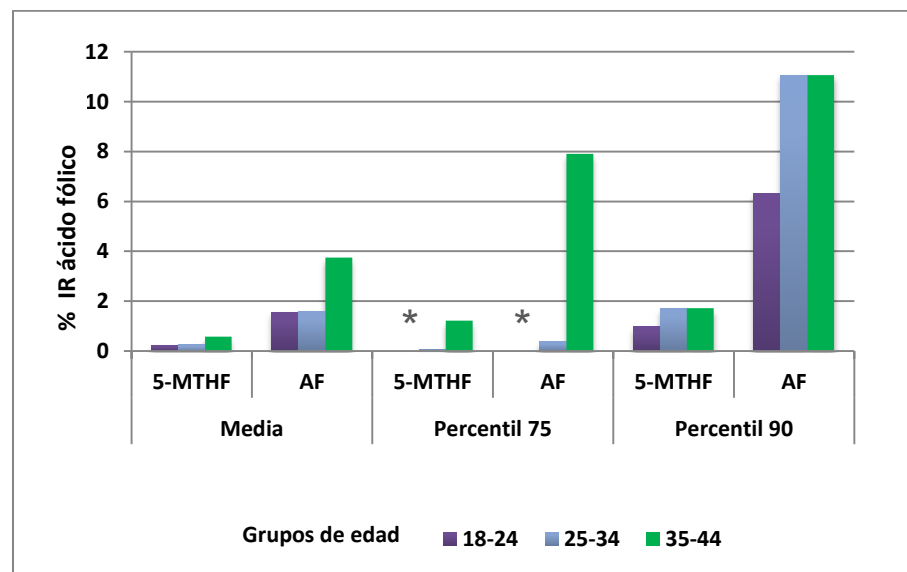
5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 133. *Yogurt desnatado, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].*



5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

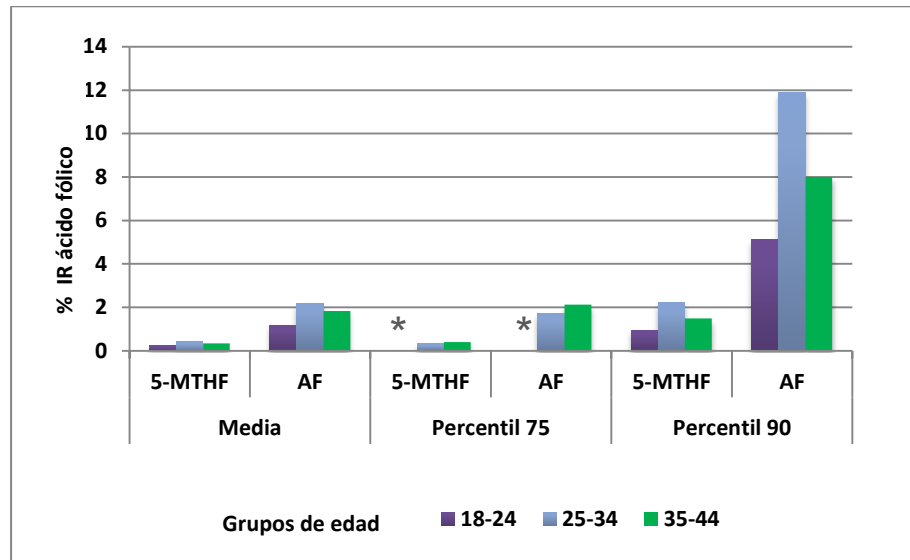
Figura 134. Yogurt entero, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

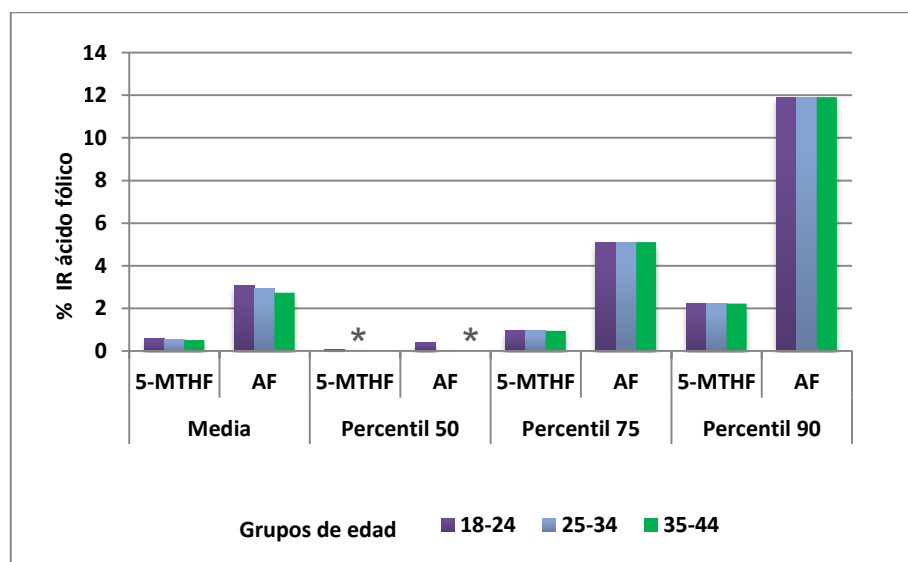
Figura 135. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 3



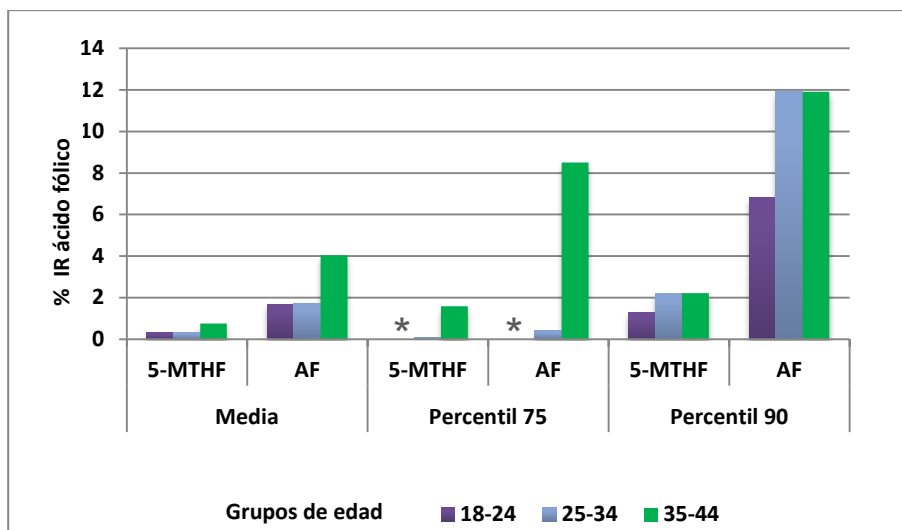
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 136. Yogurt desnatado, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 137. Yogurt entero, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



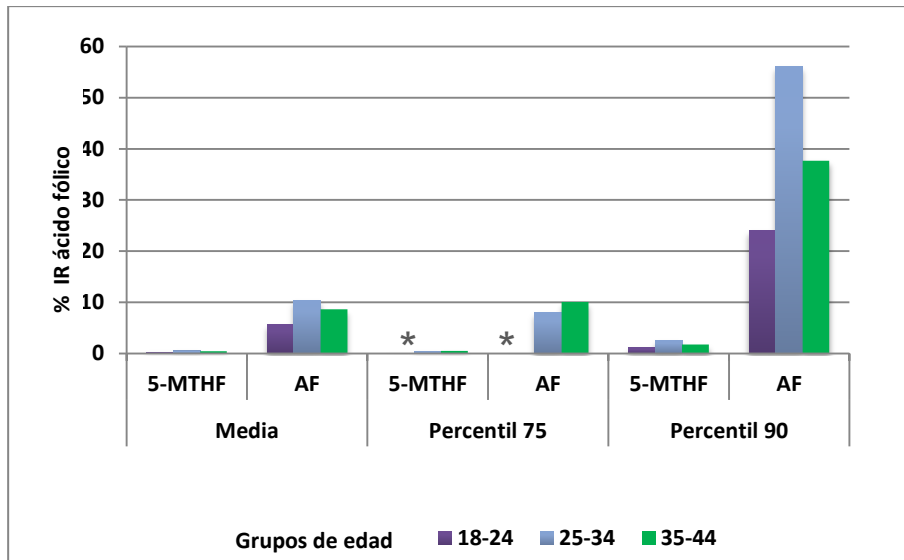
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 138. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 4

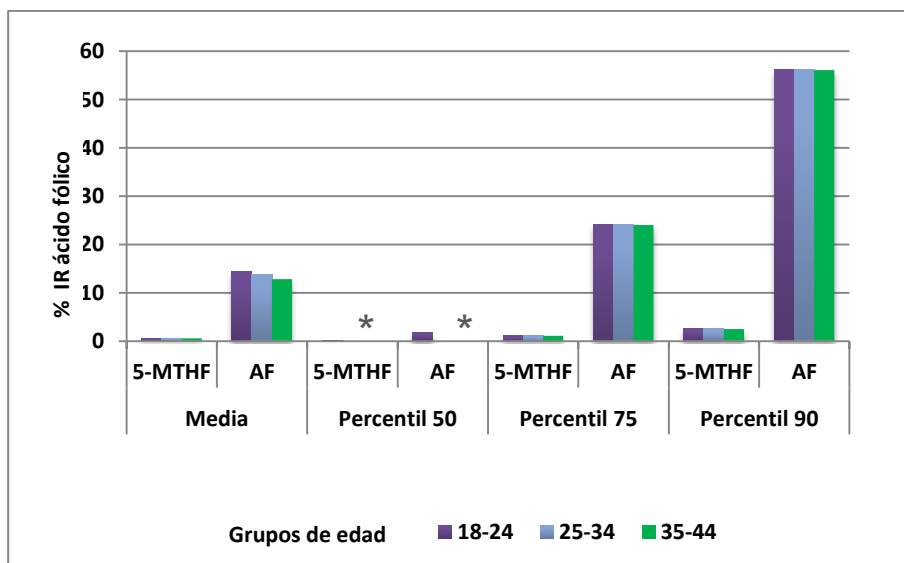
El Nivel de fortificación 4 en el grupo de los yogures es considerablemente superior ($179,6 \pm 29,4 \mu\text{g}$ de ácido fólico/ 100 ml) por lo que los aportes a las IR de los distintos grupos de edad se incrementan de forma proporcional. En el nivel medio de consumo, se observa un aporte potencial de entre el 5 y el 19% de las IR de ácido fólico, siendo mayor mediante el consumo de *yogurt* entero en todos los grupos de edad (12-14%) (**Figura 139**) y mediante el consumo de *yogurt* con *Bifidus* en el grupo de 35 a 44 años (19%) (**Figura 140**).

Si atendemos al percentil 90 de consumo, encontramos que el consumo de *yogurt* entero aportaría el 56% de las IR de ácido fólico en todos los grupos de edad (**Figura 139**). Por otro lado, el consumo de *yogurt* con *Bifidus* supondría el 56% de las IR únicamente para las mujeres a partir de los 25 años, dado su mayor consumo (**Figura 140**).



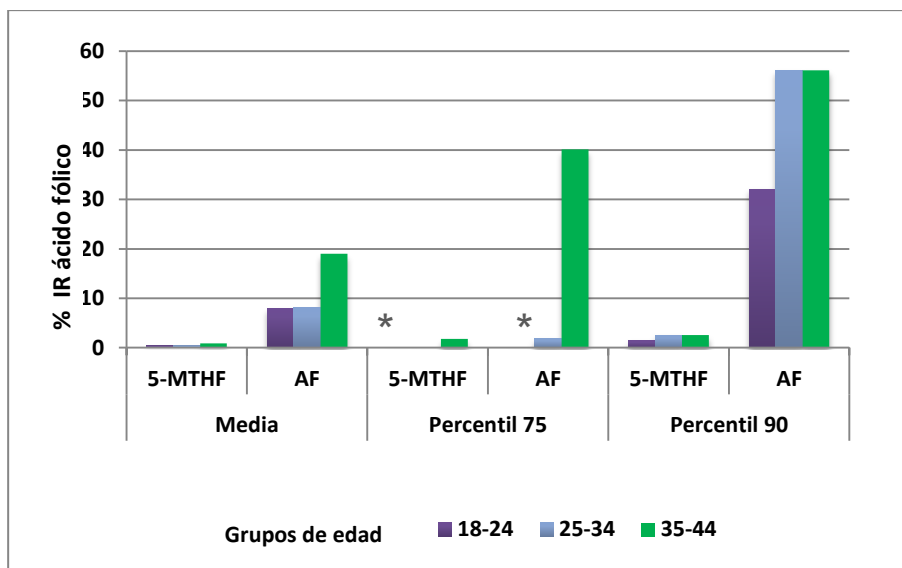
5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 139. Yogurt desnatado, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahydrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 140. Yogurt entero, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahydrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 141. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas de mujeres en edad fértil, estudio ENUCAM [3].

b. Mujeres y hombres: adultos y personas mayores

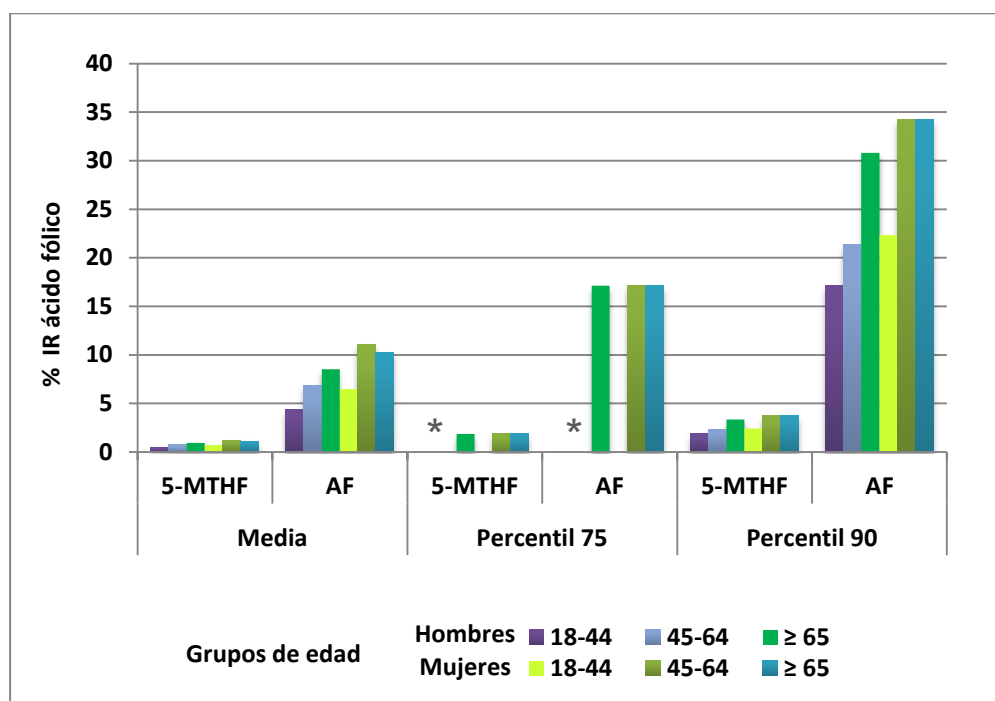
1. Leche de vaca

Los datos de consumo medio de *leche* de vaca del estudio ENUCAM [3] indican un consumo medio de entre 44 y 147 ml/día, siendo mayor el consumo de *leche* semidesnatada y menor el de *leche* entera, tal como ya observamos en el segmento de mujeres en edad fértil. Los hombres entre 18 y 44 años realizan un mayor consumo medio de *leche* entera y las mujeres entre 45 y 64 años consumen *leche* desnatada en mayor proporción [3].

Nivel de fortificación 3

En las *leches* analizadas el Nivel 3 de fortificación aportaría una media de $34,2 \pm 0,4$ μg de ácido fólico/ 100 ml.

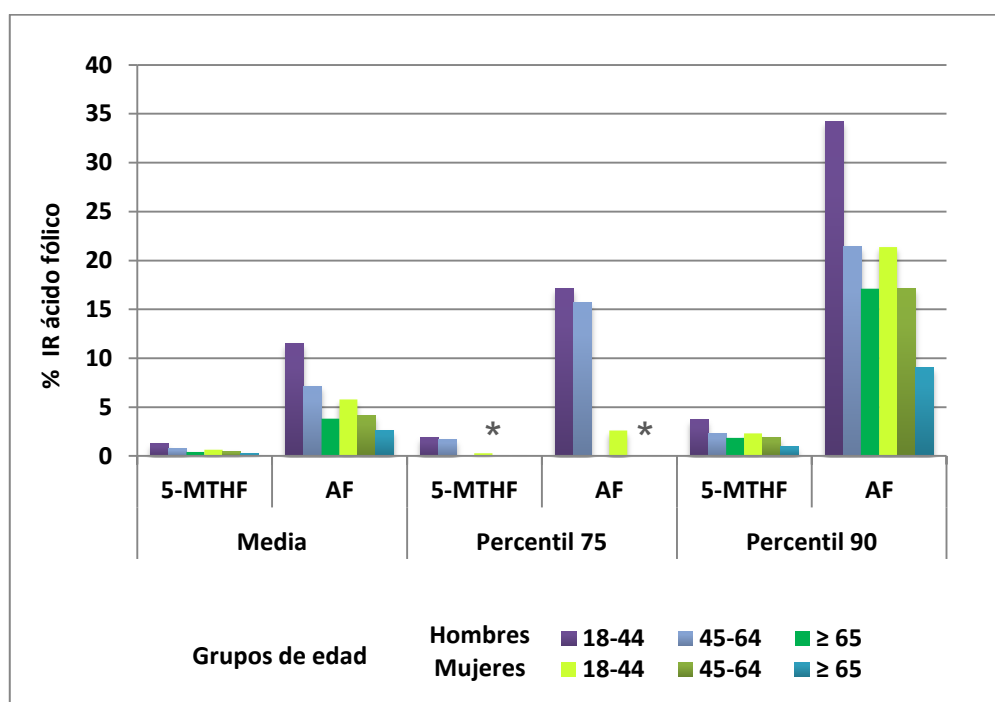
Para la *leche* desnatada, el consumo medio es de entre 50 y 119 ml/ día, a lo largo de todos los grupos de edad, siendo mayor el consumo medio observado en las mujeres de 45 a 64 y en las mayores de 65 años. En estos grupos dicho consumo aportaría entre el 10 y el 11% de sus IR de ácido fólico. Si atendemos al P90 de consumo el aporte de ácido fólico a las IR sería del 34% para los citados grupos de edad, y del 31% para los hombres mayores de 65 años (Figura 142).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 142. Leche desnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

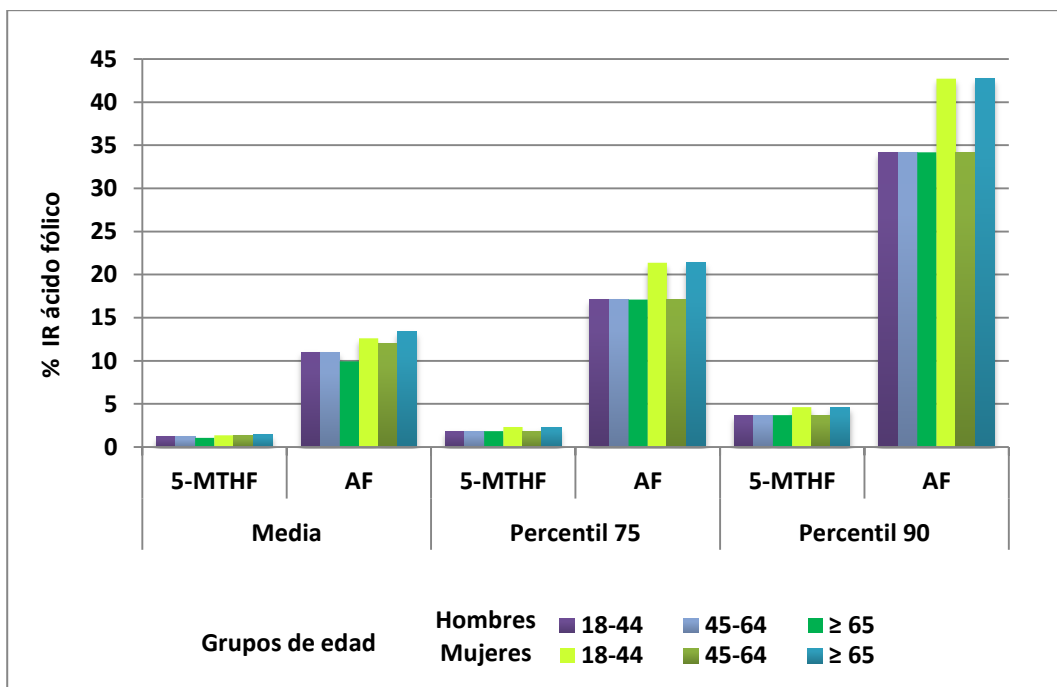
En el caso de la *leche* entera, el mayor aporte medio lo tendrían los hombres más jóvenes (11,5% de sus IR) mientras que las mujeres de la misma edad solo alcanzarían el 5,8% de sus IR. En el P90 de consumo el aporte a las IR de ácido fólico se elevaría hasta un 34,2% en los hombres de 18 a 44 años dada la mayor ingesta de este alimento (**Figura 143**). De acuerdo con los datos del estudio ENUCAM el grupo de los hombres y mujeres mayores de 65 es el que menor consumo medio realiza, con lo que el aporte de ácido fólico sería de un 4 a un 3% respectivamente.



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 143. *Leche entera, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].*

El aporte potencial de ácido fólico mediante la ingesta media de *leche* desnatada se situaría entre un 12,6 y un 13,4% de las IR para las mujeres de 18 a 44 y para las mayores de 65 años, respectivamente. Sin embargo, dichos aportes no distan de los de los hombres de todos los grupos de edad que estarían entre el 9 y el 11% de sus IR de ácido fólico. En el P90 de consumo las mujeres más jóvenes y las mayores de 65 años recibirían un mayor aporte, del orden del 43% de sus IR (Figura 144).



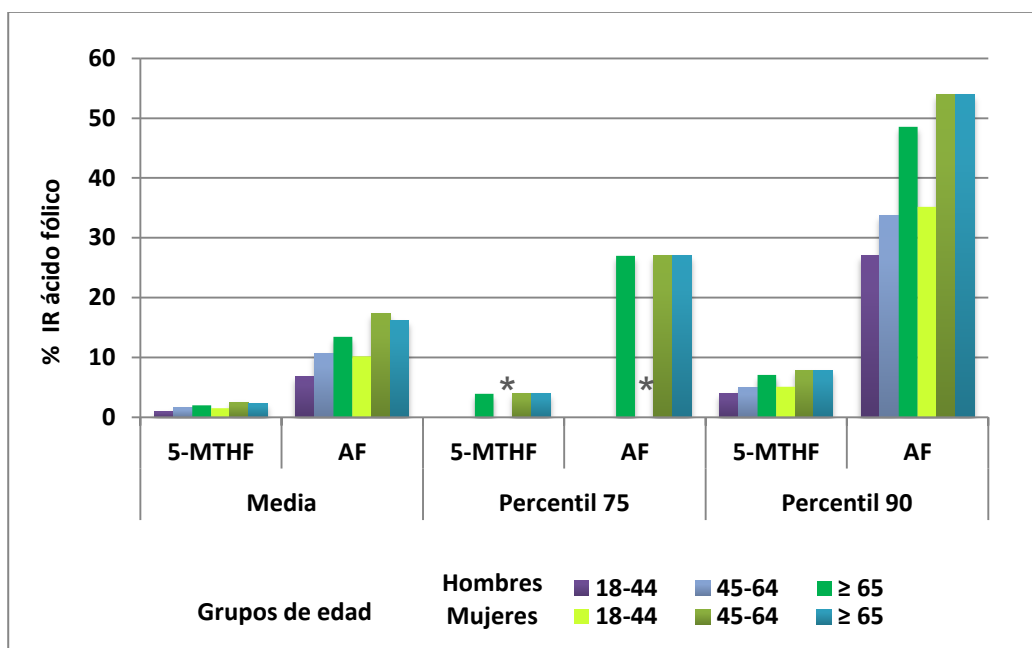
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 144. Leche semidesnatada, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 4

En las *leches* analizadas el Nivel 4 de fortificación aportaría una media $53,9 \pm 22,6$ μg de ácido fólico/ 100 ml.

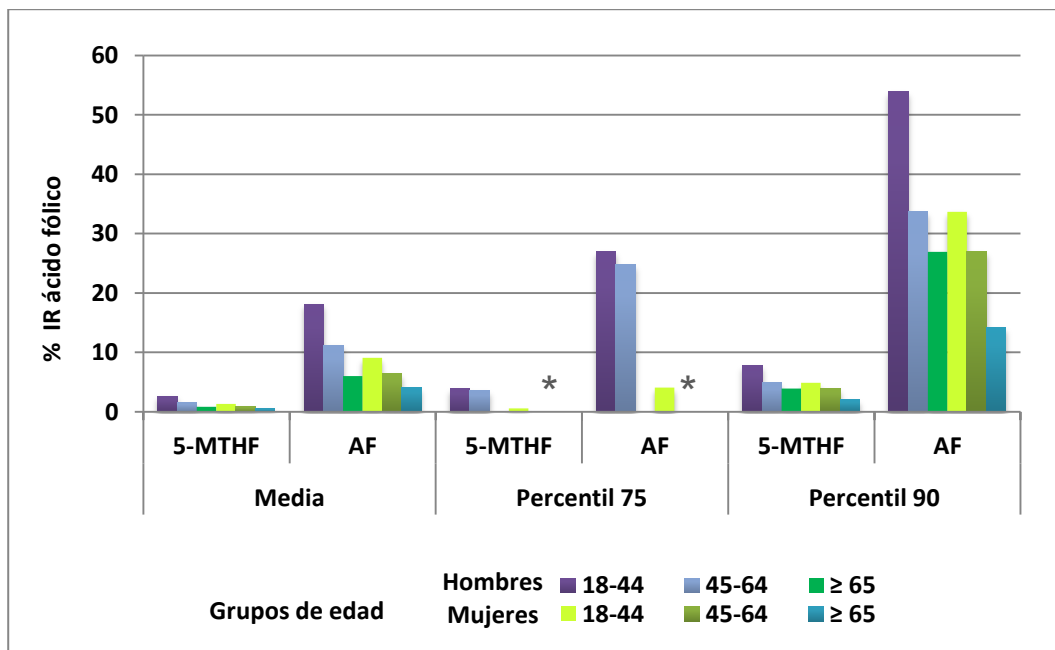
La *leche* desnatada presenta el menor nivel de consumo de acuerdo a los datos de la población estudiada. Si atendemos al consumo medio aplicando el Nivel 4 de fortificación, se observa que este aportaría un 10-13% de las IR para los hombres entre 45 y 64 y para los mayores de 65 años; y entre el 16-17% para las mujeres en los mismos rangos de edad, quienes realizan un mayor consumo de este tipo de *leche*. En el P90 de consumo el aporte aumentaría hasta el 54% de las IR de ácido fólico para las mujeres de mayor edad, seguido por un aporte del 48,5% de las IR para los hombres mayores de 65 años (**Figura 145**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 145. Leche desnatada, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

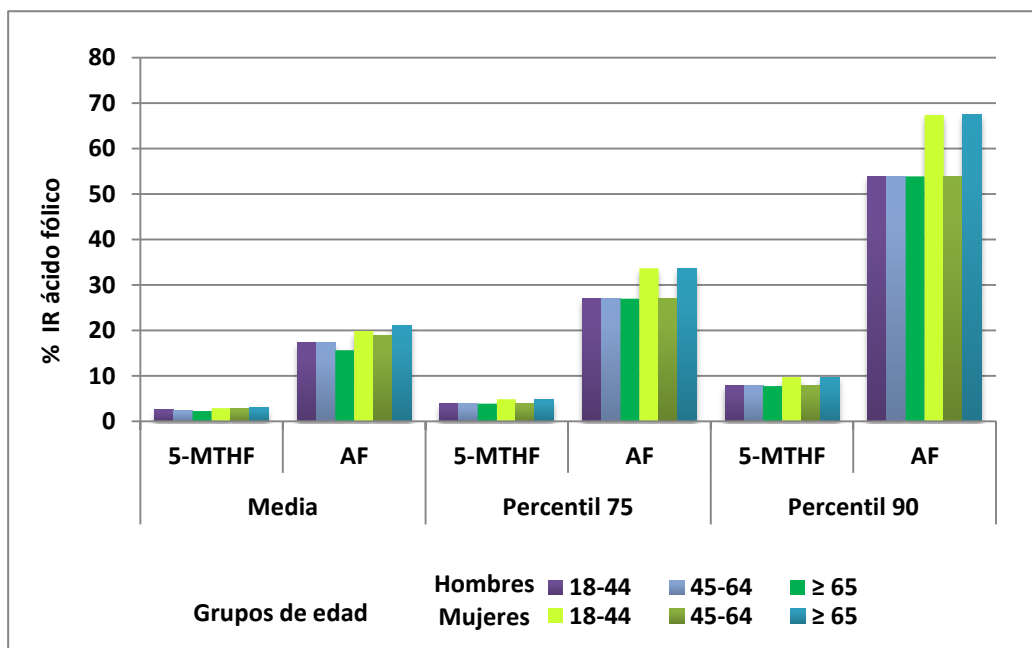
Para la *leche* entera se observan mayores niveles de consumo medio en los hombres jóvenes, a los cuales aportaría un 18% de sus IR de ácido fólico. En el P90 de consumo el aporte de ácido fólico para este mismo grupo de edad se triplica, llegando hasta un 54% de las IR (**Figura 146**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 146. *Leche entera, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].*

La *leche* semidesnatada presenta el mayor consumo medio en todos los grupos de edad y sexo, siendo de entre 116,3 y 156,6 ml/ día. El aporte medio de ácido fólico se estimaría entonces entre el 15 y el 21% de las IR, siendo mayor para las mujeres de más de 65 años. En el P90 de consumo las mujeres de 18 a 44 y las mayores de 65 años recibirían aún mayor aporte, del 67,4%, mientras que los grupos de edad restantes alcanzarían un 56% de sus IR, niveles elevados, considerando que provienen de un único alimento (**Figura 147**).



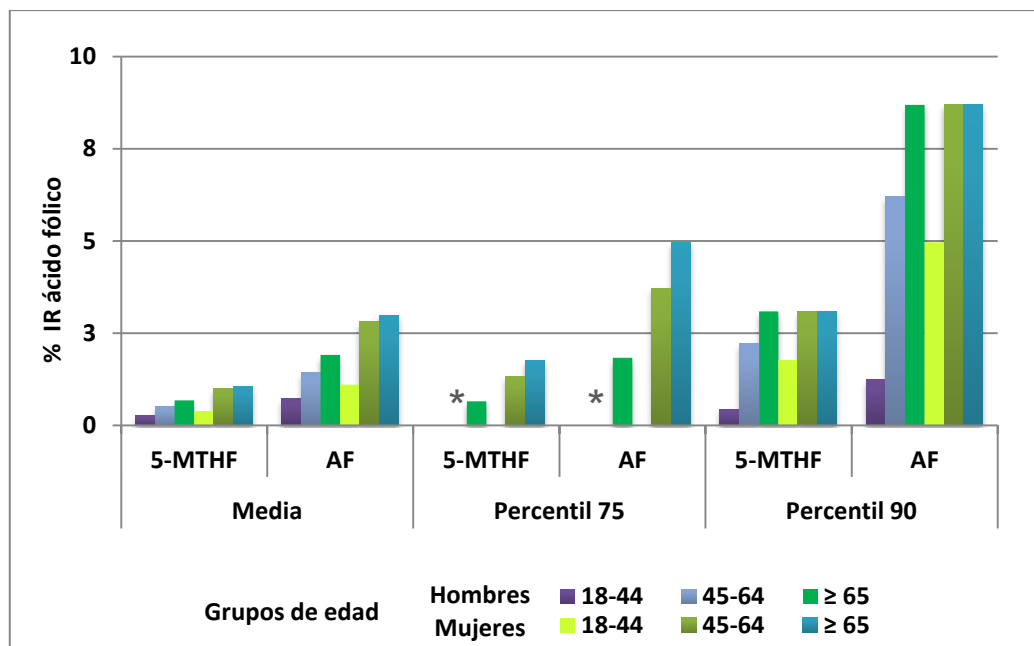
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico.

Figura 147. Leche semidesnatada, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

2. Yogures

Nivel de fortificación 1

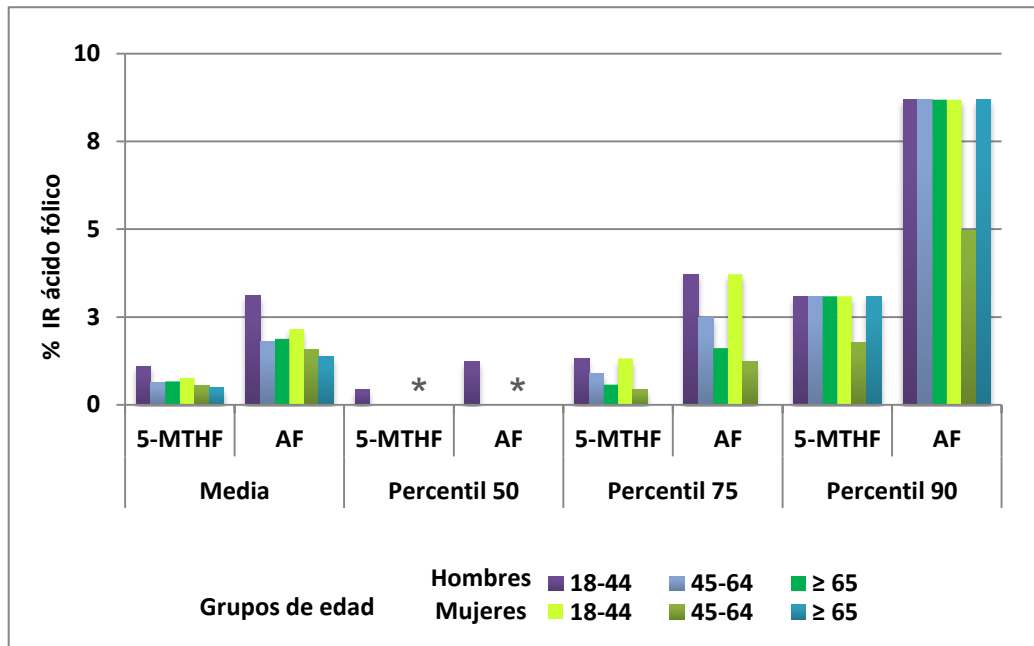
El Nivel 1 de fortificación analizado en los yogures presenta un valor medio de $27,8 \pm 0,1 \mu\text{g}$ de ácido fólico/ 100 ml. Al analizar el consumo medio de yogur desnatado se observa que es superior en las mujeres de 45 a 64 y en las mayores de 65 años, grupos en los que, si consideramos el Nivel 1 de fortificación, aportaría entre un 2,8-3% de sus IR de ácido fólico. En el P90 de consumo son las mujeres de 45 a 64 y los H-M mayores de 65 años quienes realizan el mayor consumo por lo que cubrirían un 8,7% de sus IR (**Figura 148**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 148. *Yogurt desnatado, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].*

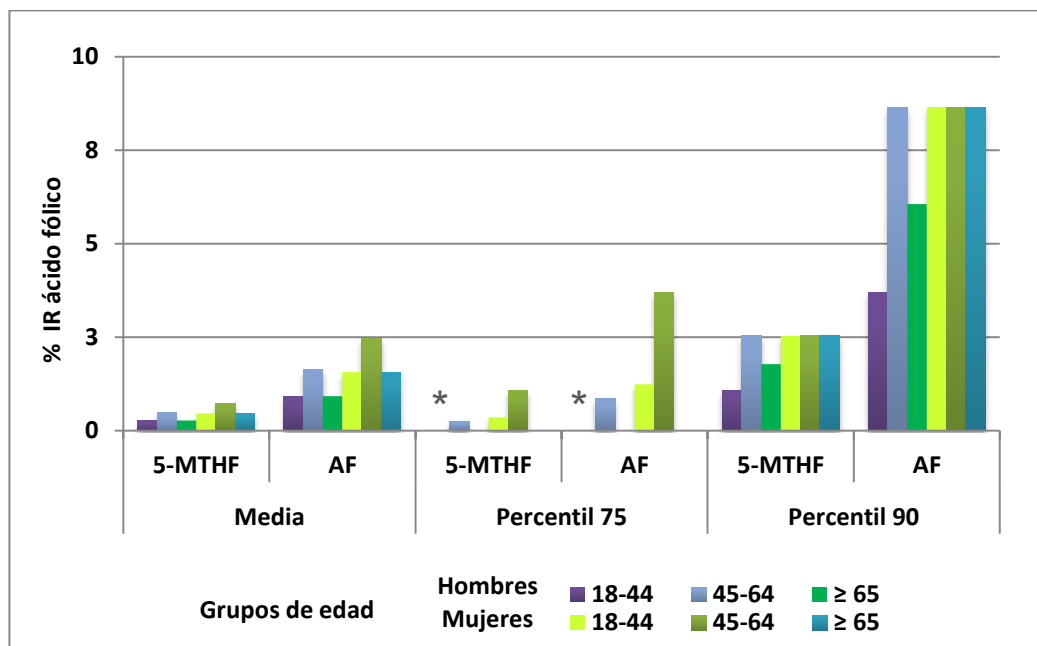
El consumo medio de *yogurt* entero es superior en los hombres entre 18 y 44 años en los cuales el aporte de ácido fólico para el Nivel 1 de fortificación, sería del 3,1% de sus IR. En el P90 de consumo, todos los grupos de edad y sexo, excepto las mujeres de 45 a 64 años, alcanzarían el 8,7% de sus IR (**Figura 149**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 149. Yogurt entero, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

El nivel de consumo medio de los yogures con Bifidus es mayor en las mujeres entre 45 y 64 años, en las que el Nivel 1 de fortificación supondría el 2,5% sus IR de ácido fólico. En el P90 de consumo las mujeres de todos los rangos de edad y los hombres de 45 a 64 años cubrirían un 8,7% de sus IR (**Figura 150**).



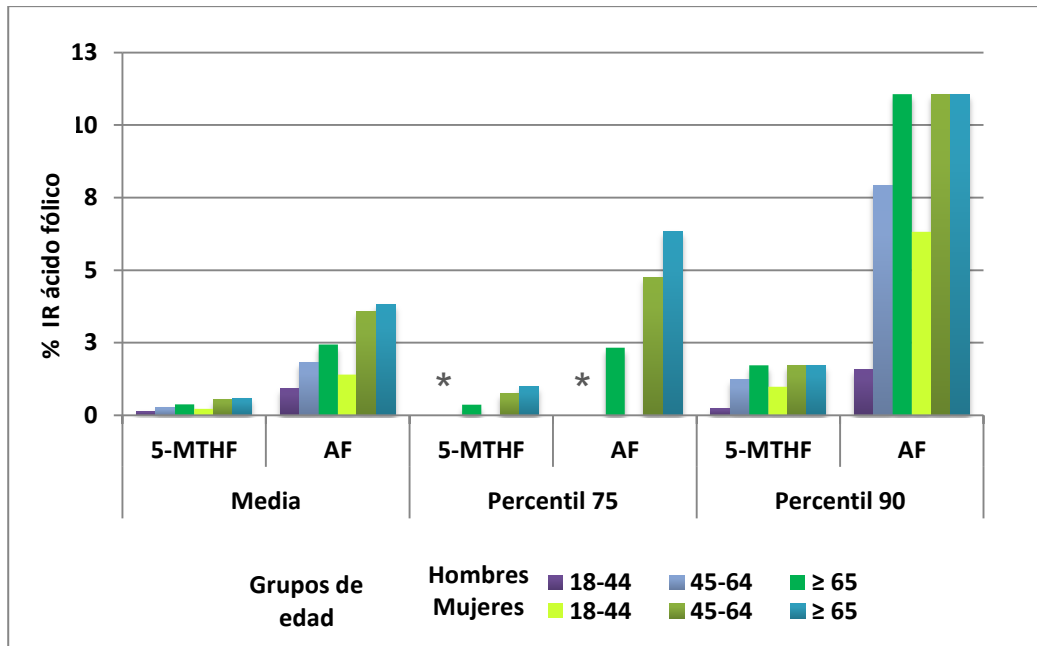
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 150. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 1 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Niveles de fortificación 2 y 3

Como ya se expuso previamente, los Niveles 2 y 3 de fortificación en los yogures son muy próximos (Nivel 2: $35,4 \pm 10,7$ μg de ácido fólico/100 ml, Nivel 3: $38,1 \pm 6,8$ μg de ácido fólico/100 ml) por lo que estudiamos sus aportes a las IR de ácido fólico en conjunto.

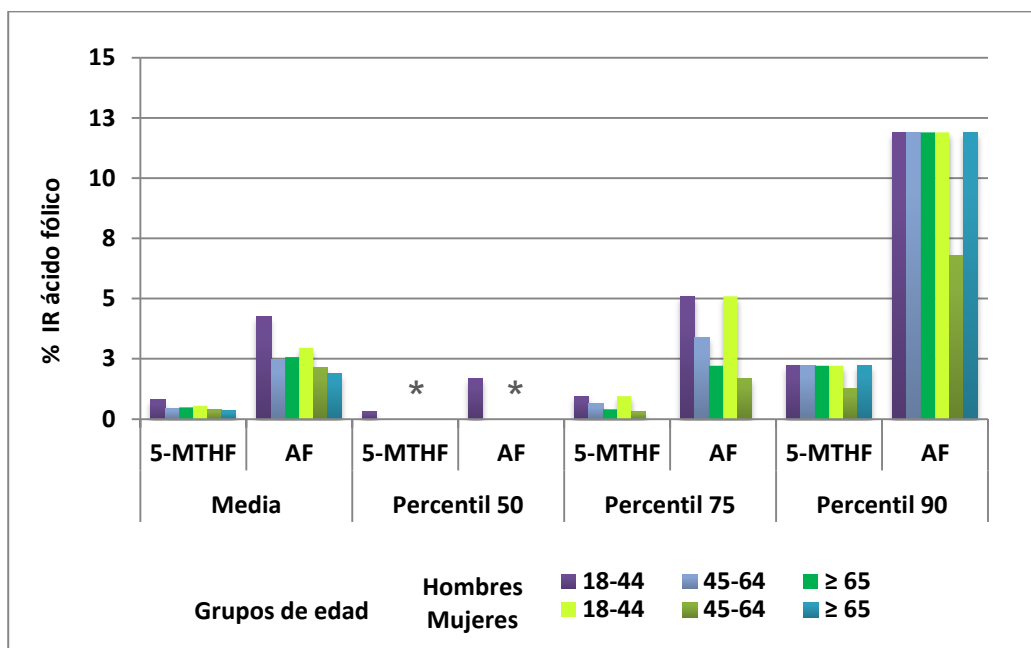
En el nivel medio de consumo de yogur desnatado las mujeres a partir de 45 y las mayores de 65 realizan un consumo más elevado que supone entre el 3,6 y el 4% de sus IR de ácido fólico. Los hombres y mujeres de entre 18 y 44 años realizan un menor consumo medio, que aportaría entre un 1 y un 1,5% de las IR de ácido fólico de ambos. Si atendemos al P90 de consumo los mayores aportes los tendrían las mujeres de 45 a 64 y las mayores de 65 y los hombres mayores de 65 años con un aporte de entre el 11,1 y el 12% de sus IR (**Figuras 151 y 154**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 151. Yogurt desnatado, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

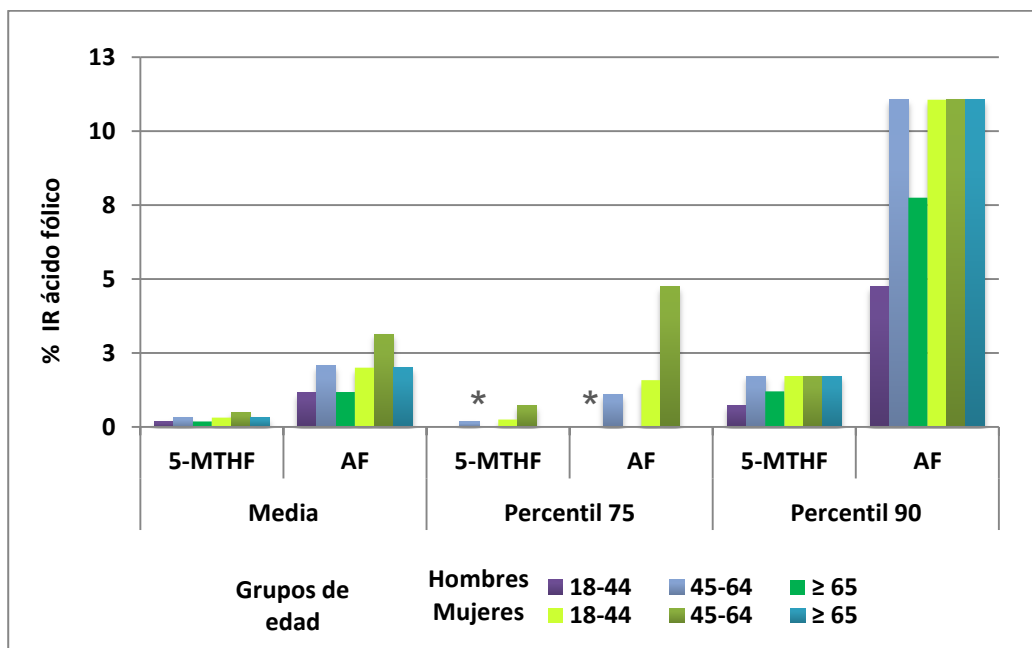
El consumo medio de *yogurt* entero es mayoritario entre los hombres de 18 a 44 años, para los cuales los Niveles 2 y 3 de fortificación aportarían entre 4-4,2% de sus IR de ácido fólico. En el P90 de consumo, el aporte sería del 12% de las IR de ácido fólico para todos los grupos de edad excepto para las mujeres entre 45 y 64 años que realizan un menor consumo de este alimento (**Figuras 152 y 155**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 152. Yogurt entero, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

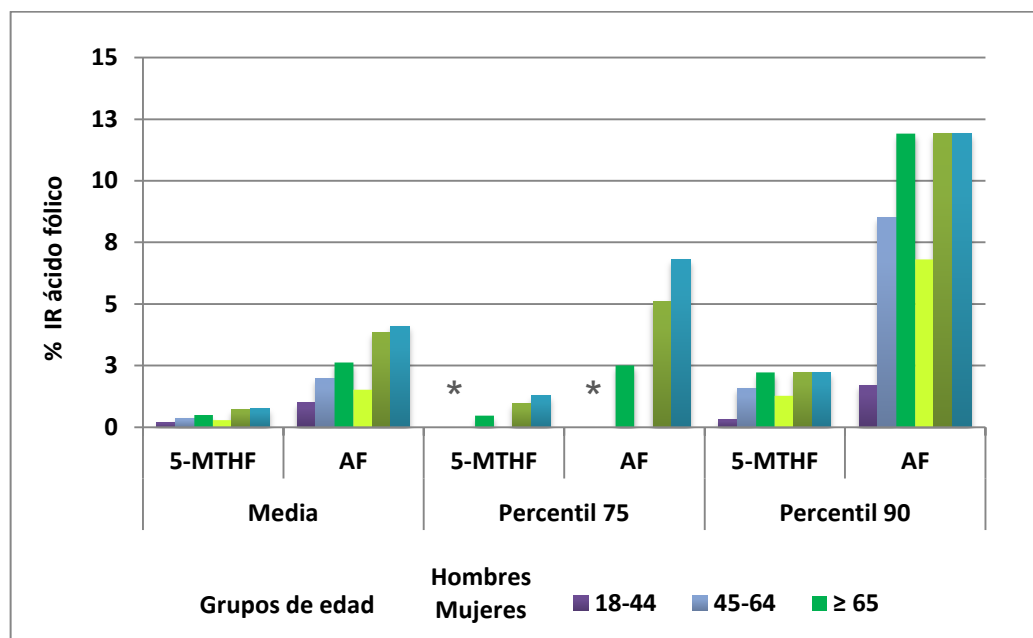
El grupo de edad de 45 a 64 años (H-M) es el que presenta un mayor consumo medio de yogures con Bífidos, a los cuales aportaría entre un 2 y un 3,4% de sus IR de ácido fólico. Si consideramos el P90 de consumo el aporte sería de entre un 11,1 al 12% de las IR de los hombres entre 45 y 64 años, y para todos los rangos de edad del grupo de las mujeres, ya que de acuerdo a los datos del estudio ENUCAM [3] realizan niveles de consumo similares (**Figuras 153 y 156**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

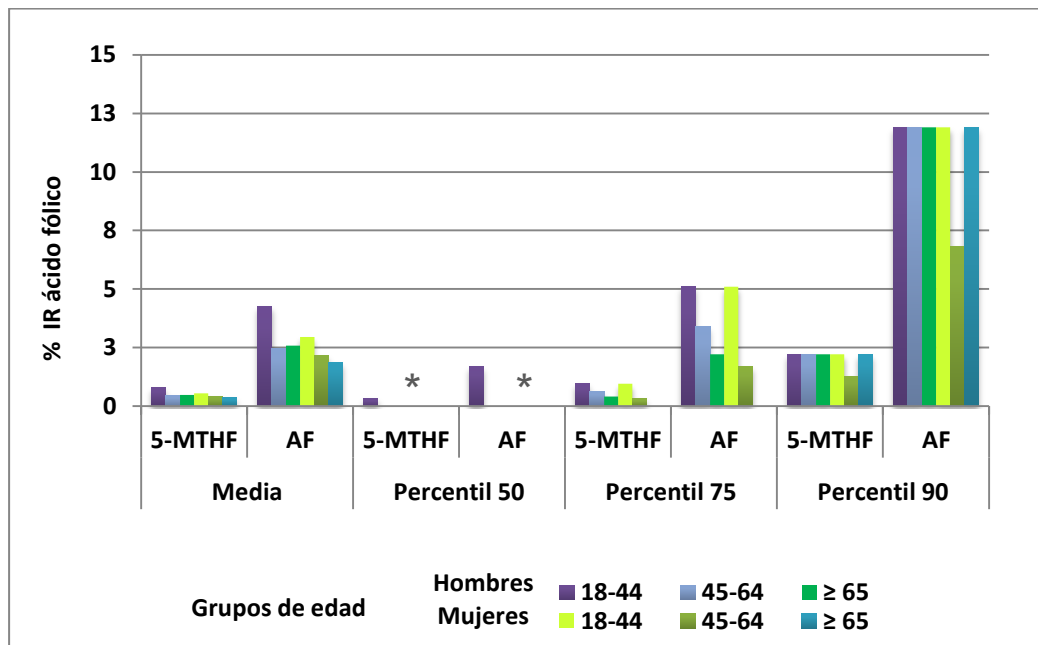
Figura 153. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 2 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 3



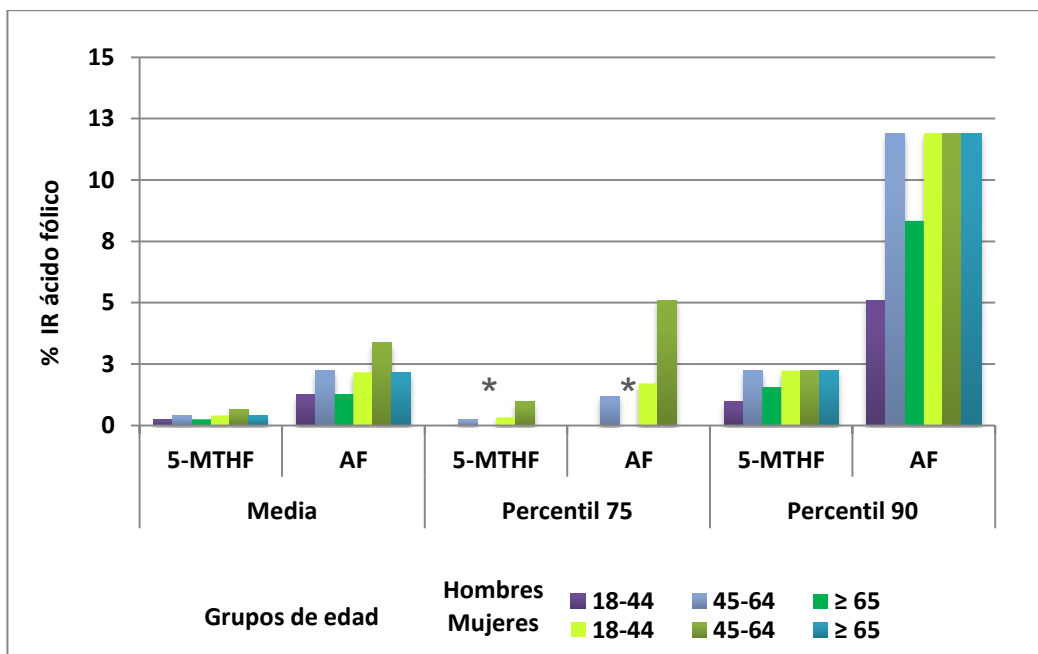
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 154. Yogurt desnatado, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 155. Yogurt entero, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].



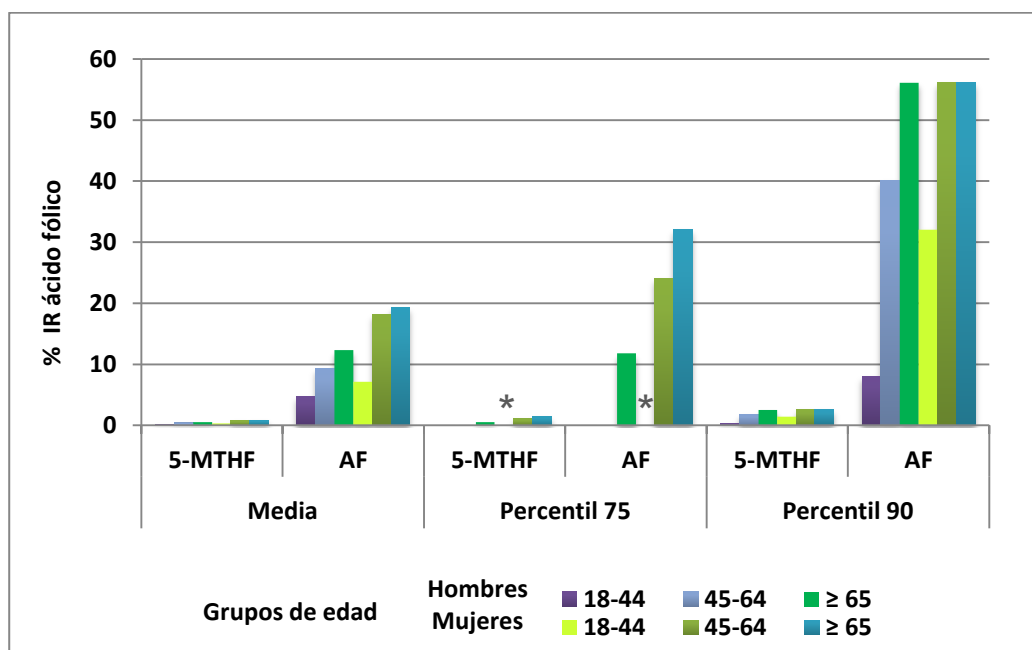
5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 156. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 3 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

Nivel de fortificación 4

Tal y como se expuso con anterioridad, el Nivel 4 de fortificación en el grupo de los yogures es bastante superior ($179,6 \pm 29,4 \mu\text{g}$ de ácido fólico/ 100 ml) por lo que sus aportes de acuerdo al consumo medio podrían alcanzar hasta un 20% de las IR de ácido fólico (en hombres entre 18 y 44 años) en el caso de los yogures más consumidos (enteros) (**Figura 158**). En el P90 de consumo las ingestas alcanzarían un aporte del 56% de las IR para todos los tipos de *yogurt* en el caso de las mujeres mayores de 65 años.

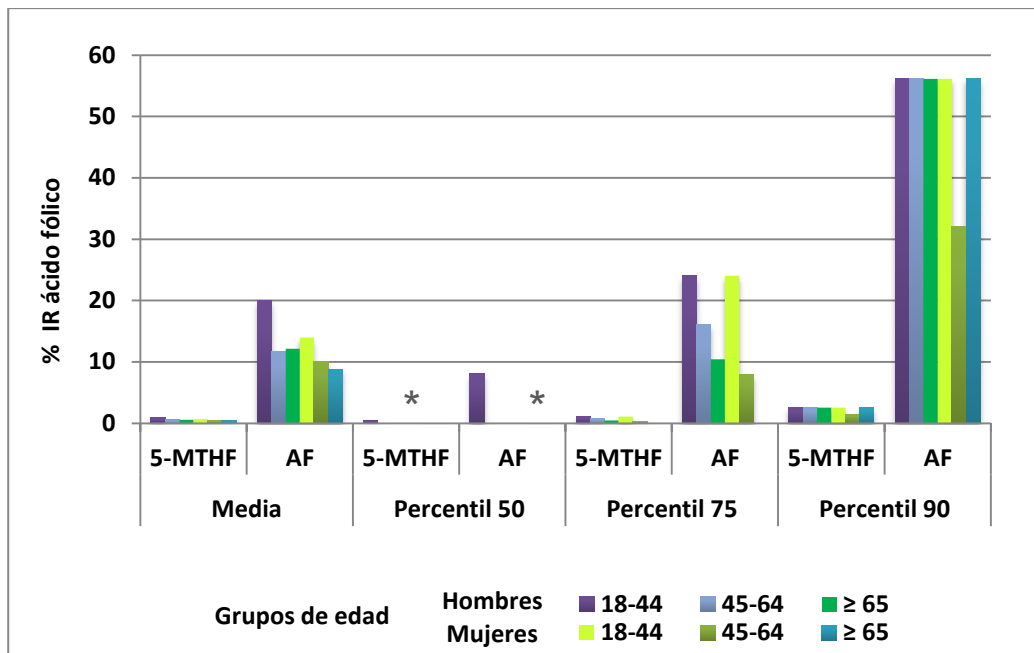
El mayor consumo medio de yogures desnatados se observa en el segmento de las mujeres mayores de 65 para las que supondría un aporte del 19,3% de sus IR de ácido fólico (**Figura 157**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

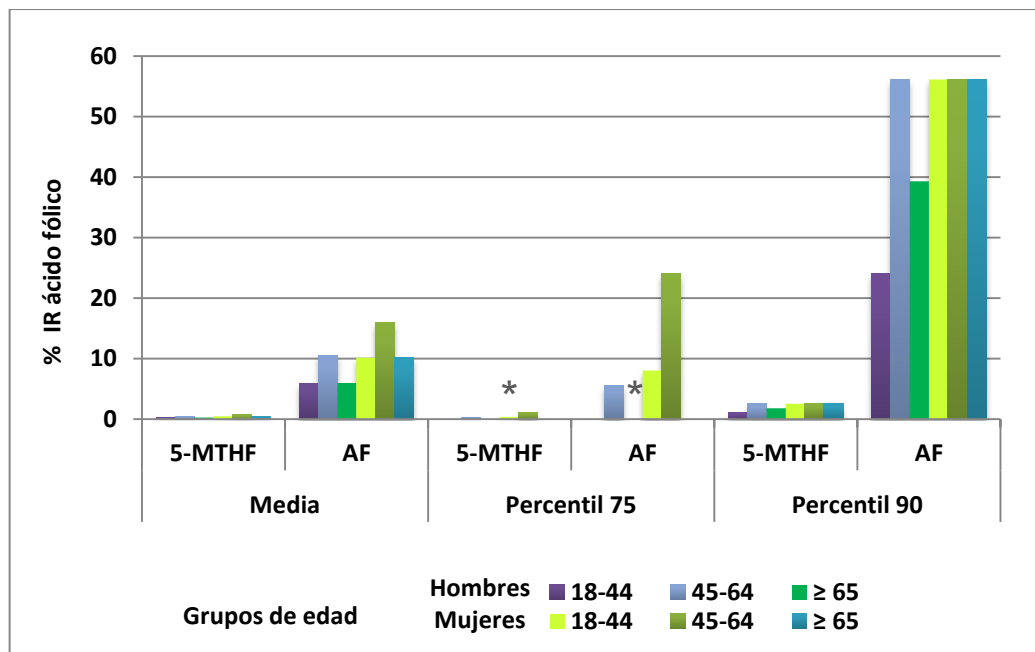
Figura 157. *Yogurt desnatado, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].*

En el caso del *yogurt* entero, el grupo de los hombres más jóvenes realiza el mayor consumo medio, aportando un 20% de sus IR de ácido fólico. Para las mujeres del mismo segmento de edad, el consumo supondría un 14% de sus IR (**Figura 158**).



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 158. Yogurt entero, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].



5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato, AF: Ácido fólico. *Datos de ingesta no disponibles en la fuente.

Figura 159. Yogurt fermentado con *Bifidus Lactobacillus spp*, Nivel 4 de fortificación, aporte de 5-metiltetrahidrofolato y ácido fólico a las Ingestas Recomendadas para adultos y personas mayores, estudio ENUCAM [3].

V. DISCUSIÓN

1. DESARROLLO, SEGUIMIENTO Y ACTUALIZACIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE ALIMENTOS FORTIFICADOS CON ÁCIDO FÓLICO

1.1. Consideraciones previas

La continua evolución de los estilos de vida en los países occidentales ha modificado decisivamente los hábitos y patrones alimentarios de la población, es decir, la forma en la que elegimos, preparamos e ingerimos los alimentos. Se habla de una alimentación donde predominan dietas de alta densidad energética y baja densidad de nutrientes, esto es, ricas en alimentos altamente calóricos pero con baja concentración de vitaminas y minerales por 1000 Kcal [27]. Todo ello se ve en parte reflejado en el aumento de la obesidad y la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas [117] como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, en las cuales se sabe que la dieta juega un papel determinante. Estos patrones dietéticos resultan en muchas ocasiones en una ingesta insuficiente de micronutrientes, componentes esenciales para el correcto funcionamiento del organismo, dando lugar a deficiencias que no son fácilmente detectadas al carecer de manifestación clínica. Nuestra alimentación se encuentra cada vez más desequilibrada y los gobiernos, profesionales de la salud y la industria alimentaria, han intentado dar respuesta a esta problemática.

Si bien en el pasado reciente las políticas de fortificación obligatoria de alimentos con vitaminas y otros nutrientes surgieron como una herramienta eficaz para disminuir graves deficiencias en la población [221], en la actualidad, en parte superada esta problemática y surgida la del desequilibrio por “exceso”, podría parecer que la fortificación voluntaria de alimentos es más bien un reclamo para la venta de productos, como han señalado recientemente algunos autores [126, 222]. Esto podría entenderse así si analizamos algunos alimentos de forma individual, tal es el caso de algunos *cereales de desayuno*, ricos en azúcares simples y sodio [223], a la par que fortificados con vitaminas y minerales. Pero dicha aproximación carece de sentido desde el punto de vista nutricional, ya que la dieta debe analizarse en su conjunto y de acuerdo a los hábitos de la población,

intentando no individualizar la adecuación o desequilibrio de un alimento o grupo de alimentos concreto. Esta cuestión plantea la siguiente dificultad: ¿Cómo evaluar el impacto nutricional de los nuevos alimentos fortificados que aparecen continuamente en el mercado, y para los cuales carecemos de datos de composición nutricional actualizados? En el presente trabajo de Tesis hemos intentado desarrollar herramientas que en un futuro se puedan utilizar para conocer las ingestas reales de ácido fólico de la población.

Hemos revisado las funciones de los folatos y el ácido fólico, ¿podrían realmente los alimentos fortificados contribuir a complementar la alimentación de distintos grupos de población sin suponer un riesgo? Para conocer los patrones alimentarios de los distintos grupos de población nos hemos basado en los datos que aportan los estudios de consumo de alimentos en distintos grupos y subgrupos de población de interés. En el presente trabajo se utilizaron los datos de consumo de las poblaciones infantil y adolescente (enKid [2]) y de la población adulta (Panel Consumo Alimentario del MAGRAMA [38], ENUCAM [3]).

1.2. Actualización del diseño y estructura de la Base de Datos

Los datos de composición de alimentos fortificados con ácido fólico son escasos y limitados en la literatura [62, 88]. Así, las Tablas de Composición de Alimentos revisadas en trabajos anteriores [12] aportan una breve recopilación de algunos de los alimentos fortificados más representativos del mercado (ej. *cereales de desayuno*). Muchos de estos datos son a su vez recogidos de otras Tablas o Bases de Datos de composición de alimentos [12], o bien del etiquetado nutricional de los productos [84, 90, 91, 224]. Esto supone un error debido a las diferencias en el mercado, las variedades de alimentos y las políticas de fortificación que aplica cada país. Sin embargo, dadas las limitaciones analíticas y económicas que supone el análisis de folatos y ácido fólico en los alimentos, no es de extrañar la recurrencia a estos métodos. Existen, además, diversos métodos

analíticos para la determinación del contenido de ácido fólico y folatos en los alimentos, y esto añade dificultad a la comparación de datos entre estudios [88].

Si la adquisición de datos de fuentes externas es una de las principales fuentes de información para la obtención del contenido en folatos en los alimentos, se sabe que una importante limitación en el intercambio de estos datos es el modo de clasificar y nombrar los alimentos. Las Tablas de Composición de Alimentos españolas [91] y Bases de Datos [89] [84] consultadas, presentan diversas clasificaciones de alimentos, en grupos y subgrupos que utilizan diversa nomenclatura. La clasificación de alimentos más utilizada es la del Código Alimentario Español [225] y es la que utilizamos en el trabajo previo presentado para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados [12]. Sin embargo, con el objeto de hacer nuestros datos disponibles y compatibles para el intercambio con otras bases de datos europeas fue necesario adaptar y unificar nuestros criterios a los estándares europeos de la *Red de Excelencia Europea EuroFIR*, a la que pertenece la *Base de Datos Española de Composición de Alimentos* (Red BEDCA) [89] y que supone la estandarización y recopilación de datos de composición de alimentos españoles [167]. Dicha Base de Datos ha sido coordinada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) dependiente del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y que a su vez, se encuentra incorporada a otras Bases de Datos Europeas mediante la plataforma unificada online elaborada por la Asociación EuroFIR AISBL [226].

Para la estandarización de la nomenclatura de clasificación en grupos de alimentos utilizamos el tesoro LanguaL 2009 [169], el cual está ya ampliamente implantado en bases de datos de alimentos en Europa y a nivel internacional. En él se incluye la denominación concreta de los distintos grupos, subgrupos y categorías de alimentos, con descripciones detalladas de los mismos y una codificación que permite dicha estandarización, esencial para la comparabilidad entre estudios y el intercambio de información [167].

Un ejemplo de nuestro estudio que ilustra los posibles conflictos en la clasificación de alimentos son los que se clasifican dentro del segmento de *“alimentos para usos nutricionales especiales”*, ya que éste engloba alimentos que a su vez son *“cereales y derivados”* o *“lácteos y derivados”*, pero que al poseer una legislación específica para su comercialización, ésta hace que la primera denominación prevalezca independientemente de la matriz alimentaria que lo componga [173] [175]. Mediante LanguaL, a cada grupo, subgrupo y/o característica propia de un alimento (deshidratado, fortificado, etc.) se asigna un código individual que describe dicha característica y evita una clasificación errónea [169].

Bouckaert y cols. [88] revisaron y evaluaron en el año 2010 los datos de folatos y ácido fólico disponibles en bases de datos europeas e internacionales, encontrando, además, una gran discrepancia en la denominación de los distintos vitámeros, otra cuestión de gran importancia, ya que deberían diferenciarse los folatos naturales del ácido fólico añadido a los alimentos fortificados. Pero es esto justamente lo que presenta una mayor dificultad ya que el método de análisis considerado de referencia, que se basa en un ensayo microbiológico, cuantifica los folatos totales contenidos el alimento [11, 100]. En las Tablas de Composición revisadas en nuestro trabajo, la denominación utilizada para el contenido de vitamina B₉ o folatos en los alimentos es *“ácido fólico”* independientemente de que se trate del vitámero sintético o de los folatos naturales [91], con lo cual se dificulta la diferenciación de los mismos. Al mismo tiempo, las denominaciones encontradas en el etiquetado nutricional de los alimentos fortificados con ácido fólico inventariados en este trabajo fueron variables en función del producto, encontrándose en el etiquetado como B₉, folacina, ácido fólico, variabilidad que también observamos en nuestro estudio previo [51]. Para la armonización de nuestros datos analíticos de composición en folatos y ácido fólico, utilizamos el Tesoro EuroFIR [180], diferenciando el folato natural del vitámero sintético, e incluyendo también los datos de folato total, antes mencionados.

1.3. Inventario de alimentos fortificados con ácido fólico

El inventario de alimentos fortificados con ácido fólico se realizó a lo largo de un período de 30 meses, durante los cuales se visitaron un total de ocho establecimientos comerciales diferentes, centrándonos en las grandes superficies y los supermercados. De acuerdo con los Informes del *Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria* del MAGRAMA [183, 184, 227] son las grandes superficies o hipermercados y los supermercados de barrio donde el consumidor español prefiere realizar la compra. En las visitas realizadas para el estudio, observamos que en los primeros, la variedad de marcas y productos, así como la disponibilidad de productos recién lanzados al mercado es superior, facilitando la recopilación de los alimentos comercializados. Según informes del MAGRAMA, cobran importancia en la distribución las tiendas regentadas por inmigrantes y las máquinas de *vending*, si bien decidimos no incluirlas por su elevada variabilidad en cuanto a tamaño y distribución geográfica y baja disponibilidad de variedad de productos.

La información disponible en internet, en las páginas web de las marcas del fabricante o del distribuidor, o en las páginas de venta *on-line* de los principales establecimientos, fue recopilada mensualmente mediante el acceso a las páginas inventariadas en la Base de Datos. Observamos para la mayoría de casos que esta información resultó incompleta, al no presentar el listado de ingredientes del producto o el etiquetado nutricional (contenido de ácido fólico por 100 g), datos esenciales para completar nuestro inventario. Su utilidad, por tanto, se limitó al acceso de información de lanzamiento de nuevos productos susceptibles de presentar fortificación con ácido fólico, que posteriormente fueron identificados *in situ* en los establecimientos de venta, al tener acceso a la lista de ingredientes del etiquetado. Un estudio del MAGRAMA apunta a que casi un 8% de los consumidores utiliza internet como canal de compra, y que su uso va en aumento [184]; por tanto, cabe apuntar que la información del etiquetado nutricional que un consumidor sería capaz de conocer por este medio es muy limitada.

1.4. Grupos de alimentos y nivel de fortificación con ácido fólico declarado

El grupo de alimentos fortificados con ácido fólico más numeroso del inventario fue el de los *cereales y derivados* (46% del total de productos) cuyo subgrupo, *cereales de desayuno*, fue a su vez el mayoritario con un 57% del total, seguido por las *galletas, pasteles y tostadas* (30%). Los *productos para usos nutricionales especiales* y la *leche, derivados y sustitutos de la leche* que ocuparon el segundo y tercer lugar (25 y 21% del total de productos, respectivamente), en conjunto representaron el mismo porcentaje que los *cereales y derivados*. Esta distribución es similar a la encontrada en estudios provenientes de otros países europeos como Reino Unido [42], Irlanda [41] y Holanda [62], y parece ser indicativa de una cierta homogeneidad en las prácticas de fortificación voluntaria con ácido fólico en alimentos, independiente de los hábitos dietéticos propios de cada país. En la actualidad, la globalización en la disponibilidad de alimentos hace que productos como los *cereales de desayuno* que hasta hace 20 años eran casi desconocidos en nuestro entorno, y más bien un producto de origen anglosajón, vayan ganando terreno de forma considerable en nuestros hábitos alimentarios [228]. Si bien el consumo aún se mantiene por debajo de la media europea, el incremento registrado en los datos de consumo y ventas es significativo [228].

En el presente trabajo, observamos que el Nivel de fortificación con ácido fólico de los alimentos inventariados, que definimos como el porcentaje de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de ácido fólico por ración declarada [186], se encuentra en su mayoría (75% de los alimentos) en valores inferiores al 35% de la CDR por ración. Encontramos que el mayor número de productos fortificados inventariados (n=94) suponen el 30% de la CDR/ración, de acuerdo con lo declarado por el fabricante.

Hay que tener en cuenta que en la legislación [170, 186] se establece que una *cantidad significativa* corresponde al 15% de la CDR de ácido fólico por 100 g, 100 ml o por envase, si este contiene una única porción. Pero habría que analizar desde el punto de vista nutricional si realmente son o no cantidades *significativas* teniendo en cuenta las raciones habituales de consumo de esos alimentos. Además, hay que considerar que el valor de la CDR, de 200 µg en el caso del ácido fólico [170] es orientativo ya que no se corresponde con las Ingestas Recomendadas en España para los adultos (400 µg) [138]. Sin embargo, es el valor de referencia legal utilizado en el etiquetado nutricional de los alimentos a modo de guía de las cantidades de micronutrientes que aporta, por tanto, lo consideramos adecuado para segmentar los alimentos inventariados en la Base de Datos.

Los *cereales y derivados*, grupo mayoritario inventariado, presentan una mayor proporción de alimentos fortificados con el Nivel 2 (34% del total), es decir unos 33,1-51 µg de ácido fólico por ración recomendada por el fabricante (98% de estos alimentos presenta valores medios entre 91 y 197 µg/100 g). Los *cereales de desayuno* son el subgrupo mayoritario (57%). Si comparamos estos valores con otros publicados, encontramos que en la Base de Datos “on-line” de la Red BEDCA [89], se incluyen dos productos de este grupo: *cereales de desayuno* ricos en fibra y arroz inflado, con contenidos entre 250 y 300 µg/100 g, si bien se indica con la denominación de “folato total” y no ácido fólico. El resto de *cereales de desayuno* que incluye esta Base de Datos no presenta valores de vitamina B₉ en ninguna de sus posibles denominaciones. En los EE UU, la Base de Datos de composición de alimentos del Departamento de Agricultura (USDA, siglas del inglés, *United States Department of Agriculture*) [84] presenta, para *cereales de desayuno*, cuya fortificación es voluntaria, valores que van desde 130 µg/100 g (NDB 08531) hasta 1167 µg/100 g (NDB 08590) [84], si bien no se presentan datos de raciones recomendadas por el fabricante.

El 38% de los *productos para usos nutricionales especiales* contienen menos de 33 μg de ácido fólico por ración (Nivel 1). Representan el segundo grupo en importancia, y se caracterizan por ser un grupo bastante heterogéneo en cuanto a los subgrupos de alimentos, ya que engloba: *alimentos para reducción de peso* ($119,2 \pm 96,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), *fórmulas infantiles y de continuación* ($25,2 \pm 15,2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) y *complementos dietéticos* ($1833 \pm 1490 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), siendo los dos primeros mayoritarios. La Base de Datos de la Red BEDCA [89] carece, en la actualidad, de datos de este grupo de alimentos.

El grupo de *leche y derivados* presenta de forma mayoritaria productos fortificados con los Niveles 3 y 4 (38% del total para cada Nivel) lo cual supone que más del 75% de estos alimentos aportaría $\geq 51,1 \mu\text{g}$ de ácido fólico por ración (200 ml en el caso de la *leche* y 125 ml para el *yogurt*). La Base de Datos de la Red BEDCA [89] incluye dentro de este grupo el contenido en folato total de quesos, *leche* y *yogures*. En la *leche* (semidesnatada) y los *yogures* (desnatados, con trozos de fruta), el contenido en folato total es de 5 y 3,9 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, respectivamente. Estos valores dan una idea de que se trata del contenido en folatos naturales, y no se incluyen por tanto datos de *lácteos* fortificados con los que comparar los datos de nuestra Base de Datos.

De forma similar al grupo anterior, el grupo de las *bebidas (no lácteas)* tiene una mayor proporción de productos perteneciente a los Niveles 3 y 4 de fortificación (40 y 35% del total del grupo, respectivamente). Los *zumos y néctares* son el subgrupo principal, declarando un contenido medio de $38,7 \pm 22,4 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, lo cual supone aproximadamente unos 76 μg de ácido fólico por ración media declarada (200 ml). En la Base de Datos de la Red BEDCA encontramos zumo de lima envasado, con un contenido de 8 μg de ácido fólico/100 ml, zumo de pomelo envasado, con 7 μg de ácido fólico/100 ml y néctares de frutas (exóticas, maracuyá) envasados con un contenido de 5 μg de ácido fólico/100 ml [89]; todos ellos no especifican estar fortificados, por lo que asumimos que se trata del contenido en folatos naturales.

Dentro del grupo de *grasas y aceites*, las *margarinas* y las *grasas vegetales* que es minoritario al conformarlo únicamente seis productos de nuestro inventario, están fortificadas en mayor proporción (83%) en el Nivel 4 ($\geq 70,1$ μg de ácido fólico por ración) siendo de esta manera el grupo de alimentos que aporta un mayor contenido de ácido fólico por ración recomendada por el fabricante en el etiquetado nutricional (15 g); concretamente, estos alimentos declaran aportar entre 75 y 150 μg de ácido fólico por ración (500-1000 $\mu\text{g}/100$ g). Un aporte significativo si consideramos que este tipo de alimentos carece de forma natural de folatos [91]. En la Base de Datos de alimentos española BEDCA no se recogen datos de folatos para este grupo [89].

En el Informe del Comité Científico Asesor en Nutrición (SACN) de la Agencia de Estándares Alimentarios del Reino Unido [42] se señala que hasta un 20% del mercado de las grasas vegetales untadas está compuesto por productos fortificados con ácido fólico, todos de una misma marca comercial, a un nivel de 1000 $\mu\text{g}/100$ g, y que además pueden presentar hasta un 20% de sobrefortificación [42]. En España observamos la misma característica, ya que una sola marca monopoliza los productos *margarinas* y las *grasas vegetales* con ácido fólico añadido. Cabe destacar que en la actualidad hemos observado una reducción en los niveles de ácido fólico declarados en estos productos, los cuales han sufrido una reformulación por la cual productos inventariados que inicialmente contenían 1000 $\mu\text{g}/100$ g ahora contienen la mitad.

En el mercado español encontramos alimentos fortificados a los que se añaden otras vitaminas, minerales y nutrientes conjuntamente al ácido fólico. En nuestro estudio nos centramos en estudiar la fortificación conjunta de las vitaminas metabólicamente relacionadas con el ácido fólico, las vitaminas B₆ y B₁₂, a modo de ejemplo para conocer si existe un equilibrio en las cantidades de fortificación establecidas por el fabricante o bien un determinado patrón en función al grupo/ subgrupo de alimentos. De acuerdo con nuestros resultados, el 86,4% de los alimentos fortificados con ácido fólico declaran una fortificación

conjunta con las vitaminas B₆ y B₁₂. Según los datos del etiquetado nutricional, estos productos aportan el 15% de las Cantidades Diarias Recomendadas (CDR) por 100 g o ml [172] para las tres vitaminas, exceptuando las *Fórmulas infantiles* que, como ya se expuso, tienen una legislación independiente. Dentro del grupo de la *leche y derivados*, el subgrupo de la *leche*, los *yogures y leches fermentadas* y los *preparados lácteos* contienen <15% CDR de vitamina B₁₂. Aquí debería por tanto considerarse el porcentaje de la CDR por envase, que también se contempla en la legislación [172] y que depende del tipo de producto. En este sentido, los alimentos de los subgrupos nombrados se consumen en algunos casos en envases individuales de 125 ml (*yogures y leches fermentadas*), pero el subgrupo de la *leche (líquida)* se presenta en envases de 1L y únicamente con las raciones recomendadas por el fabricante (que son de 200-250 ml), alcanzarían el 15% de la CDR establecido. Por otro lado, los niveles de fortificación expresados como porcentaje de las CDR para cada una de las tres vitaminas difieren, observándose distintos patrones en función al grupo y subgrupo de alimentos. No hemos encontrado en la literatura estudios que analicen la fortificación conjunta a la adición de ácido fólico en productos fortificados; sin embargo, autores como Kim [126], Finglas [59] y Selhub [229] han resaltado en sus trabajos la necesidad de una fortificación conjunta de los alimentos en el caso del ácido fólico y la vitamina B₁₂ en los países donde la fortificación con ácido fólico es obligatoria. Asimismo es importante que la fortificación voluntaria ofrezca un equilibrio entre las vitaminas que aportan los alimentos fortificados, ya que el consumo de éstos supone ingestas de ciertos nutrientes, muy superiores a las que podríamos obtener mediante los alimentos sin fortificar.

Parece claro que los alimentos que se eligen para la fortificación presentan las características de ser consumo diario y/o básico (*leche y galletas*) a la vez que listos para el consumo. En los países donde se aplica la fortificación de forma obligatoria es esencial encontrar aquel vehículo que sea consumido de forma suficiente por la población diana (mujeres en edad fértil); sin embargo, en el caso de los alimentos comercializados en España el mayor número de productos

fortificados forman parte del consumo habitual de los niños y adolescentes, pero no debemos olvidar que existen otros grupos como los *lácteos y derivados*, muy consumidos por las mujeres en edad fértil y que cuenta con una importante variedad en el mercado.

1.5. Estudio de los grupos de alimentos y los niveles de fortificación con ácido fólico de acuerdo a los tipos de marcas comerciales

En los últimos años, en España han cobrado importancia las marcas del distribuidor, comúnmente denominadas “marcas blancas”. Hasta un 19,4% de los productos fortificados con ácido fólico inventariados en la Base de Datos pertenecen a esta categoría (74/375). Si bien este trabajo no pretende un análisis de tendencias de consumo, interesa conocer brevemente con qué frecuencia el consumidor las adquiere o bien cuál es la situación de estos productos de acuerdo a los últimos datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) que se ocupa del estudio de las variables cualitativas y cuantitativas de los hábitos de consumo y distribución de los productos alimentarios (Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria [183, 184, 227]). La evolución entre 2004 y 2010 ha ido en aumento y nos indica que el consumidor que adquiriría al menos un producto de marca de distribución o propia del establecimiento ha pasado de ser del 73% en 2004 al 91,8% en 2010 [227]. En la actualidad, las marcas del distribuidor tienen un gran peso en la cesta de la compra: únicamente un 8,5% de los consumidores encuestados manifestaba no adquirir nunca un producto de marcas de distribución. Las marcas de distribución se valoran muy positivamente en cuanto a calidad y etiquetado (7,2 y 6,9 sobre 10 respectivamente) pero, sobre todo, en cuanto a precio (1,5 puntos por encima de las marcas del fabricante). La calidad (7,9) y etiquetado (7,7) de las marcas de fabricante, se valora más positivamente que la de las marcas del distribuidor [184]. Hay que tener en cuenta igualmente, que los productos fortificados en general cuestan unas cuatro veces más que los productos equivalentes no fortificados; pero dentro del grupo de los fortificados los provenientes de marcas del fabricante son más caros que los de marcas de distribución. Las diferencias en precio pueden también explicar el aumento en el consumo de estas marcas

durante los últimos 5 años, según datos del informe del Ministerio. El precio y la conveniencia, si bien constituyen factores esenciales en la elección de los alimentos en la cesta de la compra, no son los únicos. Sin embargo, de acuerdo al Panel de Consumo del MAGRAMA, también la “salud” es un importante factor que rige el consumo en España. Así, más de un 25% de los consumidores encuestados manifestaron elegir alimentos que identificasen como “saludables/sanos” [230].

Al analizar nuestros resultados, hemos observado que los grupos de alimentos susceptibles de fortificación con ácido fólico son similares entre los tipos de marcas, es decir, en ambas se fortifican principalmente *cereales y derivados* y *leches y derivados*. Por otro lado, los niveles de fortificación declarados por las marcas del distribuidor presentan una mayor proporción de productos fortificados en el Nivel 3, lo cual supone entre el 26 – 34,9 % de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) por ración de alimento (51,1-70 µg de ácido fólico), independientemente del grupo de alimentos al que nos estemos refiriendo.

En el grupo de los *cereales y derivados* comercializados bajo marcas de distribución (MDD), la proporción de productos que declaraba un contenido en ácido fólico equivalente al Nivel 1 de fortificación fue del 3% frente al 35% declarado por las marcas del fabricante. La proporción del Nivel 3 declarada por las MDD es del 53% de productos frente al 11% de las marcas de fabricante (MDF). Estas claras diferencias hacen que, en total, la proporción de productos fortificados con ácido fólico dentro del grupo de los *cereales y derivados* de las MDD presente mayores niveles de fortificación, ya que $\geq 60\%$ de los productos tienen Nivel 3 y 4 de fortificación (en las MDF se observó la mitad, 32%). Esto no tiene una explicación evidente a primera vista, pero si segmentamos los subgrupos de productos que entran en la clasificación de *cereales y derivados* en cada tipo de marca, encontramos que en la MDD la totalidad de productos son *cereales para desayuno*, mientras que en las MDF hay además *galletas*, bollería industrial, barritas de cereales, etc., todos ellos de menor Nivel de fortificación declarado.

Si analizamos el grupo de *leche y derivados*, las diferencias entre las MDD y MDF se acrecientan, ya que las primeras sólo declaran dos niveles de fortificación, que son, por otro lado, los más altos (Nivel 3 y 4). Sin embargo, también es elevada la proporción de los productos de las MDF que declaran estos niveles, siendo en conjunto un 70% de los *lácteos y derivados* comercializados bajo MDF. Cuando hablamos de MDD, la mayoría de productos dentro de este grupo de alimentos son la *leche (líquida)* y los *batidos de sabores* (10/14, 71,4%); y si nos referimos a las marcas del fabricante, la *leche (líquida)* y los *yogures y leches fermentadas* son los subgrupos más numerosos, en conjunto, el 70% del total del grupo (23/64, 36% y 22/64, 34% respectivamente). Todos estos datos parecen indicar que ya sean lácteos comercializados bajo marca del distribuidor o del fabricante, la mayor parte de estos productos presenta una concentración declarada de ácido fólico $>51 \mu\text{g}$ por ración, siendo los alimentos que mayor cantidad de ácido fólico añadido proporcionan. Achón y cols. [231] estudiaron la biodisponibilidad del ácido fólico añadido en *leches* fortificadas: en su estudio se cuestiona el papel de las *leches* como vehículo adecuado de fortificación para el ácido fólico. Los autores encontraron que la absorción del ácido fólico en individuos sanos ($n=5$), era más rápida a partir de la ingesta de *leche* desnatada y que se obtenían valores de folato en plasma significativamente superiores tras 6,5 horas de la ingesta frente a la *leche* entera fortificada.

Los cuatro Niveles de fortificación con ácido fólico que definimos, si bien nos han sido de utilidad en este estudio para agrupar y analizar nuestros datos, no son adecuados para la comparación con otros estudios o Tablas de Composición de alimentos, donde los valores de ácido fólico se expresan generalmente por 100 g o ml. Por ello, fue también necesario agrupar la información por grupos y subgrupos de alimentos de acuerdo a ese criterio. Así, dentro del grupo de *leche y derivados*, la *leche (líquida)* presentó como media (\pm desviación estándar) $34,8 \pm 14,4 \mu\text{g}$ de ácido fólico /100 ml y los *yogures y leches fermentadas* una media de $71,8 \pm 100 \mu\text{g}$ de ácido fólico/100 ml, ambos declarados por el fabricante. En el grupo de los *yogures* se identificó una mayor variación en el contenido en ácido fólico entre los

diferentes productos, la cual parece ser debida justamente a la gran variedad de yogures incluida en el inventario.

El caso de los *productos para usos nutricionales especiales* es singular debido a que dada la legislación que los define, se incluyen por un lado los *complementos dietéticos* y los *alimentos para reducción de peso* que al ser en muchos casos sustitutivos parciales o completos de la dieta diaria, deben aportar desde el 30 hasta el 100% de la CDR de ácido fólico, respectivamente (60 hasta 200 µg de ácido fólico) [173]. Y además, engloba las *fórmulas infantiles y de continuación*, las cuales deben estar necesariamente fortificadas a un nivel inferior a 50 µg de ácido fólico/100 kcal por legislación [175], lo que presenta una dificultad añadida por las conversiones necesarias a 100 g o por ración dependiendo de la composición de los productos de este subgrupo. De acuerdo al etiquetado de los productos inventariados, la cantidad media de ácido fólico es de $25,2 \pm 15,2$ µg de ácido fólico/ 100 g, que, teniendo en cuenta el contenido energético y la cantidad recomendada para la preparación de estos productos, equivale a entre 5 y 30 µg de ácido fólico /100 kcal. Aquí aplicar el porcentaje de la CDR no tendría sentido ya que estamos hablando del grupo de población de menor edad en cuanto a requerimientos de la vitamina (entre 40 y 100 µg de ácido fólico [23]). De esta forma, este subgrupo de alimentos estaría incluido en el Nivel 1 de fortificación, razón por la cual observamos tanta discrepancia en los resultados cuando comparamos los niveles de fortificación en las marcas de distribución frente a las del fabricante. No se encontraron en el mercado alimentos pertenecientes al subgrupo de *fórmulas infantiles y de continuación* comercializados bajo marca de distribución; así el porcentaje de productos de Nivel 1 de marcas de distribución es del 18% frente al 42% observado en las marcas del fabricante (que comercializa el total de las *fórmulas infantiles* inventariadas).

El grupo de las *bebidas (no lácteas)* presenta también diferencias en las proporciones de los niveles de fortificación con ácido fólico: las marcas del fabricante comercializan hasta un 44% de sus productos fortificados con el Nivel 4, mientras que las marcas de distribución carecen de alimentos en este Nivel. Para

el subgrupo de *zumos y néctares*, el contenido medio es de $38,7 \pm 22,4$ μg de ácido fólico/100 g y para el *café y cacao* es de $476,6 \pm 413$ μg de ácido fólico/100 g. Debemos relativizar estos datos debido al menor número de alimentos dentro de este grupo ($n=20$, 5,3% de la Base de Datos). Como ya señalamos, no podemos comparar estos resultados dada la ausencia de estudios a nivel nacional o europeo.

1.6. Grupos de población diana para los alimentos fortificados con ácido fólico

En la actualidad, la mujer en edad fértil representa la población diana *por excelencia* para la fortificación de alimentos con ácido fólico, con el objetivo de prevenir los DTN. En nuestro estudio, hemos encontrado que los productos orientados de forma exclusiva a las mujeres que desean quedarse embarazadas y a las madres, son más bien austeros en técnicas de marketing y de diferenciación de producto. Los productos comercializados son escasos: un 2% de nuestra Base de Datos, siendo en su mayoría *leche y derivados*. Utilizan por lo general la denominación “*mujer*” o “*mamá*” junto al nombre del producto. Se trata del grupo de población que más podría beneficiarse del consumo de los alimentos fortificados en ácido fólico ya que de acuerdo con la evaluación de la dieta de los españoles a través del Panel de Consumo, las mujeres entre 20 y 39 años únicamente alcanzan el 58% de las IR de ácido fólico [38]. En la misma línea los datos procedentes del estudio ENUCAM, realizado en la Comunidad de Madrid, indican que las mujeres en edad fértil presentan deficiencia en la ingesta de folatos a través de la dieta [3].

Es importante también subrayar que la mayor proporción de los productos fortificados carece de población diana de consumo en el marketing o las alegaciones del envase. Hemos constatado mediante el análisis del envase y etiquetado de los alimentos fortificados con ácido fólico comercializados, que el 43,5% de los mismos no indica población diana para su consumo. Además, la mayor parte de estos productos pertenecían al grupo de *cereales y derivados*. Por

tanto, y de forma potencial, cualquier población es susceptible de consumir estos alimentos. El que un producto vaya enfocado a un grupo diana ha sido descrito como una estrategia eficaz de marketing, dado que el consumidor se ve identificado con las necesidades que señala cubrir dicho producto [232]. Lógicamente, también tiene un interés nutricional, pero podría parecer que se fortifica con fines comerciales, no nutricionales.

El segundo grupo diana mayoritario son los *productos para control de peso*, formulados como bajos en energía y de alta densidad nutricional (altos en vitaminas y minerales), ya que muchos son *sustitutos de comidas* (barritas, sopas, batidos). Dentro de esta segmentación, el grupo de alimentos mayoritario de la Base de Datos es el de *productos para usos nutricionales especiales*, seguido por las *leches y derivados*. La población susceptible de su consumo son mujeres y hombres de mediana edad o adultos que desean controlar el peso corporal. De acuerdo con los datos de un estudio de mercado elaborado por AC Nielsen [233], el peso corporal es una de las preocupaciones de salud de mayor importancia para los consumidores en Europa y España a la hora de elegir productos novedosos. La obesidad como *“variable de segmentación de consumidores”* no es de extrañar ya que los últimos datos apuntan a que un 14% de la población española adulta entre 25 y 60 años padece obesidad y un 38% sobrepeso (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad), patrón que se repite de forma similar entre la población infantil, donde el 45% de la población presenta exceso de peso (26% sobrepeso y 19% obesidad), con mayor prevalencia de obesidad en los varones que en las niñas (Estudio Aladino,[234]). Los productos para cuidado del peso corporal utilizan también un marketing que combina declaraciones nutricionales tipo *“bajo en”, “sin”* o *“0% materia grasa”*, con envases de conveniencia en raciones individuales, fáciles de llevar y preparar, además de publicidad que presenta modelos o personajes famosos con figuras de aspecto saludable. Hay que recordar que la publicidad está regulada y controlada prohibiendo la atribución de propiedades particulares a los alimentos [235]. De acuerdo con los datos aportados por MERCASA, este tipo de productos ha tenido en los últimos 6 años una gran demanda, incrementando sus ventas [228].

Los niños son el tercer segmento diana entre los productos de la Base de Datos. Ellos son, de acuerdo a otros estudios europeos, consumidores habituales de alimentos fortificados. Para el caso del grupo de edad infantil, los ejemplos de marketing parecen ser más claros, con inclusión de personajes, obsequios en los envases y mensajes que resaltan un óptimo “crecimiento y desarrollo” de los niños. Investigadores como Verkaik-Kloosterman en Holanda [62] y Sichert-Hellert y cols. en Alemania [236], centraron sus estudios en los alimentos fortificados con ácido fólico del mercado destinados a los niños. En el estudio Donald, llevado a cabo en población alemana, se observó en una muestra de 861 sujetos entre 6 meses y 18 años, que el 61% de los registros de alimentos contenían al menos un alimento fortificado con ácido fólico, encontrándose en mayor porcentaje los *alimentos para lactantes y fórmulas de continuación*, seguidos por los *cereales de desayuno*. En este mismo estudio, igualmente, la ingesta era superior en niños pequeños que en los adolescentes (Sichert-Hellert y cols. [236]).

En Holanda, Verkaik-Kloosterman [62] realizó un estudio para conocer si los niveles de ácido fólico de los alimentos comercializados podían dar lugar a una ingesta excesiva de acuerdo a los datos de consumo en población infantil de la Encuesta Nacional de Consumo Alimentario en población infantil (DNFCS-kids, siglas del inglés, *Dutch National Food Consumption Survey among young children*). La autora concluyó que en base a la disponibilidad actual de estos alimentos, menos del 5% de la población infantil superaría los NMT de ingesta, siendo los niños de entre 2 y 3 años los que mayor riesgo de ingestas excesivas presentarían en caso de que aumente el número de productos fortificados en el mercado.

De acuerdo con el estudio español enKid, realizado entre 1998 y 2000 [2], los niños son los consumidores de la mayor parte de los alimentos que potencialmente podrían encontrarse fortificados en el mercado: *galletas, leche, yogures y cereales* [2]. Ciertamente un número elevado de productos analizados en el presente estudio va dirigido a este grupo de población mediante las alegaciones presentes en el etiquetado. Nuestros resultados indican que del total

del grupo de *cereales y derivados* así como de los *lácteos y derivados*, los dos grupos principales de alimentos fortificados inventariados, hasta un 26% van dirigidos a los niños.

El caso del grupo de bebés entre 0 a 12 meses es especial, ya que como se comentó anteriormente, tienen un subgrupo de alimentos concreto dentro de los productos para usos nutricionales especiales, el de las *fórmulas infantiles y de continuación*, que constituye el 7,5% de los alimentos de la Base de Datos.

1.7. Estudio del etiquetado nutricional y los tipos de alegaciones en el etiquetado de los alimentos fortificados con ácido fólico

De acuerdo con el Observatorio de Consumo del MAGRAMA el binomio alimentación y salud tiene gran importancia en la elección de los alimentos, y de ahí la importancia dada por el consumidor español a los elementos del etiquetado que declaran “propiedades del alimento en relación con la salud”, que obtuvo una alta valoración (de 8/10) [230]. Diversos estudios a nivel europeo [237] y mundial [238, 239] han señalado la importancia que supone para el consumidor disponer de un etiquetado completo, claro y comprensible en los alimentos, aunque ninguno se ha centrado en las declaraciones relacionadas con el contenido o las funciones del ácido fólico.

El Reglamento (CE) nº 1924/2006, relativo a a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos que entró en vigor a partir del año 2007 (modificado por el Reglamento (UE) 1169/2011 [170]), pretende asegurar la veracidad de estas declaraciones y proteger al consumidor. Respecto a las declaraciones nutricionales del contenido en vitaminas, en el Anexo I del Reglamento se establece que el alimento puede presentar la declaración “*fuentes de [nombre vitamina]*” si contiene el 15% de la CDR de la misma o bien “*alto contenido en [nombre vitamina]*” si presenta el 30% de la CDR. Por tanto, y debido

a que no existen valores máximos legislados para la adición de vitaminas, estos dos valores (15-30%) son una referencia en cuanto a la adición de vitaminas a los alimentos.

En nuestro estudio observamos que si bien la mayoría de los productos fortificados realiza una declaración de contenido en vitaminas, sólo un tercio de éstos especifica la presencia de ácido fólico. El grupo que en menor proporción especifica la presencia de la vitamina B₉ en el etiquetado es el de los *productos para usos nutricionales especiales*, lo cual en principio podría parecer contradictorio; sin embargo, por el uso al que van destinados (sustitutivos de comidas), se espera de ellos que tengan una formulación nutricional completa, por lo que la especificación de todas las vitaminas que contiene podría ser redundante. Los grupos en los que más se encuentra la declaración de contenido en ácido fólico son las *grasas y aceites* y las *bebidas (no lácteas)*.

Si atendemos a las declaraciones de propiedades saludables relacionadas con las funciones del ácido fólico en el organismo, que han sido aceptadas por el Comité de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA) y autorizadas recientemente por el Reglamento (UE) N^o 432/2012 de la Comisión para su utilización en el etiquetado de los alimentos [177], encontramos que únicamente siete alimentos las presentaban. Concretamente, las declaraciones eran aquellas relacionadas con el papel esencial del ácido fólico durante la gestación, el desarrollo del sistema nervioso durante el embarazo, la división celular y la síntesis de glóbulos rojos [217, 218]. Estas declaraciones se observaron en su mayoría en productos fortificados con el Nivel 1, es decir que aportaban ≤ 16 % de la CDR por ración declarada. En el citado Reglamento, que entró en vigor en junio de 2012 y que será aplicable a partir de diciembre de este mismo año, se establece como condición de uso de las declaraciones de propiedades saludables, que los alimentos deben contener como mínimo una cantidad de ácido fólico de acuerdo a lo establecido en el Reglamento (CE) N^o 1924/2006 para la declaración de “fuente de folatos”, es decir, ≥ 15 % de la CDR por 100 g, ml o ración si se trata de

porciones individuales [1]. Si bien los productos inventariados que presentan estas declaraciones son escasos, hay que resaltar que se encuentran en el Nivel más bajo de fortificación con ácido fólico. Podría decirse que se encuentran en el límite de los requerimientos del Reglamento y probablemente en el futuro requieran una reformulación para poder hacer uso de las declaraciones autorizadas. Otro aspecto a tener en cuenta es que la legislación hace referencia al porcentaje de CDR por 100 g, ml o ración, dependiendo de la presentación del envase y en nuestro estudio la segmentación de Niveles de fortificación con ácido fólico se realizó de acuerdo al %CDR por ración declarada, pudiendo ésta ser mayor o menor de 100 g o ml.

En resumen, se ha observado que si bien los productos fortificados con ácido fólico disponibles en el mercado cumplen con los requisitos legales en cuanto al etiquetado, desde la óptica de la información al consumidor el etiquetado podría resultar limitado ya que no facilita la identificación de los productos fortificados con ácido fólico.

2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN ÁCIDO FÓLICO Y ÁCIDO 5-METILTETRAHIDROFÓLICO EN ALIMENTOS FORTIFICADOS

2.1. Consideraciones previas

En la segunda parte del trabajo de la Tesis Doctoral, se analizaron 154 alimentos fortificados con ácido fólico, mediante dos métodos diferentes puestos a punto en nuestro laboratorio: la cromatografía de afinidad acoplada a HPLC y el método microbiológico. Ambos métodos de cuantificación se llevaron a cabo tras la extracción trienzimática de las muestras. Mediante la cromatografía de afinidad acoplada a HPLC obtuvimos los valores de ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato, las dos formas mayoritarias en los alimentos fortificados; y con el método microbiológico, los resultados se expresan como “folatos totales” ya que responde indiferenciadamente a todas las formas de folatos presentes en el alimento fortificado. El objeto de determinar el ácido fólico y los folatos mayoritarios responden a la necesidad de distinguir, en el caso de los alimentos fortificados, los vitámeros añadidos frente a los endógenos.

En un informe de Mayer y cols. para la Agencia de Estándares Alimentarios del Reino Unido [10], se discute acerca de cuál es la ventaja de analizar los vitámeros individuales de los folatos en muestras de plasma humano. Trasladado a los alimentos, donde está claro que el ácido fólico añadido constituye más del 90% del folato total de la muestra, podríamos hacernos la misma pregunta. Habría entonces que atender a la finalidad de los análisis para poder plantear qué tipo de análisis elegir en cada caso. En nuestros análisis por cromatografía de afinidad-HPLC, observamos que el ácido fólico es la forma mayoritaria como cabría esperar, seguida por el 5-metiltetrahidrofolato. En el análisis de alimentos fortificados es fundamental conocer la cantidad añadida de la vitamina por cuestiones de regulación, políticas e intervención nutricional, así como para conocer la estabilidad de la misma. En EE UU existen los “estándares de identidad o referencia” para distintos alimentos (harina, pan, pizza) que establecen las cantidades mínimas de ácido fólico que deben presentar los mismos, es decir las

cantidades legisladas de la concentración mínima que deben contener los alimentos fortificados con ácido fólico en el marco de la fortificación obligatoria. En España y Europa, si bien no existen tales requerimientos, existe normativa específica que regula la adición voluntaria de vitaminas a los alimentos [60], y por la cual se establecen las cantidades mínimas exigibles siempre que el fabricante realice una declaración de contenido en vitaminas.

El método de cromatografía de afinidad-HPLC presenta, sin duda, mayor dificultad en su puesta a punto en un laboratorio de investigación que el método microbiológico, por varios motivos. El primero de ellos, es la necesidad de purificar la proteína ligando de folato (PLF), que no está disponible de forma comercial en las cantidades necesarias para este tipo de análisis [187]. El proceso de purificación es caro, largo y complejo. La alternativa al uso de la PLF son las columnas de extracción en fase sólida de tipo intercambio aniónico fuerte (SAX), que se han usado en diversos trabajos para el análisis de ácido fólico en alimentos [102, 103]. No obstante, de acuerdo con Freisbelen y cols. [240] la sensibilidad del método de purificación mediante cromatografía de afinidad es diez veces superior que la de las columnas SAX.

Algunos autores han señalado que durante la etapa de purificación de las muestras, puede existir una interconversión de las formas naturales de los folatos en las condiciones de acidez durante la elución de la columna [241], pero justamente en esta fase del método la adición de los reactivos debe ser rápida, por lo que se neutraliza el eluido a analizar de forma inmediata a la salida de la columna de PLF. También se ha cuestionado la diferente afinidad que puede presentar la PLF por distintas formas de folatos. Sin embargo, los valores obtenidos en los ensayos de recuperación con H³-ácido fólico nos indicaron que ésta es suficiente para la concentración de folatos presente en nuestros extractos.

El método microbiológico no está exento de dificultad, ya que debe ser realizado por personal entrenado y en condiciones estandarizadas en el laboratorio. Por ejemplo, de acuerdo a Wright [201], es muy importante mantener el pH del medio de cultivo para asegurar una respuesta constante del microorganismo a las distintas formas de folato presentes en la muestra. Otro factor importante a controlar es la posible contaminación del material de laboratorio con ácido fólico, ya que la contaminación bacteriana puede limitarse mediante el uso de material y soluciones estériles.

2.2. Ácido fólico, 5-metiltetrahidrofólico y Folato total en distintos grupos de alimentos fortificados

2.2.1. Justificación de la elección de los grupos de alimentos

Dado el elevado número de productos disponibles para el análisis (n=375), la elección de la muestra de alimentos a analizar dentro de cada grupo se basó en los siguientes criterios:

- La muestra seleccionada constituyó al menos el 50% de todos los alimentos incluidos en un subgrupo;
- Ambos subgrupos formaban parte de los dos grupos de alimentos que incluyen mayor cantidad de productos fortificados (*cereales y derivados* y *leche y derivados*);
- Son productos susceptibles de formar parte de un desayuno de tipo mediterráneo.

Una posible limitación en nuestro estudio procede del muestreo, o los criterios de muestreo, ya que se obtuvo una muestra de cada producto en lugar de una distribución geográfica más representativa (la misma muestra en distintos puntos geográficos). Sin embargo, nuestra prioridad fue la adquisición de un alto número de marcas y tipos de producto más que un valor más representativo de pocos productos.

A este respecto, decir que en nuestro trabajo previo de investigación [12] se observó que la variación de la fortificación en una misma marca, entre dos lotes diferentes de producto, puede ser importante.

2.2.2. Cereales y derivados

La matriz de los *cereales de desayuno* y *galletas* fortificadas con ácido fólico, compuesta principalmente por harinas refinadas de distintos tipos de cereales (trigo, avena, maíz, arroz, etc.) fue tratada con la enzima α -amilasa, capaz de hidrolizar los enlaces α -1-4 del almidón gelatinizado [198]. Martin [104] y Konings y cols. [99] han observado en sus análisis que este tratamiento es suficiente para liberar los folatos endógenos y el ácido fólico, ya que éste último no está unido a la matriz de forma covalente. El ácido fólico no se encuentra ligado a la estructura de la matriz alimentaria al ser añadido como un ingrediente más en un “*premix*” de vitaminas, tal como señala la “*Guía de fortificación de alimentos con micronutrientes*” editada por la Organización Mundial de la Salud [22]. Este “*premix*” consiste en una mezcla de micronutrientes y otros ingredientes que se añade al alimento para mejorar la distribución de la mezcla en la matriz alimentaria y reducir la segregación o separación entre el alimento y las partículas de micronutrientes [22]. En el caso de los *cereales de desayuno*, su proceso de elaboración por extrusionado requiere muchas veces que el “*premix*” de vitaminas sea rociado a modo de atomizador sobre la superficie del producto, obteniéndose así un recubrimiento con jarabes o soluciones azucaradas que a su vez actúan a modo de protección para las vitaminas lábiles al oxígeno. En este proceso se suele añadir una “sobrefortificación en la formulación”, es decir, una cantidad adicional de vitaminas en el “*premix*” para asegurar lograr una cantidad estándar en el producto final [22]. Dicha sobrefortificación tiene como objeto compensar pérdidas por el proceso de elaboración o por la disminución de las vitaminas lábiles a lo largo de la vida útil del producto [242], pero incluso con las vitaminas más estables parece ser que la práctica de formulación habitual es añadir entre un 10 y 20% más de vitaminas en el “*premix*” [22]. Se sabe que el ácido fólico

sintético tiene elevada estabilidad a los distintos factores de pH, temperatura, oxígeno y luz [243], por lo que los niveles de sobrefortificación teóricamente podrían mantenerse en el producto final. Varios autores lo han comprobado. Por ejemplo: Rader [189] y Whittaker [20] en sus publicaciones entre 2000-2001 sobre productos fortificados de forma obligatoria y voluntaria, respectivamente, describen que los fabricantes añadían mayor cantidad de ácido fólico que la declarada. Sin embargo, en los últimos cinco años los estudios que evaluaron la sobrefortificación han sido más escasos. Póo-Prieto y cols. en 2006 [101] publicaron el método validado de cromatografía de afinidad-HPLC que utilizamos en el presente trabajo y en sus resultados describen que no encontraron cantidades de ácido fólico superiores a las declaradas en cereales fortificados en los EE UU. En este sentido alegan que las cantidades extra añadidas por los fabricantes han podido ser disminuidas o reformuladas con el tiempo gracias a las mejoras en las tecnologías de la fortificación [101]. En Canadá, Shakur y cols. [244] describen, en un trabajo publicado en 2009, que los *cereales de desayuno*, analizados mediante extracción trienzimática y método microbiológico, presentan un contenido del 237% frente a los valores declarados de ácido fólico.

En estudios previos, nuestro grupo analizó *cereales de desayuno* fortificados con ácido fólico (n=73) por el método microbiológico, encontrando sobrefortificación en los *cereales de desayuno* del 182-217% del valor declarado en el etiquetado, independientemente del tipo de matriz del cereal [108].

El grupo de *cereales y derivados*, especialmente el subgrupo de *cereales de desayuno*, son los que presentan mayor volumen de datos publicados. Compararemos el contenido en ácido fólico sintético obtenido en nuestros análisis con los valores disponibles en la literatura. Cuando no lo estén, se utilizarán los datos de folato total publicados. Sin embargo, al tratarse de productos de diversos tipos y marcas, es difícil realizar una comparación óptima.

El rango de valores obtenido en nuestros análisis en los *cereales de desayuno* (n=68) osciló entre $51,3 \pm 6,3$ y $400 \pm 16,4$ μg de ácido fólico/100 g. Poó-Prieto y cols. [101], utilizando la misma metodología, obtuvieron valores entre $320.1 \pm 15,3$ y $1153 \pm 84,7$ μg de ácido fólico por 100 g, dependiendo del tipo y marca comercial; valores significativamente superiores a nuestros resultados. Las muestras de alimentos derivados de cereales analizados en este estudio eran alimentos comercializados en los EE UU.

Shakur y cols. [244], utilizaron la extracción trienzimática seguida de la cuantificación mediante el ensayo microbiológico, obteniendo un valor medio de 146 ± 36 μg de folato total/100 g en 15 muestras de *cereales de desayuno* comercializados en Canadá.

Phillips y cols. [245] utilizando extracción en fase sólida (SAX) para la purificación de los extractos y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para cuantificación del ácido fólico, analizaron 12 muestras diferentes de *cereales de desayuno* en EE UU, encontrando entre 229 ± 14 y 798 ± 12 μg de ácido fólico por 100 g (media \pm error estándar).

Los valores obtenidos en el subgrupo de *galletas* (n=13) fueron de $42,9 \pm 0,6$ a $186,3 \pm 10,8$ μg de ácido fólico por 100 g. Shakur y cols. [244] obtuvieron un valor medio de 94 ± 29 $\mu\text{g}/100$ g en 15 muestras. En la Base de Datos de la Red BEDCA [89] encontramos valores de folato total para distintos tipos de *galletas* de entre 5 y 13 $\mu\text{g}/100$ g, en ningún caso especifican estar fortificadas. De hecho, si atendemos a nuestros resultados de folatos naturales en este subgrupo, encontramos que el contenido en 5-MTHF es de entre 3,02 y 9,67 $\mu\text{g}/100$ g.

Resulta interesante que al estudiar los datos de ácido fólico para productos similares pero de distintas marcas, observamos marcadas diferencias. En los productos incluidos en la Base de Datos encontramos que los típicos *cereales de*

desayuno comercializados bajo la denominación “copos de maíz” o “*corn flakes*” difieren de los datos analíticos obtenidos en la “marca A” (54,1 µg/100 g) con los valores declarados en el etiquetado de dicha marca (200 µg/100 g), incluso son significativamente diferentes de los valores declarados en la “marca B” (167 µg/100 g). Si acudimos a las Tablas de Composición de Alimentos españoles de Moreiras y cols. [224] el dato disponible para copos de maíz (código 1060) es de 250 µg/100 g, si bien este alimento no especifica la marca comercial. Podemos decir que es necesario que las Tablas de Composición de Alimentos y las Bases de Datos incluyan marcas comerciales, dado el amplio rango de valores de fortificación utilizados por los fabricantes y la variedad de productos disponibles, ya que los fabricantes los van diferenciando respecto a otros similares de otra marca.

2.2.3. Leche y derivados

La matriz de los *lácteos y derivados* con el tratamiento previo de autoclavado que precipita las proteínas y luego son digeridas por la proteasa, es suficiente para la liberación de los folatos naturales y sintéticos de acuerdo a lo que proponen Forssén y cols. [246] y Johnston y cols. [105].

En 2002, Johnson y cols. publicaron [105] datos analíticos del contenido en folato total de 210 alimentos del grupo de *leche y derivados* comercializados en los EE UU. Los análisis se realizaron mediante extracción trienzimática con posterior cuantificación por ensayo microbiológico, utilizando la cepa de *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) que nosotros usamos en estudios previos [12, 108]. En nuestro país en 2006, Pérez-Prieto y cols. [102] publicaron datos provenientes del análisis de 11 productos, incluyendo *lácteos y derivados*, analizados mediante el método de purificación y concentración de extracción en fase sólida (SPE) con intercambio aniónico fuerte (SAX) y cuantificación del ácido fólico por HPLC. En este estudio encontraron que las diferencias con el contenido de ácido fólico declarado en las etiquetas no fueron significativas. En nuestro estudio, los valores obtenidos en los

distintos tipos de *leches líquidas* analizados (n=26) fue de $31,1 \pm 2,1$ a $102,4 \pm 3,2$ μg de ácido fólico/100 g. Nuestros resultados son acordes a los de Pérez-Prieto y cols. [102] analizaron 5 tipos de *leche*, cuantificando el ácido fólico mediante HPLC, y los valores obtenidos fueron de entre 28 ± 2 y 77 ± 11 $\mu\text{g}/100$ ml. Así mismo, Johnston y cols. [105] encontraron entre 78 ± 13 y 80 ± 13 μg de folato total por 100 g de *leche*, si bien utilizaron el ensayo microbiológico para la cuantificación.

En la Base de Datos de la Red BEDCA [89] los valores de folato total para distintos tipos de *leche* son de entre 2,9 y 5 μg por 100 ml. Dichos productos no especifican estar fortificados. Estos valores concuerdan con nuestros resultados para el 5-MTHF, donde obtuvimos entre 2 y 10 μg por 100 ml para distintos tipos de *leche*.

Si comparamos los valores de ácido fólico declarados por las distintas marcas de *leche* incluidas en nuestra Base de Datos encontramos que la fortificación de este alimento es más homogénea, dado que las 5 marcas declaran un contenido de 30 μg por 100 ml. La excepción la encontramos en una de ellas, que presenta un producto especialmente dirigido a “*mamás*” cuyo contenido declarado en ácido fólico es de 80 μg por 100 ml.

Los valores obtenidos en nuestros análisis para los *yogures y leches fermentadas* (n=21) osciló entre $26,7 \pm 1,8$ y $212,1 \pm 5,1$ μg de ácido fólico/100 ml. Johnston y cols. [105] analizaron tres tipos de *yogures* obteniendo valores de folato total entre 103 ± 36 μg y 117 ± 24 μg por 100 ml. En el estudio de Pérez-Prieto y cols. [102] analizaron sólo un tipo de *yogurt* bebible que contenía 30 ± 3 μg de ácido fólico por 100 ml. La Base de Datos de la Red BEDCA [89] presenta valores de folato total para distintos tipos de *yogures*, entre 3 y 12 μg de por 100 ml.

Los valores obtenidos en nuestro estudio para los *preparados lácteos* (n=17) fue de $19,4 \pm 0,2$ a $358 \pm 8,6$ μg de ácido fólico/100 ml. Pérez-Prieto y cols. [102] analizaron únicamente un alimento de este subgrupo obteniendo 28 ± 4 μg de ácido fólico/100 ml. En la Base de Datos de la Red BEDCA [89] no se incluyen alimentos comparables.

2.2.4. Bebidas no lácteas: cacao y café soluble y zumos y néctares

El cacao y café soluble se presentan pulverizados y están compuestos de proteínas y azúcares simples de elevada solubilidad por los tratamientos que recibe el producto para su comercialización. Por ello, una vez diluidos en el tampón de extracción y teniendo en cuenta que las enzimas se añaden en exceso para las matrices de hidratos de carbono complejo (almidón), se considera que el tratamiento es suficiente para liberar los folatos naturales de estos alimentos. Los valores obtenidos (n=6) oscilaron entre $71,4 \pm 3,7$ y 510 ± 30 μg de ácido fólico por 100 g. Representan el máximo valor obtenido en los alimentos fortificados analizados, pero hay que tener en cuenta que se trata de un alimento cuya ración declarada es de entre 5 y 20 g, con lo que el aporte de fólico no es tan alto si se considera la forma de consumo del alimento. No hemos encontrado en la literatura científica valores de este tipo de alimentos fortificados con ácido fólico, si bien el valor que encontramos en la Tabla de Composición de alimentos españoles para el cacao en polvo azucarado es de 38 μg de folato total por 100 g [91]. Este contenido puede ser debido a la proporción de leche en polvo que se añade en su formulación.

Los zumos y néctares están compuestos en $\geq 95\%$ por agua e hidratos de carbono simples disueltos (azúcares) y no precisan tratamiento trienzimático al contener los folatos en solución [247]. Los valores obtenidos fueron de entre $22,3 \pm 0,33$ y $29,4 \pm 1$ μg de ácido fólico por 100 ml. Si atendemos a las raciones de consumo habitual de estas bebidas, entre 200 y 300 ml/ración [213], podría aportar entre 60 y 88 μg de ácido fólico/ración. Pérez-Prieto y cols. [102]

obtuvieron el contenido en ácido fólico de los néctares y bebidas isotónicas a base de frutas entre 14 ± 4 y 72 ± 3 $\mu\text{g}/100$ ml. En la Base de Datos de la Red BEDCA [89], distintos néctares de frutas envasadas contienen entre 2 y 12 $\mu\text{g}/100$ ml de folato total, pero no especifica que se traten de productos fortificados.

2.3. Concordancia entre los métodos utilizados

Cuando comparamos nuestros resultados por medio de la regresión lineal con el total de los alimentos ($n=145$) encontramos que el coeficiente de regresión es relativamente bajo ($R^2=0,85$), al atender a los distintos *subgrupos* de alimentos, los *cereales de desayuno* y la *leche y derivados* son los grupos cuyos resultados peor se correlacionan entre sí; las *galletas* y las *bebidas no lácteas* presentan unos coeficientes de regresión más altos (R^2). Por otro lado, hemos observado, que de acuerdo con el método de Bland-Altman [207], el grado de concordancia entre los métodos utilizados para cuantificar folato total es bajo. La diferencia entre métodos tiende a situarse por encima de la media. No hemos encontrado que los resultados de folato total obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC sean sistemáticamente menores que los del ensayo microbiológico, o viceversa, en ninguno de los grupos o subgrupos de alimentos analizados; más bien se observó que esto dependía de la muestra analizada. De acuerdo con el estudio publicado por Konings y cols. en 2001, donde se analizaron 125 alimentos que forman parte de la dieta habitual de la población holandesa, el contenido en folato total de los alimentos analizado por el ensayo microbiológico sería aproximadamente un 25% superior a los valores obtenidos por HPLC [99]. Hay que tener en cuenta que estos alimentos eran en su mayoría vegetales, frutas, lácteos y derivados, productos cárnicos y pan, todos ellos alimentos sin fortificar de acuerdo con los datos analíticos que presenta el autor.

El coeficiente de correlación intraclase (CCI) es, de acuerdo a la literatura consultada [204, 205], el método más aceptado y específico para determinar la concordancia entre variables numéricas. Para el CCI se obtuvo una fuerza de

concordancia aceptable entre los métodos analíticos utilizados [206]. Las diferencias analíticas pueden ser debidas a una posible saturación de la columna de afinidad [10], a otros vitámeros de folatos no cuantificados en HPLC que sí son reconocidos en el ensayo microbiológico [99], así como a una variabilidad de este último a elevadas concentraciones de ácido fólico, observada por otros autores [20, 248].

Recientemente, en la Base de Datos de composición de alimentos holandesa NEVO, se actualizaron los datos de folatos provenientes de análisis por HPLC con valores obtenidos mediante ensayo microbiológico: encontraron que los valores obtenidos por HPLC eran aproximadamente un 30% inferiores a los obtenidos por método microbiológico, lo cual había sido ya descrito por Konings en 1999 [248, 249]. De acuerdo con nuestra revisión de la literatura disponible, y con el reciente trabajo de Bouckaert y cols. [88], la mayor parte de los estudios, Tablas de Composición y Bases de Datos de alimentos que recopilan datos de folatos, utilizan el método microbiológico para su cuantificación. Si bien, dicho método como tal, se utiliza con variaciones que difieren del método publicado por la AOAC [11] considerado de referencia. En el informe de Mayer y cols. [10] concluyen que cuando no están disponibles de rutina en los laboratorios los métodos y equipos para cuantificar folatos por espectrometría de masas, es preferible utilizar el método microbiológico.

2.4. Ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC en alimentos fortificados: diferencias frente a valores declarados en el etiquetado nutricional

Los resultados obtenidos para el ácido fólico contenido en los distintos grupos de alimentos se compararon con el contenido de la vitamina declarado en el etiquetado nutricional, con objeto de determinar una posible existencia de sobrefortificación. Debido al elevado número de productos, fueron segmentados de acuerdo a los niveles de fortificación preestablecidos en el apartado de Material

y Métodos. En los niveles de fortificación en los que se clasificaron los alimentos, no encontramos una tendencia clara a la sub o la sobrefortificación. Partimos de la base de que el valor de ácido fólico declarado en el etiquetado corresponde a la cantidad añadida de esta vitamina y no al contenido propio de folatos endógenos los alimentos. Sin embargo, no tenemos constancia de que esto sea así, ya que los fabricantes contactados no nos facilitaron dicha información. El contenido en 5-MTHF medido como folato endógeno de los alimentos supuso entre el 5 y el 20% del folato total analizado por HPLC (ácido fólico + 5-MTHF).

Atendiendo a nuestro criterio de segmentación, encontramos que para el subgrupo de *cereales de desayuno*, en los Niveles 1 y 2 de fortificación los valores obtenidos mediante análisis fueron menores que los declarados en el etiquetado, mientras que en los Niveles 3 y 4 se adecuaron a las declaraciones del etiquetado. En el subgrupo de las *galletas*, el Nivel 3 de fortificación presentó valores significativamente superiores de ácido fólico analizado.

En ambos casos, hablamos de matrices alimentarias compuestas en más de un 90% por harinas y derivados de distintos tipos de cereal (trigo, arroz, avena, etc.) en los cuales el tratamiento con α -amilasa es suficiente para liberar los folatos [104]. En definitiva, no se observa un patrón definido de prácticas que supongan sub o sobrefortificación de los productos *cereales y derivados* que sí ha sido descrita por autores como Rader y cols. [20, 189]. No obstante, los estudios de Rader han sido publicados hace 10 años y los resultados provienen de alimentos comercializados en EE UU. Otros estudios más recientes [101] han observado que los niveles analizados se ajustan mejor a lo declarado en el etiquetado, lo que puede ser una cuestión derivada de mejoras en los métodos analíticos utilizados o bien por ajuste en la formulación por parte de los fabricantes. En estudios previos publicados por nuestro grupo, el análisis de *cereales de desayuno* únicamente por el método microbiológico resultaba en una sobrefortificación media del 80% sobre los valores declarados por el fabricante, si bien los alimentos eran segmentados de

acuerdo a la matriz del cereal, y no según el nivel de fortificación declarado por el fabricante [108].

Para el subgrupo de *leche líquida*, en el Nivel 4 se encontraron valores de ácido fólico significativamente superiores a los declarados, al contrario que en los *yogures y leches fermentadas*, donde se observaron valores analizados significativamente inferiores. Por otro lado, los *preparados lácteos* y las *bebidas no lácteas* se adecuaron a los valores declarados.

Con todo lo anterior, podría decirse que no existe un patrón de sub o sobrefortificación específico o relacionado con un nivel de fortificación declarado, si bien, no podemos comparar estos resultados con otros publicados en España ni en el extranjero dado que no existen datos suficientes, o bien los autores no segmentan los productos en niveles de fortificación por el número limitado de alimentos analizados. Un resumen de la revisión de estudios que comparan datos analíticos de ácido fólico o folato total frente al contenido declarado en el etiquetado nos indica que las prácticas de sobrefortificación son muy variables:

- Whittaker y cols. [20] cuantificaron el contenido en folato total de 28 muestras de *cereales de desayuno* comercializados en los EE UU, mediante el método microbiológico, obteniendo entre 114 y 320% del valor declarado.
- Póo-Prieto y cols. [101] analizaron alimentos estadounidenses del grupo de cereales y derivados mediante el método de cromatografía de afinidad acoplada a HPLC, el mismo utilizado en el presente trabajo, y no encontraron diferencias significativas entre los valores de ácido fólico obtenido y el declarado o requerido por legislación.

- En el estudio de Pérez-Prieto y cols. [102] como se ha comentado anteriormente, los autores no encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para ácido fólico por HPLC y los declarados en el etiquetado de alimentos fortificados del grupo de *leche y derivados y bebidas no lácteas*.
- Shakur y cols. [244], que analizaron muestras de alimentos fortificados canadienses del grupo de *cereales y derivados* mediante el ensayo microbiológico, obtuvieron valores de folato total, con porcentajes de sobrefortificación entre el 118% y el 237% sobre los valores declarados.
- Phillips y cols. [245] analizaron muestras de *cereales de desayuno* cuantificando los vitámeros de folatos con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS): el contenido de ácido fólico resultante frente al declarado fue entre el 5 y el 20% superior, y en dos muestras >20% superior.

En cuanto a las ventajas *potenciales* que podrían aportar la “sobrefortificación” de los alimentos con ácido fólico, Shakur y cols. [244] estudiaron los productos fortificados comercializados en Canadá tras más de 10 años de fortificación obligatoria, encontrando que existen alimentos con 141-237% más de ácido fólico sobre el valor regulado y declarado, lo cual parece ser beneficioso para alcanzar las Ingestas Recomendadas de la población [250]. Debido a que no existe por el momento una legislación que regule el contenido máximo de vitaminas que puede añadir el fabricante, no podemos considerar que la sobrefortificación constituya un fraude, por el contrario en el caso de encontrar cantidades inferiores a las declaradas estaríamos hablando de productos que no cumplen la reglamentación europea aplicable.

Los datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) [38] de la cantidad media de folatos en la dieta media de hombres y mujeres españoles indican no llegan a cubrir más del 52% de las Ingestas Recomendadas, con lo que podría interesar que en los productos se añada más ácido fólico. Pero el hecho de que exista una práctica variable de sobrefortificación, por parte de la industria alimentaria, contribuye a añadir mayor dificultad en la estimación de la ingesta de la población. Cuestión que podría ser resuelta, en parte, si la formulación de productos fuera acorde a los requerimientos de los diferentes grupos diana de consumo.

Existen numerosos estudios que concluyen que la biodisponibilidad del ácido fólico sintético es mayor que la de los folatos naturales [251]. Además varios autores subrayan la importancia potencial de contar con datos de composición de las distintas formas de folatos para ser incluidas en las Tablas de Composición de alimentos [7]. En nuestro trabajo obtuvimos, mediante la metodología de cromatografía de afinidad-HPLC, datos para el ácido fólico añadido y la forma mayoritaria de folato endógeno de los alimentos fortificados, lo cual nos permite calcular los Equivalentes Dietarios de Folatos (EDF) concepto que tiene en cuenta la biodisponibilidad de las distintas formas en los alimentos.

2.5. Distribución porcentual de los grupos de alimentos analizados según niveles de fortificación y grupos de población diana frente a valores declarados

Cuando comparamos los niveles de fortificación obtenidos de forma analítica frente a los declarados en el etiquetado, observamos que el grupo de los *lácteos y derivados* presentaron un mayor nivel de fortificación, con el 56% de los productos enmarcados en el Nivel 4 frente al 37% que lo declaraba. No hemos encontrado datos publicados con los que poder comparar estos resultados. También observamos que el grupo de las *bebidas (no lácteas)* presentó un menor nivel de fortificación en un 44% de los alimentos analizados frente al 10% que lo declaraba.

En este último caso hay que especificar que se analizaron un menor número de productos que en caso de los *lácteos*.

El grupo mayoritario analizado, los *cereales y derivados*, presentaron un mayor nivel de fortificación en el Nivel 3, con 19% de los alimentos analizados frente al 9% de los que declaraban dicho nivel. Como se expuso anteriormente, este grupo de alimentos es el que ha sido objeto de un mayor número de estudios y análisis, ya que las harinas y sus derivados comenzaron siendo el vehículo de fortificación obligatoria con ácido fólico en EE UU y Canadá en 1998 [19]. La mayor parte de las publicaciones encuentra niveles de sobrefortificación en estos productos, que atribuye en parte a una formulación que pretende mantener el contenido en vitaminas a lo largo de la vida útil del producto [20]. Los valores de ácido fólico obtenidos en el presente trabajo no indican que un grupo de alimentos presente mayor sobrefortificación que otro dependiendo de la matriz del alimento. Sí se puede observar, sin embargo, la presencia de mayores niveles de fortificación de acuerdo al grupo diana especificado en el producto. En cuanto a los grupos diana de población de los alimentos analizados, observamos que los productos orientados al grupo de *niños (mayores de 1 año)* tienen un nivel de fortificación por ración recomendada considerablemente superior al declarado en el etiquetado: la proporción de productos que declaran contener el Nivel 4 de fortificación es del 8% y de acuerdo a nuestros resultados sería de un 28%. Si esto podría o no suponer una ventaja en cuanto a la adecuación a las Ingestas Recomendadas (IR) de fólico, habría que estudiarlo teniendo en cuenta los datos de consumo de alimentos, tal como se hará en el **Apartado 3**. Sin embargo, lo que sí podemos apuntar es que si consideramos que para este grupo los valores de IR son más bajos que para los adultos [138], y que además su ingesta de alimentos ricos en folatos naturales es baja [252], los alimentos fortificados con ácido fólico podrían ser de interés nutricional para lograr una ingesta de folatos más adecuada a las necesidades. Así lo han visto Sichert-Hellert y cols. [236] en una muestra de niños alemanes (n=861, edades entre 6 meses y 18 años) del Estudio Dortmund, que consumían al menos un producto fortificado con ácido fólico al día: la

adecuación de la ingesta a las recomendaciones de folatos de este país (expresadas en EDF) eran de entre el 72 y el 100%, siendo menores en las niñas que en los niños.

Si examinamos el menor nivel de fortificación, el Nivel 1, también observamos que los productos analizados para el grupo de *niños (mayores de 1 año)* presentaron una mayor proporción: 23% frente al 15% declarado por el fabricante.

Los alimentos fortificados con ácido fólico incluidos en productos para el *control de peso*, presentaron un Nivel 4 de fortificación en el 34% de los productos analizados frente al 28% que lo declaraban en el etiquetado.

Por otro lado, encontramos que los productos enfocados a la población diana o target de *“madres/mujer”* tienen un Nivel 4 de fortificación en el 100% de los productos analizados. Con lo cual, si bien el número de alimentos comercializados específicamente para este grupo es bajo, el aporte de ácido fólico que presentan es adecuado o incluso superior a sus Ingestas Recomendadas (IR). Este hecho podría suponer una ventaja para alcanzar las IR de esta vitamina, que tal como se ha visto en los estudios en población española, presentan un bajo porcentaje de adecuación en este grupo de población [3, 38].

Hemos visto con anterioridad que los alimentos que no especifican grupo de población diana de consumo en el etiquetado son mayoritarios en la Base de Datos. En cuanto al nivel de fortificación analizado podemos destacar que únicamente en el Nivel 4 de fortificación, el porcentaje de productos es mayor al declarado.

Desde el punto de vista nutricional, la importancia del *“target”* como técnica de marketing en los productos fortificados tiene interés de acuerdo con Mayer y cols. [10]. Sabemos que los diferentes subgrupos tienen requerimientos nutricionales de folatos específicos dependiendo de la edad, estado de salud,

gestación y que, a la vez, presentan diversos hábitos alimentarios con lo que, de acuerdo a Lawrence [37], una única política nutricional para mejorar el estatus en folatos puede no ser suficiente. Por otra parte hay que tener en cuenta que la adecuación de un grupo (mujeres en edad fértil) podría significar ingestas excesivas en otro (niños); de hecho, en EE UU y Canadá, países que tienen implantada la fortificación obligatoria con ácido fólico, una de las principales preocupaciones se centran en conocer el estatus en ácido fólico de la población infantil, ya que dados sus hábitos de consumo de alimentos, podrían ingerir un exceso de ácido fólico con la dieta. En 2011, Yeung y cols. publicaron un trabajo que evaluaba el aporte de los productos de origen cereal al estatus de ácido fólico y un posible exceso (Nivel Máximo Tolerable de Ingesta) en una muestra de población infanto/juvenil del estudio NHANES (n=7061, entre 1 y 18 años) [253]. Se encontró que aquellos que consumían conjuntamente productos de origen cereal + *cereales de desayuno* + suplementos de ácido fólico superaban el NMT de ingesta en mayor porcentaje (entre el 15 y el 78%), especialmente los niños más pequeños (1 a 3 años).

3. ESTIMACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS ALIMENTOS FORTIFICADOS A LAS RECOMENDACIONES DE INGESTA DE FOLATOS Y ÁCIDO FÓLICO PARA DISTINTOS GRUPOS DE POBLACIÓN MEDIANTE ESCENARIOS DE SIMULACIÓN

3.1. Modelos de desayuno y escenarios de simulación de ingesta de alimentos fortificados con ácido fólico para distintos grupos de población

3.1.1. Consideraciones previas

Es un hecho ampliamente aceptado que la ingesta de una dieta variada y equilibrada debería proporcionar todos los nutrientes en las cantidades adecuadas para satisfacer las necesidades nutritivas de acuerdo a las Ingestas Recomendadas (IR). Sin embargo, las “*nuevas funciones*”, que se plantean para algunas vitaminas como es el caso del ácido fólico, podrían requerir la ingesta de cantidades superiores a las que se obtienen mediante la dieta habitual. Esta es una de las principales premisas que justifica la inclusión de alimentos fortificados en la dieta habitual [9]. Lógicamente, la fortificación debe plantearse con los criterios de seguridad imprescindibles, y de acuerdo a la relación beneficio/riesgo para las diferentes edades y situaciones fisiológicas [8].

Existe la necesidad de monitorizar y evaluar la ingesta de folatos y ácido fólico en la población. Esto queda reflejado en la mayoría de trabajos relacionados con los folatos y en la evidencia científica que apunta a los efectos beneficiosos o potencialmente negativos en función de las ingestas de ácido fólico [126]. Por una parte, encontramos segmentos de población que no alcanzan las recomendaciones de folatos mediante la dieta diaria y, por otra, encontramos una oferta alimentaria cada vez mayor de alimentos fortificados con ácido fólico, que potencialmente serían de utilidad para complementar la dieta [9, 51]. Sin embargo, son varias las limitaciones encontradas por los investigadores a la hora de cuantificar y evaluar la ingesta de folatos [61], en especial, como indican Bouckaert y cols. [88], debido a la escasez de datos de ácido fólico para los alimentos fortificados contenidos en bases de datos o Tablas de Composición de

alimentos. En este sentido, se ha recomendado que los cuestionarios para la evaluación de la ingesta de folatos sean individualizados y adaptados para incluir productos fortificados, pero es evidente que, a su vez, resulta esencial disponer de valores actualizados y precisos de estos alimentos [244, 253]. Esto se puede aplicar a su vez a todas las vitaminas y minerales y al conjunto de nutrientes que se añaden de forma regular a los productos fortificados y que, por tanto, estarían normalmente subestimados en las ingestas habituales reales, más aún, si el etiquetado no refleja con precisión el contenido vitamínico o mineral añadido [20, 244].

El objetivo de la simulación de ingesta o “*dietary modelling*” es predecir la exposición a ingestas deficientes o excesivas con precisión y exactitud razonable y, con especial interés, en los extremos de la distribución de consumo de la población [254]. Una de las mayores fuentes de error en las encuestas dietéticas aplicadas a la población es la omisión u olvido de alimentos (*under-reporting*) por parte del individuo encuestado. Puede darse el caso de que el individuo esté consumiendo cantidades variables de vitaminas a través de los alimentos fortificados, pero que lo desconozca por falta de una motivación real para ingerirlos (mujeres en edad fértil) o por ausencia de información nutricional adecuada en el etiquetado [12]. Una simulación de la ingesta estadísticamente válida sólo se puede realizar si contamos con datos pormenorizados de las encuestas nutricionales realizadas en el grupo de población de interés [62]. Otra opción simplificada presentada en un informe de la Autoridad Irlandesa de Seguridad Alimentaria [41] consiste en establecer modelos de simulación de menús incluyendo uno o más alimentos fortificados y calculando el aporte de ácido fólico de los mismos. Dicho modelo fue el seleccionado para el presente trabajo ya que resulta muy simple e intuitivo.

Los modelos de desayuno planteados en nuestro estudio son en su mayoría variados y considerados “saludables”, al incluir al menos alimentos de 3 grupos diferentes, tal y como indican las recomendaciones de la Sociedad Española de

Nutrición Comunitaria (SENC) [209], y ya de por sí tienen un aporte considerable de folatos naturales, de entre el 5 y el 60% de las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico dependiendo del grupo de edad [138]. Algunos de los desayunos diseñados, sin embargo, no alcanzaron las IR de energía, que se establecen de forma aproximada en el 25% de la energía diaria a través del desayuno, pero son representativos del consumo habitual de la población española de distintas edades [255].

En los modelos de desayuno planteados, se intercambia o añade el contenido en ácido fólico de los alimentos analizados, por alimentos equivalentes como *leche*, *galletas*, *zumos*, etc. Así, es posible comparar el menú sin alimento fortificado o que lo incluya, para conocer su aporte a las Ingestas Recomendadas (IR) de los distintos grupos de población [138]. Las raciones para adulto que utilizamos para la simulación, son las recomendadas por la SENC [209], y para los niños se considera el 80% del tamaño de las raciones definidas para los adultos [213].

3.1.2. Edad infantil y adolescente

El grupo de investigación formado por Serra-Majem y cols., en el estudio enKid [2], analizaron la ingesta y los hábitos alimentarios de los niños y adolescentes de distintas zonas de España, en un rango de edades comprendidas entre los 2 y 24 años. Los datos de sus estudios indican que una elevada proporción de la población infantil bien omite el desayuno, o lo realiza a base de *galletas* o bollería y *leche* [256], alimentos que en conjunto pueden aportar una alta densidad energética y bajo aporte de micronutrientes. El desayuno infantil, por lo general, carece de fruta y zumos naturales, fuentes principales de folatos en esta toma [257]. Los datos de ingesta media de folatos que obtuvieron los autores del estudio enKid en este segmento de población para chicos y chicas están entre $161,6 \pm 42$ y $144,9 \pm 32$ $\mu\text{g}/\text{día}$, respectivamente. Estos valores corresponden a $>100\%$ de las IR para el grupo de edad entre 1 y 3 años, el 80% de las IR del grupo

entre 4 y 8 años y el 53% de las IR para adolescentes entre 9 y 13 años [23]. Hay que apuntar que en este estudio se cuantificó en la ingesta los datos de ácido fólico de los *cereales de desayuno* fortificados. El grupo de los adolescentes se presenta como el de mayor riesgo de deficiencia de folatos en la dieta [23]. Hecho significativo si tenemos en cuenta que los hábitos alimentarios de dicho segmento, sean probablemente mantenidos a lo largo de su vida fértil.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la simulación, se observa que la combinación de dos alimentos fortificados, planteada en el *Escenario 2* puede aportar el 340% de las IR de ácido fólico para el segmento de edad de 1 a 3 años, tan sólo en el desayuno. La inclusión de un alimento (*Escenario 1*) fortificado tipo *leche*, con el Nivel 4 de fortificación analizado, puede aportar entre un 100 y 150% de las IR de ácido fólico. La inclusión de una ración de las *galletas* y cereales, que presentan un Nivel 1 de fortificación de acuerdo a los datos analíticos, pueden suponer entre un 50 y un 75% de las IR para este grupo de edad. El único grupo de alimentos que podría superar el 100% del NMT (Nivel Máximo Tolerable) de ingesta es el de los *yogures* y *leches fermentadas* fortificados con el Nivel 4, lógicamente, ya sea mediante su inclusión única o conjunta con otros alimentos fortificados. Con la inclusión conjunta de 3 alimentos fortificados con el Nivel 4 que planteamos en el *Escenario 2* (*cereales, leche* y *zumos*) los niños de 1 a 3 años podrían alcanzar aproximadamente el 103% del NMT, pero si combinamos los yogures y cereales fortificados a este nivel se alcanzaría más del 150% del NMT. Por tanto, no sería recomendable incluir alimentos con este Nivel de fortificación en el desayuno de los niños de este segmento de edad.

En el caso de la población infantil es justamente el desconocimiento de las consecuencias de una ingesta excesiva de ácido fólico a largo plazo, lo que plantea la necesidad de evaluar la adecuación a los valores de referencia [126]. Además, este grupo de edad puede representar uno de los mayores consumidores de alimentos fortificados con ácido fólico, tales como los *cereales de desayuno* y los lácteos y derivados [42, 51].

Si consideramos el aporte de la inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico en el desayuno, a las IR del segmento de edad adolescente, observamos que los *lácteos y derivados* (Nivel 4 de fortificación) alcanzan entre el 50 y el 90% de las IR, y los *cereales y derivados* entre el 17 y el 42% de las IR, en función al modelo de desayuno considerado. Si se combinan los aportes conjuntos de ácido fólico de dos alimentos fortificados con el Nivel 4, observamos que se cubren entre el 100 y 115% de las IR para los adolescentes. En ningún Escenario se superaría el Nivel Máximo Tolerable de ingesta de ácido fólico. Por tanto, la inclusión de alimentos fortificados en el desayuno de los adolescentes sería muy recomendable para alcanzar las IR de esta vitamina.

3.1.3. Mujeres en edad fértil (16 a 49 años)

En las mujeres en edad fértil resulta esencial mantener una adecuada ingesta de folatos y ácido fólico a través de la dieta, debido al papel preventivo que puede jugar el ácido fólico en los DTN [5]. El estatus en folatos debe ser adecuado antes de la concepción, ya que el cierre del tubo neural ocurre a las 2-3 semanas de la misma, etapa cuando la mujer probablemente aun desconoce su estado. Los datos de ingesta de folatos en mujeres españolas de este grupo de edad en el estudio ENUCAM, y en la valoración de la dieta a través del Panel de Consumo de Alimentos del MAGRAMA, indican que cubren aproximadamente entre un 50 y un 80% de sus Ingestas Recomendadas [3, 38]. Deficiencias como éstas llevaron a tomar la decisión de implantar la fortificación obligatoria con ácido fólico en unos 54 países desde 1998 [6, 30].

En un estudio realizado por el MAGRAMA en 2006 sobre “*Qué desayunan los españoles*” [255], se indica que un 1.4% de los adultos omite el desayuno, un 10% consume un único alimento, y un 69% de los encuestados desayuna siempre lo mismo. Esta falta de variedad o ausencia del desayuno influye en la calidad de la dieta global, tanto en la ingesta energética como en la de micronutrientes [258].

De acuerdo a nuestros resultados, si consideramos un desayuno estándar, que incluya al menos 3 grupos distintos de alimentos, como los planteados en nuestros modelos, el aporte de folatos naturales sería de entre el 5 y el 23% de las IR. Si atendemos al grupo de alimentos fortificados que presenta un mayor nivel de fortificación de acuerdo a nuestros datos analíticos (Nivel 4), los *lácteos y derivados*, el aporte a las IR de ácido fólico sería de entre un 40 a un 67% con la inclusión de una ración de *leche* o *yogurt*. De acuerdo con la valoración de la dieta media española del Panel de Consumo Alimentario del MAGRAMA, los adultos pueden consumir en el menú medio entre 379 y 419 g/persona y día del grupo de *leche y derivados* [259], equivalente aproximadamente a una ración de *leche* y una de *yogur* o dos raciones de *yogurt*, por lo que podría resultar factible y recomendable la inclusión de un lácteo fortificado en la dieta.

Deshmukh-Taskar y cols., en 2010 [258], evaluaron el impacto de no ingerir el desayuno y el tipo de desayuno consumido en la adecuación nutricional y calidad de la dieta en adultos entre 20-39 años (n=2615) procedentes de una muestra de la *Encuesta Nacional de Examen Salud y Nutrición* de los EE UU (de las siglas en inglés NHANES). Los investigadores encontraron que el grupo que incluía *cereales de desayuno* en su ingesta obtenían mejores índices de adecuación a los requerimientos generales de micronutrientes.

3.1.4. Gestación y Lactancia

En la gestación y la lactancia, los requerimientos nutricionales de la mujer se ven aumentados [23]. En la etapa de la gestación, es importante el mantenimiento del aporte de folatos a través de la dieta, ya que se añaden 200 µg de ácido fólico a las recomendaciones de la mujer en edad fértil: por ello, en muchos casos se recomienda la suplementación farmacológica con ácido fólico para asegurar los requerimientos. Sin embargo, en numerosos estudios [42] se ha visto una baja adhesión a los suplementos.

Si bien carecemos de datos representativos de la ingesta media de alimentos de este grupo de población, algunos estudios han evaluado la calidad nutricional de la dieta de mujeres gestantes encontrando que hasta un 26% de las encuestadas (n=103) no alcanzaba el 50% de las Ingestas Recomendadas de ácido fólico [260]. En otro estudio reciente, en una muestra de mujeres gestantes valencianas (n=782), el aporte dietético periconcepcional y hasta el 3er trimestre de ácido fólico fue de $307 \pm 100 \mu\text{g}/\text{día}$ [261]. Los autores concluyeron que la ingesta de alimentos por sí sola es insuficiente para que las embarazadas alcancen las IR de $600 \mu\text{g}/\text{día}$. Además, tras analizar la frecuencia e inicio de la toma de suplementos farmacológicos con ácido fólico, la encontraron insatisfactoria al iniciarse de forma tardía, y en escaso número de mujeres [261]. Las causas más frecuentes fueron la ausencia de planificación del embarazo y el desconocimiento del mismo hasta el 2do o 3er mes. En ninguno de estos estudios se evalúa el consumo de alimentos fortificados con ácido fólico.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, los desayuno modelo sin alimentos fortificados podrían aportar a una mujer gestante entre el 3 y 16% de sus IR de ácido fólico. En cambio, si se incluye al menos un alimento con un Nivel 1 de fortificación, le aportarían entre un 8 y un 20% de sus IR. Si se considera el Nivel 4 de fortificación, los aportes serían de entre un 26 y un 45%, es decir, unos aportes de dos a siete veces superior al de los desayunos con alimentos sin fortificar. En el *Escenario 2*, en el cual se combina el aporte de 2 o 3 alimentos fortificados, observamos que se alcanza entre el 14 y el 60% de las IR.

En el caso de los estados fisiológicos donde se incrementan las necesidades nutricionales de folatos, la inclusión de al menos un alimento fortificado podría ser de utilidad para alcanzar las IR de ácido fólico. Por otro lado subrayar que no siempre será necesario incluir mayor número de alimentos fortificados para tener un buen aporte mientras se consuman fuentes naturales de folatos como el zumo de naranja natural, que puede aportar entre el 15 y el 20% de las IR de ácido fólico por ración.

3.1.5. Adultos y personas mayores

Como se señaló anteriormente, las ingestas dietéticas de la población adulta española resultan en general insuficientes en folatos (Panel de Consumo, MAGRAMA [38]). En el presente trabajo, se ha estudiado la adecuación de los modelos de desayuno por separado para hombres y mujeres, dadas las diferencias en las Ingestas Recomendadas (IR) de energía de cada género [138]. Además, las IR para la población española de hombres es también de 400 $\mu\text{g}/\text{día}$ [138], siendo similar desde los 14 años a la edad adulta, y también para las personas mayores, por lo que se discutirán estos resultados en conjunto. Los distintos modelos de desayuno planteados sin inclusión de alimentos fortificados cubren las IR de ácido fólico de estos segmentos de edad entre un 5 y 25%. Al incluir un alimento fortificado, tal como se plantea en el *Escenario 1*, el aporte de ácido fólico aumenta alcanzando un 60% de las IR; y en el *Escenario 2* el cual incluye dos o tres alimentos fortificados, entre el 52 y el 90% de las IR. Si consideramos los datos que nos aporta la valoración del Panel de Consumo del MAGRAMA [38] de la adecuación a las IR de ácido fólico en hombres adultos ($\approx 50\%$ IR), podríamos decir también que para este grupo los alimentos fortificados podrían contribuir a alcanzar las necesidades diarias de la vitamina.

El porcentaje de población mayor de 65 años representa un 17% de la población total, de acuerdo con los datos de 2010 del Instituto Nacional de Estadística (INE) [262]. El envejecimiento poblacional es una realidad tanto en España como en resto de Europa. Es necesario tener en cuenta que nos referimos a un segmento de gran heterogeneidad en lo que se refiere al estado de salud. Sin embargo, de modo general, en las personas mayores puede aumentar la incidencia de deficiencias nutricionales, al presentarse situaciones de riesgo nutricional como la soledad, enfermedades crónicas, institucionalización en residencias geriátricas, etc. Además, la propia dieta se empobrece o se dan cambios fisiológicos que dificultan la absorción y el metabolismo de los nutrientes [263, 264]. Así, es común que la absorción de folatos se vea afectada por la

gastritis atrófica y que el metabolismo pueda verse alterado por el consumo de antiácidos, fármacos antiinflamatorios y diuréticos [136]. Al igual que en las etapas anteriores, interesa lograr una adecuación a las Ingestas Recomendadas para un estado de salud óptimo pero, además, para su mantenimiento y mejora. Los resultados del Estudio ENUCAM realizado en la Comunidad de Madrid, nos indican que la ingesta media de ácido fólico en hombres y mujeres mayores de 65 años es de $336,1 \pm 137,7 \mu\text{g}$ [3], es decir, aproximadamente un 84% de sus IR. Estos datos, podrían indicarnos que este grupo de edad no necesitaría incluir alimentos fortificados en el desayuno. Si bien, hay que ser cautos a la hora de valorar a qué grupo de personas mayores nos estamos refiriendo, ya que otros estudios, por ejemplo en mayores institucionalizados, encuentran deficiencias en folatos [264].

El riesgo mejor caracterizado del excesivo consumo de ácido fólico es el enmascaramiento de la deficiencia en vitamina B₁₂ en personas mayores [78]. Cabe preguntarse entonces si existe un problema de deficiencia de vitamina B₁₂ en los grupos de población de personas de edad española. Si bien la población adulta española ingiere dietas de elevado contenido proteico y ricas en alimentos de origen animal, que son fuente de la vitamina (la adecuación a las IR es del 512% de las IR [38]), se sabe que en las personas de edad la ingesta y la eficacia en la absorción de determinados nutrientes disminuye, entre ellos la vitamina B₁₂ [128].

Además, algunos autores sostienen que el estatus en vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico puede influir en los estados de depresión y demencia senil asociados a la edad [136]. Se ha visto que una situación nutricional inadecuada puede tener una importante influencia sobre la función mental: por ejemplo en la pérdida de memoria inmediata y episodios de confusión. Esta situación podría llevar, a su vez, a un empeoramiento de la ingesta de alimentos y, por tanto, del estado nutricional y de la enfermedad.

3.2. Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población infantil y adolescente: Estudio enKid.

En este apartado nos propusimos evaluar los niveles de fortificación con ácido fólico obtenidos de forma analítica, aplicados a los niveles de consumo de alimentos del grupos de población en la edad infantil (enKid) [2], es decir, si podrían aportar niveles adecuados de las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico o por el contrario, podrían exceder los Niveles Máximos Tolerables de Ingesta (NMT) de esta vitamina [78, 138]. Se incluyó un alimento fortificado en cada evaluación, basándonos en los resultados que obtuvieron Sichelert-Hellert y cols. en 2004 [236], quienes observaron que la mayor parte de la población de niños alemanes estudiada (61%) consumía al menos un alimento fortificado con ácido fólico al día.

La inclusión de un alimento fortificado con ácido fólico, de acuerdo con los datos de consumo medio del estudio enKid en población infantil [2] indica que los niños y niñas entre 2 y 5 años serían el grupo que mayor aporte de ácido fólico recibiría, concretamente a través del consumo de los yogures con un Nivel 4 de fortificación, cubriendo un 111% de sus IR de ácido fólico, en el nivel medio de consumo y un 300% de las IR en el percentil 90 de consumo (P90). Con el contenido de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) obtenido en los análisis de estos alimentos, el aporte a las IR de ácido fólico sería de entre el 5 y el 13.5% para este mismo segmento de población, en el nivel medio y P90 de consumo respectivamente. Este resultado es lógico ya que las IR para este segmento de edad son las más bajas entre los grupos de edad estudiados [2].

Mediante el análisis segmentado del estudio enKid en niños y adolescentes entre 2 y 24 años, Serra-Majem y cols. [265], observaron que el grupo de las niñas entre 14 y 17 años (n=241) presentaban mayor riesgo de ingestas inadecuadas de nutrientes, entre ellos de folatos, con un $<2/3$ de las IR. Definiendo el “Riesgo de Ingesta Inadecuada” como el $<1/3$ y el $<2/3$ de las IR [265]. En esta evaluación, los

autores indicaron que las deficiencias reales de folatos no se apreciaban a edades tempranas sino a partir de la pubertad cuando aumentan considerablemente los requerimientos y la calidad nutricional de la dieta es menor [265]. En nuestro trabajo, analizamos el consumo de alimentos y el aporte de ácido fólico hasta los 13 años, pero en este grupo de edad se observa que el aporte a las IR de ácido fólico siempre resulta menor dado el menor consumo de alimentos potencialmente fortificables. Por ejemplo, si evaluamos la contribución a la ingesta media de los yogures fortificados con el Nivel 4 de fortificación, éste es del 36% de las IR frente al 111% de las IR que aportan al segmento entre 2 y 5 años. En todo caso, cabe destacar que el aporte de los alimentos fortificados en el segmento de edad de niños y niñas entre 10 y 13 años (34-36% IR) sería significativo si consideramos que a estas edades hay mayor riesgo de deficiencia de nutrientes, y no se debe olvidar que se trata de la inclusión de un único alimento.

Por otro lado, si evaluamos los Niveles Máximos Tolerables de Ingesta (NMT) alcanzados con los yogures fortificados con el Nivel 4, se observa que para los niños y niñas de entre 2 y 5 años, éstos niveles se superan en aproximadamente un 50%, pero únicamente en el P90 de consumo. Son necesarios más estudios que evalúen la ingesta, para conocer si el aporte de alimentos fortificados con ácido fólico en este segmento de edad supondría un consumo excesivo de la vitamina.

Las *leches* fortificadas con un Nivel 4 superarían los NMT de ingesta del segmento de edad entre 2 y 5 años entre un 17 y un 27%. Sin embargo, los *cereales de desayuno*, grupo mayoritario analizados de la Base de Datos, en el Nivel 4 de fortificación, no superan en ningún caso los NMT de ingesta. Yeung y cols. [253] estudiaron en una muestra de población infantil norteamericana (n=7161, Estudio NHANES, 2003-2006) el aporte de ácido fólico de los *cereales de desayuno*. En este país se encuentra implantada la fortificación obligatoria, es decir, el aporte de ácido fólico podría ser mayor que en la población española. Los autores estimaron que el consumo de *cereales de desayuno* no contribuía a

superar los NMT de ingesta [253]. De hecho, únicamente el grupo que consumía suplementos con ácido fólico superaba los NMT, lo que también observaron Bailey y cols. [57], en un análisis previo a la misma población, pero específicamente en el segmento de edad entre 1 y 13 años (n=5756), en el cual estimaron que únicamente los usuarios de suplementos vitamínicos superaban hasta en un 50% los NMT de ingesta de ácido fólico. Resaltar que ambos grupos de trabajo especifican que la evaluación del aporte de ácido fólico de la ingesta se basa en los valores declarados en el etiquetado que, reconocen, podría subestimar la ingesta [57, 253].

Lógicamente, los NMT establecidos para los niños son menores que para los adultos, por lo que podrían ser el grupo más vulnerable cuando hablamos de exceder dichos niveles. Los NMT de ingesta para los niños proceden de una extrapolación en función al peso corporal, de los niveles establecidos para adultos, los cuales están basados en el enmascaramiento de la deficiencia de vitamina B₁₂, el cual se considera un riesgo asociado a las personas mayores [19].

Cabe preguntarse cuáles son los grupos de alimentos más consumidos por los niños y adolescentes. Lo que parece estar claro a partir de los resultados de los estudios de ingesta de alimentos como el enKid, es que las dietas de niños y adolescentes son escasas en las principales fuentes de folatos: verduras de hoja verde, frutas y legumbres [252]. Los niños y adolescentes presentan preferencias por la pasta y el arroz, que podrían sustituir a los vegetales y legumbres en los primeros platos y guarniciones. Además, el consumo de bebidas azucaradas tipo “refrescos” o néctares a partir de concentrados de fruta, en muchos casos parecen estar sustituyendo la ingesta de frutas frescas [252].

Sin embargo, Serra-Majem en un artículo publicado en 2001, discutió acerca de la necesidad de la fortificación de alimentos como estrategia de mejora a la vista de las deficiencias nutricionales de los niños europeos [266], concluyendo

que ésta no debería en ningún caso sustituir a la educación nutricional de la población, si bien se ha visto que la segunda es una estrategia de intervención menos eficaz para la adquisición o mejora de hábitos [36, 266]. Lo que parece estar claro para las autoridades en materia de salud pública, es que los niños en edad escolar temprana representan un punto clave para la actuación en materia de educación nutricional.

El beneficio de la inclusión de alimentos fortificados con ácido fólico debe ser evaluado siempre en el contexto de una dieta equilibrada y no de forma aislada. Si bien no ha sido el objeto del presente trabajo, interesa conocer la composición de estos alimentos también en cuanto a macronutrientes (grasas, hidratos de carbono, azúcares, etc.), para evaluar el impacto en la dieta de los niños, ya que muchos de estos alimentos “ricos en vitaminas y minerales” también presenta una cantidad elevada de azúcares simples y sodio [266].

3.3. Aplicación de los valores analíticos de los alimentos fortificados con ácido fólico a los datos de consumo de alimentos en población adulta: Estudio ENUCAM

La Encuesta de Nutrición de la Comunidad de Madrid en población adulta (ENUCAM) (2009) [3] se llevó a cabo en una muestra representativa de la población de la Comunidad de Madrid compuesta por 1553 personas, hombres y mujeres de 18 a 44 años, de 45 a 64 años y ≥ 65 años. En la misma se recogió, entre otros datos, el consumo diario de distintos grupos y subgrupos de alimentos mediante la utilización del Recuerdo de 24 horas y el Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos.

De acuerdo con los resultados de este estudio, obtenidos en el grupo de mujeres en edad fértil, el segmento de edad de entre 25 y 34 años es el que realiza un mayor consumo medio de *leche* desnatada, y donde encontramos el aporte más significativo de ácido fólico a través de la ingesta de un alimento fortificado. Así, para el Nivel 4 de fortificación, el aporte de ácido fólico es de entre

el 19 y el 23% de sus IR. En el P90 de consumo, la *leche* semidesnatada supondría un aporte del 72% de las IR de ácido fólico. El aporte de folatos por medio de la dieta base, evaluados mediante cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA), indica que es de $329 \pm 142,9$ $\mu\text{g}/\text{día}$, que supone un 82% de las IR de ácido fólico. Los CFCA tienen una mejor representatividad de la dieta diaria que los Recordatorios de 24 h, el otro método de valoración de la ingesta del estudio ENUCAM. Estos valores son bastante más elevados que los datos a nivel nacional que se encuentran en la valoración de la dieta de acuerdo al Panel de Consumo, que es del 52% de las IR de ácido fólico [38]. Si bien, hay que mencionar que ambos estudios utilizan diferentes metodologías de evaluación de la ingesta.

Para la población de hombres y mujeres adultos y personas mayores, la *leche* semidesnatada presenta el mayor consumo medio en todos los grupos de edad y sexo. El aporte medio de ácido fólico se encuentra entre el 15 y el 21% de las IR, siendo mayor para las mujeres mayores de 65 años. En el P90 de consumo, las mismas recibirían aún mayor aporte, el 67,4%, mientras que los grupos de edad restantes alcanzarían un 56% de sus IR, niveles elevados, considerando que provienen de un único alimento. Para la *leche* entera se observan mayores niveles de consumo medio en los hombres más jóvenes (entre 18 y 44 años), a los cuales aportaría un 18% de sus IR de ácido fólico (Nivel 4 de fortificación). En el P90 de consumo, el aporte de ácido fólico para este mismo grupo de edad se triplica, llegando hasta un 54% de las IR.

Si comparamos con el aporte medio de folatos de la dieta habitual en este mismo estudio (ENUCAM) [3], la ingesta diaria de las mujeres mayores de 65 años es de $336,1 \pm 137,7$ $\mu\text{g}/\text{día}$ y de $337,1 \pm 143,4$ $\mu\text{g}/\text{día}$ para los hombres, es decir, un aporte del 84% de sus IR. Para los hombres entre 18 y 44 años, la ingesta diaria de folatos es de $348,5 \pm 140,7$ μg (87% de las IR), es decir que de acuerdo a estos valores no existiría riesgo de deficiencia al ser $\geq 2/3$ IR%.

Los datos de composición de los alimentos utilizados en el estudio ENUCAM provienen de las Tablas de Composición de Alimentos publicadas por Moreiras y cols. en 2010 [224], con datos de composición de alimentos fortificados muy limitados y que son los aportados por el fabricante en el etiquetado nutricional del envase. Concretamente, estas Tablas contienen los datos de ácido fólico de los *cereales de desayuno* de una de las marcas líderes del mercado. Sin embargo el consumo de estos productos en adultos es muy poco significativo.

Estos valores son muy diferentes a los datos de ingesta de folatos provenientes de la valoración de la dieta española de acuerdo del Panel de Consumo Alimentario del MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) [27, 28], que nos indican para hombres y mujeres unos valores similares $\approx 207 \mu\text{g}/\text{día}$, es decir, un aporte del 52% de los requerimientos de ácido fólico a través de la dieta habitual. Las fuentes principales de acuerdo a esta valoración son las verduras de hoja verde y las vísceras. Hay que tener en cuenta que de acuerdo a la metodología utilizada en el Panel de Consumo, estos datos podrían estar sobrestimando las ingestas, ya que consideran las compras totales de los alimentos de un hogar, y parte de estas no llega a ingerirse, o bien existe una distribución desigual entre los miembros del entorno familiar, pero dichas divergencias pero no pueden ser cuantificadas [27]. En la conversión de los alimentos a energía y nutrientes también se utilizaron Tablas de Composición de alimentos españolas con datos limitados de alimentos fortificados [267].

Autores como Konings y cols. [99] también estimaron las ingestas de folatos de la población a partir de datos analíticos, en este caso de los 35 alimentos que más contribuyen a la ingesta de folatos de la población Holandesa, que fueron analizados mediante cromatografía de afinidad-HPLC. Los autores compararon los valores obtenidos con los publicados provenientes de análisis mediante ensayo microbiológico y encontraron que los suyos resultaron aproximadamente un 25% más bajos (HPLC).

Las ingestas actuales de la población española no parecen cubrir las necesidades de folatos, pero además podemos decir que si se trata de folatos naturales, se ha establecido que su biodisponibilidad es menor que la del ácido fólico sintético, por lo que para alcanzar las IR de la vitamina necesitaríamos una mayor ingesta mediante los alimentos no fortificados. La biodisponibilidad de los folatos puede definirse como la proporción de una cantidad ingerida de folatos que se absorbe en el intestino y se encuentra disponible para los procesos metabólicos. En los estudios de intervención en humanos, la biodisponibilidad relativa se suele evaluar mediante comparación con una dosis de referencia de ácido fólico.

Varios investigadores han discutido que esto sea así: Winkels y cols. [268] han observado que la biodisponibilidad de los folatos procedentes de los alimentos es del 80% de la del ácido fólico. Los estudios llevados a cabo por Winkels y su grupo en humanos han consistido en la administración de dietas variadas incluyendo frutas, vegetales e hígado, durante 4 semanas y la administración conjunta diaria de ácido fólico marcado, como vitámero de referencia. Pentieva y cols. [251] han observado que las biodisponibilidades de ambos son equivalentes a corto plazo cuando se ingieren dosis de ambos tipos de vitámeros y se mide su presencia en plasma a las 10 h así como el área bajo la curva que genera cada uno.

Sin embargo, en una revisión reciente de Wright y cols. [269] se recuerda que el sitio metabólico inicial de transformación para el ácido fólico son las células hepáticas y no el enterocito como se aceptaba en el pasado, y que las enzimas hepáticas parecen tener mayor afinidad por el ácido fólico oxidado que por los folatos reducidos. Por este motivo los autores consideran que no es adecuado comparar las dosis de folatos naturales con dosis de ácido fólico de referencia en los estudios de biodisponibilidad, como los anteriormente citados.

Queda por esclarecer si en el contexto de una dieta variada y equilibrada, el aporte de folatos naturales es insignificante en comparación con el ácido fólico. Lo que parece estar claro es que en países como España, donde no se aplica la fortificación obligatoria, la contribución de los folatos de los alimentos es sumamente importante, aunque no sea suficiente para alcanzar las recomendaciones [28, 59, 270].

La ingesta de frutas y verduras, así como de legumbres, principales fuentes alimenticias de folatos naturales, en España es insuficiente o está por debajo de los niveles recomendados [38, 271]. Actualmente, se recomienda a las mujeres en edad fértil que tomen una cantidad diaria de 400 µg de ácido fólico para la prevención de un embarazo afectado por defectos del tubo neural (DTN). La dieta media habitual de la mujer española no parece cubrir estos requerimientos, pero cabe preguntarse si esta cantidad puede ser alcanzada a través de la elección de alimentos voluntariamente fortificados con ácido fólico, complementando la dieta.

Si hablamos de las mujeres en edad fértil, sus requerimientos de ácido fólico, establecidos en 400 µg/ día, puede ser equivalente a el consumo diario de los siguientes alimentos (fuentes naturales, de acuerdo a las Tablas de composición de alimentos españolas [91]):

- 1,5 raciones de espinacas, acelgas o col rizada (1 ración = 200 g de porción comestible de alimento).
- 3 raciones de garbanzos (1 ración = 75 g de porción comestible de alimento).
- 5,5 raciones de naranja (1 ración = 200 g de porción comestible de alimento = 6 naranjas medianas aproximadamente).

De estos ejemplos podríamos deducir que si bien difícilmente una mujer consumirá 6 naranjas diarias, con una dieta variada en grupos de alimentos podríamos alcanzar los niveles de folatos necesarios. Sin embargo, la dieta media

de una mujer española, tal como se deduce de los datos del MAGRAMA [27], sólo aportaría la mitad de las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico, lo cual apunta a que con la dieta española actual no se ingiere suficiente. Ya en un trabajo publicado en 2001, Serra-Majem y cols. [272] advertían que la ingesta de vegetales, frutas y productos frescos en general, ha disminuido en España en favor de un mayor consumo de alimentos procesados, productos cárnicos, lácteos y derivados.

En nuestro estudio de simulación, mediante los datos de ingesta de alimentos potencialmente fortificables en combinación con los datos analíticos del contenido en ácido fólico y folatos (5MTHF) de los alimentos, observamos el nivel potencial de IR expresado como porcentaje, aportado por los alimentos fortificados, así también obtuvimos el aporte de folatos naturales (5MTHF) de estos alimentos que es, por lo general, de 8 a 10 veces inferior al aporte de ácido fólico sintético añadido.

Un grupo de trabajo de la Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda (FSAI, siglas del inglés *Food Safety Authority of Ireland*) [41], país donde existe una amplia penetración de la fortificación voluntaria con ácido fólico, estudió la contribución de los alimentos fortificados a la dieta, observando que la utilización de 28 de los 211 productos comerciales fortificados disponibles, consumidos en distintas combinaciones en el desayuno, almuerzo, cena y snacks podrían aportar unos 400 µg/día de ácido fólico. Cabe destacar que en su estimación utilizaron los valores promedio de ácido fólico declarados por los fabricantes por 100 g o por ración [41] y no datos analíticos, con lo que podría existir una subestimación. En nuestro estudio, si bien no realizamos combinaciones de alimentos para los datos de consumo del estudio ENUCAM, la inclusión de un único alimento fortificado podría contribuir hasta en un 72% a las Ingestas Recomendadas de ácido fólico de las mujeres en edad fértil en el P90. Por otro lado, este mismo grupo en Irlanda [41] observó que hasta un tercio de los productos fortificados con ácido fólico no presentaba la información del contenido en ácido fólico por ración habitual en el

etiquetado, lo cual entendieron que podría presentar una mayor dificultad para que el consumidor pueda estimar su ingesta. En el presente trabajo encontramos que un 80% de los productos fortificados con ácido fólico sí declaraban en el etiquetado nutricional el contenido en ácido fólico por ración recomendada por el fabricante, facilitando así al consumidor la estimación de su ingesta. Pero cabría entonces preguntarse si al consumidor le interesa o busca esta información. De los resultados del Observatorio de Consumo del MAGRAMA, se desprende que el consumidor valora muy positivamente el que los productos declaren en el etiquetado las *“propiedades del alimento en relación con la salud”* [230].

En un trabajo llevado a cabo en Holanda por Vliet y cols. [273], se utilizaron grasas vegetales untables fortificadas con ácido fólico, B₆ y B₁₂ con objeto de estudiar su efecto en la homocisteína plasmática en población de adultos sanos y el estatus en vitaminas del grupo B. Las muestras alimentarias utilizadas se prepararon especialmente a un nivel de 200 y 400 µg de ácido fólico por ración, que cada grupo consumió durante seis semanas. Los autores observaron un importante aumento en el folato sérico (hasta un 146% en las mujeres) y una reducción significativa de homocisteína plasmática, tanto en mujeres como hombres, que alcanzó un nivel medio máximo del 23,3%, demostrando un efecto importante de la adición de estas tres vitaminas frente a las grasas untables sin fortificar [273].

En los resultados procedentes de adultos americanos del Estudio NHANES (siglas del inglés, National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006, n=8258) también se ha observado lo previamente observado en población infantil [274], que únicamente la combinación de los alimentos fortificados de forma obligatoria + *cereales de desayuno* + suplementos vitamínicos, resultan en un exceso del NMT de ingesta.

El segmento de las personas mayores, presenta como ya se ha discutido, gran heterogeneidad y vulnerabilidad, con una problemática nutricional asociada a diferentes casos de malabsorción, polimedicación, exclusión social, dietas desequilibradas y/o deficientes por olvidos, depresión y demencia, movilidad reducida, enfermedades degenerativas etc., que pueden contribuir al desarrollo de malnutrición, aumentando el riesgo si nos referimos a personas institucionalizadas. [275]. Del Pozo y cols. [164] observaron que de acuerdo a los datos del Estudio Euronut-SENECA, las personas mayores españolas “sanas”, de entre 71 y 80 años, mostraban un patrón de ingesta más cercano a los de la Dieta Mediterránea tradicional que los grupos de edad más joven. Sin embargo, dichas ingestas no eran suficientes para alcanzar las Ingestas Recomendadas de muchas vitaminas y minerales, entre ellas el ácido fólico [164].

En un análisis de menús de cuatro residencias geriátricas españolas realizado por Milá y cols. [263], se encontró que en la planificación de los menús de tres semanas, existía deficiencia en folatos y otros nutrientes, con una ingesta media diaria que iba entre 199 y 256 $\mu\text{g}/\text{día}$, y por otro lado la ingesta de B_{12} era suficiente o incluso excesiva, entre 3,5 y 7,2 $\mu\text{g}/\text{día}$. Como ya se ha comentado, de acuerdo con la Valoración de la Dieta según el Panel de Consumo [38], la ingesta de vitamina B_{12} de la población adulta española es de aproximadamente un 512% de las IR. Podría decirse por tanto, que no habría problemas de deficiencia en B_{12} , sin embargo, estos datos proceden de adultos más jóvenes. Los datos de Del Pozo y cols. [164] muestran que las ingestas de las personas mayores del estudio Euronut-SENECA, superaban sus IR de vitamina B_{12} ($>2 \mu\text{g}/\text{día}$), mientras que aproximadamente cubrían el 25% de las IR para el ácido fólico.

Los resultados del estudio ENUCAM en combinación con nuestros datos analíticos de contenido en ácido fólico en alimentos, indican que para los hombres y mujeres mayores de 65 años, la *leche* y *yogur* desnatados serían los alimentos potencialmente fortificables a partir de los cuales alcanzarían un mayor porcentaje de sus Ingestas Recomendadas ($\approx 18\text{-}20\%$ IR), dado el mayor consumo de estos

alimentos por parte de este segmento. Además, en ningún caso superarían los Niveles Máximos Tolerables de Ingesta de ácido fólico. Se desconoce el nivel de consumo de alimentos fortificados por parte de este segmento de población. El mayor coste de los alimentos fortificados, al igual que su desconocimiento, pueden ser inconvenientes adicionales en la adquisición de los mismos para el segmento de las personas mayores y otros grupos de población de menor poder adquisitivo [270].

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El ácido fólico es la forma sintética perteneciente al grupo de vitámeros hidrosolubles que se denominan genéricamente “folatos” o vitamina B₉. Se trata de un nutriente esencial involucrado en la prevención de la anemia macrocítica [66]. Desde principios de los años 90, se sabe que la suplementación con ácido fólico durante la etapa periconcepcional y en los primeros estadios de la gestación reduce, en aproximadamente un 70% de los casos, la incidencia de una serie de malformaciones congénitas conocidas como Defectos del Tubo Neural (DTN) [5, 21]. En la segunda mitad del siglo pasado se ha estudiado además su papel potencial en la prevención de la enfermedad cardiovascular [119], el cáncer colorectal [143] y la degeneración neurocognitiva [73].

La fortificación obligatoria con ácido fólico de alimentos básicos de consumo es una estrategia de Salud Pública que se ha implementado en muchos países y de forma global, con objeto de mejorar la ingesta de folatos de las mujeres en edad periconcepcional. Sin embargo, en Europa, las autoridades han priorizado la preocupación sobre los efectos a largo plazo derivados de aumentar las ingestas de ácido fólico de toda la población, especialmente en las personas mayores, donde un exceso de ácido fólico podría enmascarar una deficiencia en vitamina B₁₂. Por este motivo, la opción seguida hasta la actualidad, es la fortificación de los alimentos con ácido fólico de forma voluntaria [59, 276].

La ingesta de folatos en la población española ha sido evaluada en varios estudios (MAGRAMA [38], enKid [2], ENUCAM [3]), encontrándose deficiencias en grupos de población diana y vulnerables como son las mujeres en edad fértil, los niños y las personas mayores. La ingesta media diaria de folatos de los adultos se estimó en aproximadamente 250 µg, es decir, aproximadamente un 45% de las Ingestas Recomendadas para la población española adulta. Las fuentes dietéticas mayoritarias de folatos son las verduras de hoja verde y las legumbres. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el impacto del consumo de los alimentos fortificados con ácido fólico.

De acuerdo a estudios previos, realizados por nuestro grupo de investigación, en los últimos años se ha observado una fuerte irrupción de los alimentos fortificados

con ácido fólico en el mercado español. Los operadores alimentarios realizan la fortificación de diversos grupos de alimentos y con distintos niveles de ácido fólico [214]. Los datos de composición de estos productos son escasos en la literatura y la mayoría de Tablas de Composición de Alimentos españoles incluye sólo un número limitado de los mismos. Por este motivo, las ingestas de folatos están probablemente subestimadas. Además, algunos autores han indicado la existencia de sobrefortificación en los alimentos, es decir, que los fabricantes añaden cantidades de vitaminas superiores a las declaradas en el etiquetado [12, 277] y aún se encuentra en discusión la idoneidad de los métodos de análisis de folatos disponibles. Por todo ello, las ingestas de la población, y el aporte de los alimentos fortificados con ácido fólico son difíciles de evaluar. Este hecho es de gran importancia dado que, por una parte, las ingestas sub-óptimas o deficientes podrían dar lugar a distintas patologías, y por otra, se desconocen los posibles efectos adversos o riesgos de la exposición a largo plazo de altas concentraciones de ácido fólico.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pretenden servir de herramienta para la evaluación de la fortificación voluntaria con ácido fólico. De este modo, la Base de Datos desarrollada y actualizada constituye una fuente de información para la estimación de las ingestas de ácido fólico en España.

Asimismo, los datos de composición en ácido fólico y folatos obtenidos de forma analítica han sido comparados con las declaraciones de los fabricantes para estudiar la adecuación de los mismos.

Finalmente, la evaluación de la ingesta potencial de productos fortificados con ácido fólico nos permite una aproximación a la contribución que estos alimentos aportan a los requerimientos de la población española.

Las conclusiones que se derivan de nuestros resultados se exponen a continuación:

1. En cuanto a la Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en el mercado español

- 1.1.** La Base de Datos de composición de alimentos fortificados con ácido fólico es una herramienta de utilidad para el manejo, actualización y obtención de información acerca de los niveles de fortificación declarados. Resulta esencial utilizar vocabulario y modos de expresión estandarizados con el fin de poder intercambiar datos con otras Bases de Datos a nivel internacional.
- 1.2.** La disponibilidad de datos actualizados es de interés para la evaluación y análisis de las ingestas dietéticas de folatos y ácido fólico de la población. Es necesario establecer actualizaciones periódicas de esta Base de Datos para proveer de datos útiles a los usuarios potenciales.
- 1.3.** Los 375 alimentos recogidos en el inventario exhiben una gran variabilidad en los niveles de fortificación con ácido fólico adicionados. Sin embargo, la mayor proporción de productos se encuentra fortificada en un nivel que aporta $\leq 35\%$ de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) por ración declarada ($\%CDR/ración$), de acuerdo a la información recogida en el etiquetado nutricional.
- 1.4.** El etiquetado que presentan los alimentos fortificados, si bien es completo de acuerdo a los requerimientos legales, informa de forma directa en una baja proporción del contenido en ácido fólico o de los beneficios para la salud de una adecuada ingesta. El mayor porcentaje de alimentos fortificados con ácido fólico carece de población diana de consumo. Es esencial que se identifiquen los grupos diana de consumo en la población, dado que cada segmento tiene una problemática y requerimientos de ácido fólico específicos.

Conclusión general:

La información y datos recopilados pueden ser de gran utilidad para diversos fines relacionados con la investigación del estatus en folatos de la población española. Los alimentos fortificados con ácido fólico inventariados si bien pueden aportar una cantidad significativa de las Cantidades Diarias Recomendadas para la población general, no están enfocados a las mujeres de edad fértil, grupo de población diana para beneficiarse de su consumo.

2. Sobre al análisis de un número representativo de alimentos fortificados con ácido fólico mediante dos métodos validados

- 2.1.** El grado de concordancia obtenido entre los métodos analíticos utilizados indicó que el análisis mediante cromatografía de afinidad y HPLC podría predecir los resultados obtenidos con el ensayo microbiológico, considerado habitualmente de referencia. El ensayo microbiológico puede utilizarse como análisis de rutina para alimentos fortificados con ácido fólico cuando no se dispone de otros métodos. Sin embargo únicamente el método de cromatografía de afinidad-HPLC es capaz de identificar los vitámeros, cuestión esencial cuando se trata del análisis de alimentos fortificados con ácido fólico. Los datos obtenidos por ambos métodos, para los 154 alimentos tienen la validez adecuada para ser incluidos en la Base de Datos actualizada, utilizando los identificadores para los distintos vitámeros según lo recomendado por el tesoro editado por EuroFIR [180].

- 2.2.** De acuerdo con los datos analíticos de ácido fólico obtenidos por cromatografía de afinidad-HPLC, los niveles de fortificación fueron superiores en el subgrupo de las *leches líquidas*; además, en éstas se observaron una mayor proporción de productos con valores analíticos significativamente superiores a los declarados en el etiquetado por los fabricantes, es decir, en el Nivel 4 de fortificación. Otro subgrupo que presentó esta tendencia fue el de las *galletas*, en el Nivel 3 de fortificación.

- 2.3.** En el subgrupo de los *yogures y leches fermentadas*, se obtuvieron valores significativamente inferiores a los declarados por el fabricante en el Nivel más elevado de fortificación (Nivel 4). En cambio, los *cereales de desayuno* se sitúan en los Niveles inferiores (Niveles 1 y 2).
- 2.4.** Atendiendo al grupo diana de población, se observó que los productos dirigidos a *niños* presentaban una mayor proporción de productos fortificados con el Nivel 4, frente a lo que declaran los fabricantes en el etiquetado de estos alimentos. Para el grupo de *madres/mujer* destaca que, si bien el número de productos ofertados es reducido, la totalidad de los mismos presenta el mayor nivel de fortificación (Nivel 4).

Conclusión general:

Los resultados obtenidos en una muestra representativa de alimentos fortificados con ácido fólico nos indican que en las *leches* y *galletas* comercializadas en el mercado español, existe una sobrefortificación generalizada por parte de los fabricantes. Por otro lado, una proporción de los *cereales de desayuno* y de los *yogures y leches fermentadas* presentan valores inferiores a lo declarado en el etiquetado nutricional.

3. De acuerdo a los modelos de simulación de ingesta de desayuno y datos de consumo provenientes de estudios en población española

- 3.1.** La evaluación de los distintos escenarios y modelos de desayuno, que incluyó un producto fortificado o bien la combinación de dos o tres, fue realizada para varios segmentos de edad en función a la adecuación a las Ingestas Recomendadas (IR) para población española y los Niveles Máximos Tolerables (NMT) de ingesta. Los *yogures* fortificados con el Nivel 4 aportaron la mayor contribución a la ingesta de los distintos grupos, y únicamente el segmento de los niños entre 1 y 3 años de edad presentó riesgo de exceder el NMT, a partir de la inclusión de un producto fortificado. Para el grupo de mujeres en edad

fértil, la inclusión de *leche* o *yogur* fortificado con el Nivel 4 podría aportar hasta el 60% de sus IR, y la combinación de dos o tres productos entre el 75 y el 90% de sus IR. Las mujeres embarazadas podrían obtener entre el 40 y el 45% de sus IR con la inclusión de un *lácteo* fortificado, lo cual supondría una importante contribución, y entre un 50 y 60% si combinan dos o tres productos, respectivamente.

- 3.2.** La contribución potencial a las ingestas de folatos para distintos grupos de población también fue estudiada mediante la combinación de datos publicados del consumo de alimentos y los datos de composición obtenidos de forma analítica para los *cereales de desayuno* y *leche* y *derivados*. Nuestros resultados indican que las mujeres en edad periconcepcional podrían ingerir una media del 19 al 23% de sus IR si sustituyeran su consumo de *leche*, especialmente la semidesnatada, por su homónimo fortificado con ácido fólico. De la misma forma, de acuerdo al consumo de *leche* semidesnatada que realizan las mujeres mayores, podrían obtener entre el 15 y el 21% de sus IR.

- 3.3.** De acuerdo a los datos que se desprenden del estudio en el segmento de los niños, únicamente aquellos entre los 2 y 5 años de edad alcanzarían el 100% de sus IR mediante el consumo medio de *yogur* fortificado con el Nivel 4. Asimismo, para este grupo, en el percentil más alto de consumo (P90) de *yogur*, podría existir un riesgo de superar los NMT de ingesta, si la fortificación se considera en el Nivel 4. Cabe resaltar que si bien los *cereales de desayuno* son el principal subgrupo de productos disponibles y fortificados con ácido fólico, su contribución potencial a las ingestas medias de los niños de entre 2 y 5 años es del 5,3% para el Nivel 1 y hasta el 20% de sus IR cuando se considera el Nivel 4 de fortificación.

Conclusión general:

De acuerdo a los Niveles de fortificación con ácido fólico observados en nuestro estudio, la inclusión de hasta tres productos fortificados como parte de un desayuno variado y equilibrado, podrían ser de gran interés nutricional para grupos vulnerables cuya ingesta sea deficiente en folatos, sin presentar un riesgo de ingestas excesivas.

Los niños y niñas son el grupo que presenta mayor vulnerabilidad de exceder sus Niveles Máximos Tolerables (NMT) de ingesta ya que, por una parte, son en muchas ocasiones grandes consumidores de alimentos fortificados y, por otra, sus NMT establecidos son más bajos. Sin embargo, únicamente el segmento de entre 1 y 3 años de edad podrían exceder potencialmente los Niveles Máximos Tolerables de ingesta mediante el consumo de dichos productos.

Considerando los niveles de consumo de alimentos actuales de la población española infantil y adulta, y los Niveles de fortificación obtenidos, la contribución de los *lácteos* fortificados (*leche* y *yogures*) con ácido fólico sería de mayor importancia que la de los *cereales de desayuno*, cuya variedad y número en el mercado es significativamente superior.

La definición del grupo diana de población, así como de la edad considerada y el conocimiento de los patrones o hábitos de ingesta de alimentos son de gran importancia para que la fortificación con ácido fólico sea de utilidad nutricional. Los resultados de nuestro trabajo indican que la fortificación voluntaria con ácido fólico en España podría contribuir de forma potencial y significativa a la mejora de las ingestas de folatos de los grupos vulnerables de población. Sin embargo, es importante subrayar que, por lo general, no contamos con datos fiables del consumo de alimentos fortificados, y existe la necesidad de diseñar y validar metodologías e instrumentos que incluyan los alimentos fortificados en la evaluación nutricional. Son necesarios por tanto, más estudios para evaluar el impacto potencial de la fortificación voluntaria en el estatus de folatos y el beneficio o riesgo que deriva de una ingesta insuficiente o excesiva de esta vitamina, en el contexto global de la dieta.

VII. SUMMARY

1. JUSTIFICATION OF THE RESEARCH

Folic acid (FA) is the synthetic form of a naturally occurring water soluble B-vitamin, generically known as “folate”. It is an essential nutrient involved in the prevention of macrocytic anemia [66]. In the second half of the last century, it was identified as a potential relevant factor in the prevention of cardiovascular disease [119], colorectal cancer [143] and neurocognitive decline [73], but most remarkably, it was proven to prevent in a high extent congenital abnormalities affecting the development of the spinal cord and central nervous system, known as neural tube defects (NTDs) [5, 21]. Mandatory fortification of the food supply with folic acid has been taking place in many countries worldwide in order to prevent NTDs, by means of improving folate intakes of women at a fertile age. In Europe, however, some safety concerns of a population based exposure to high folic acid intakes have been the main reason to restrict or deny fortification, and for most countries folic acid fortification only takes place at a voluntary basis.

Folate status of the Spanish population has been assessed in several studies (MAGRAMA [38], enKid [2], ENUCAM [3]), and deficiencies were found in target and vulnerable population groups such as women of childbearing age, children and the elderly. Average dietary folate intakes in adults were estimated to reach approximately 250 µg per day, that is, a 60% of Recommended Intakes. Major dietary sources were green leafy vegetables and legumes. Nevertheless, until date there is no reliable information on the impact of voluntarily fortified food consumption and intakes are probably underestimated. The estimation of micronutrient intake from fortified foodstuffs is a difficult task due to the absence of compositional data, and the rapidly growing market of these products.

Previous studies carried out by our research group revealed that availability of voluntarily folic acid fortified products is widespread in the Spanish market, and different levels of folic acid are added to diverse food groups by manufacturers [214]. However, data on folic acid fortified goods are scarce since Spanish food composition tables and databases do not include most of these items. In addition, methods for food folate and folic acid analysis are still under debate. Therefore, population dietary folate

intakes are extremely difficult to assess and monitor, and consequently, the contribution of folic acid fortified products remains mostly unknown. Meanwhile, consumer's choice is overwhelmed by a huge number of novel foods and recipes, namely convenience foods that may include folate as natural source, but also added folic acid. A convenient assessment of folate status is peremptory since suboptimal intakes of folic acid can exert a number of pathologies, and adverse effects and risks of long term exposure to high concentrations of folic acid are unknown.

2. AIMS

The main aim of this research work was to improve food folate and folic acid data and information in Spain, mainly in commercialized fortified products, in order to gain insight into their potential contribution to population's sufficient or excessive vitamin intake. Therefore, our objectives were:

- 2.1.** To update the developed folic acid fortified food composition database and harmonize its contents according to international guidelines for compilation.
- 2.2.** To analyze a representative sample of folic acid fortified products from the Spanish market by two different validated methods and to test for their concordance.
- 2.3.** To evaluate the adequacy of these foods products to provide Recommended folic acid Intakes or exceed tolerable Upper Intake Levels in vulnerable population groups, by using a simulation model approach.

3. MATERIALS AND METHODS

- 3.1. A previously developed Food Folate Composition Database was the initial point for updating, harmonizing and standardizing our data according to the EuroFIR/LanguaL [169] guidelines.
- 3.2. A folic acid fortified food inventory was compiled between December 2007 and May 2010 including label composition data on folic acid contents and nutritional or health claims as declared by manufacturers. Data per 100 g, target population or age group, recommended serving and vitamins B₆ and B₁₂ contents were also recorded.
- 3.3. Total folate was analyzed by microbiological assay [100] and affinity chromatography followed by HPLC quantification [101, 187] was used to determine folic acid and 5-MTHF. Both analytical methods were compared for concordance. A Standard Reference Material and an International Standard [194, 202] were used to test the accuracy of these analytical determinations.
- 3.4. An estimation of folic acid intakes was conducted performing simulation models with the obtained analytical data and the dietary intake data from Spanish food consumption surveys: enKid [2] and ENUCAM [3]. Folic acid intakes were calculated on the basis of consumption data substituting unfortified for fortified folic acid foodstuffs.

Please, refer to ANEXO 2 chapter for scientific publications derived from this research work.

4. RESULTS

4.1. Food Composition Database

A total of 375 folic acid fortified food products commercialized in the Spanish market were included in the Database. These were categorized in six main food groups and seventeen subgroups. *Cereals and derivatives* and *ready-to-eat breakfast cereals* are the main groups in each category, respectively. Of the total number of items, 75% (n=277) declared a level of folic acid fortification $\leq 35\%$ Spanish Daily Reference Intakes (DRI) per serving. The groups which declared higher levels of folic acid were *fats and oils*, namely *spreadable fats*.

Regular market update of the Database inventory showed an increase in number of available products when reviewed at least each year.

The major folic acid fortified food group, *cereals and derivatives*, was mainly fortified at Levels 1 and 2 (lower levels), which provide $\leq 25,9\%$ of Dietary Recommended Intakes (DRI) per declared serving. In contrast, *milk and derivatives* declared the higher proportions of Levels 3 and 4 (higher levels), providing more than 26% and $\geq 35\%$ of DRI per serving, respectively.

Joint fortification with vitamins B₆ and B₁₂ was observed in 86% of folic acid fortified items, mainly in *fats and oils* and *ready-to-eat breakfast cereals*. However, a lower fortification level for vitamins B₆ and B₁₂ was declared in *milk and derivatives*.

Level of fortification was also studied in manufacturer versus distribution brands. The higher proportion of distribution brand products were fortified at Level 3 whereas manufacturer's brands were equally distributed at the four fortification Levels defined.

Most products lacked a target population (43% of total). Main target population groups according to label marketing were *weight control* and *children*. Products specifically targeted at women of childbearing age were, surprisingly, only 2% and consisted of *milk and derivatives*.

Compliance with labeling regulation was satisfactory in 98% of folic acid fortified foods. The absence of a label declaration for folic acid content per 100 g was the main error, found mostly in imported products. Main label marketing strategies were *nutrient content claims*. Specifically, vitamin content claims were found in 66% of products, although only 36% claimed explicitly to contain folic acid. This claim was mainly observed in items which declared Levels 4 and 1 of fortification (highest and lowest).

Health claims were found in 17% of products, and only 11% of these were folic acid health claims, as authorized by the *European Food Safety Authority* (EFSA). It is noteworthy to outline that the higher proportion of these products declared a Level 1 (the lower) of folic acid fortification.

4.2. Fortified food analyses

Analyses were performed in 145 folic acid fortified food items including *breakfast cereals, cookies, milk, milk and derivatives (yogurt and fermented products)* and *non-alcoholic beverages*. Results are presented for total folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) content of each product by the two validated methods. Recovery values for affinity chromatography-HPLC were $85,3 \pm 6,2$ % for folic acid and $83,5 \pm 4,1$ % for 5-MTHF, and $100,3 \pm 9,2$ % for the microbiological assay. Intra and inter-assay precision, as well as linearity achieved were acceptable. Internal and external quality control materials were also used for testing accuracy of methods. Overall concordance of results by the two methods was considered optimal according to the intraclass correlation coefficient of 0,836 (CI of 95%: 0,612-0,915). Results of each method of analysis were also included in our compositional Database under EuroFIR component identifiers for each folate vitamers [180].

The highest levels of folic acid fortification were found in *breakfast cereals* with 51 to 400 µg of folic acid per 100 g and in *milk and derivatives*, with 19 to 358 µg of folic acid per 100 ml. Lower levels were obtained in *cookies* (42 to 186 µg of folic acid per 100 g) and *non-alcoholic beverages* (22 to 225 µg of folic acid per 100 g).

When comparing analyzed results to declared folic acid label values, significant differences ($p < 0.001$) were found for *breakfast cereals* fortified at Levels 1 and 2; in which analyzed values were lower than declared values. On the contrary, levels of analyzed folic acid were significantly higher in Level 3 fortified *cookies*. For *milk and derivatives*, *milk* products fortified at Level 4 resulted in significantly higher than declared folic acid values. However, in *yogurt and fermented milk* products that declared Level 4 of folic acid fortification, values were significantly higher than those obtained analytically.

4.3. Assessment of folic acid intake by simulation models

Designed scenarios for breakfast including one product, or the combination of two or three different folic acid fortified items from fortification Levels 1 and 4, were evaluated for different age groups as a percentage of their Recommended Intakes (RI, for Spanish population) and tolerable Upper Intake Limits (UL). Based on our data, Level 4 fortified *yogurt* was by far the highest contributor to intakes, but only the age group of 1 to 3 years could exceed UL, either by intake of one or three combined products with Level 4 fortification. For women of childbearing age, inclusion of Level 4 fortified *milk* or *yogurt* could provide about 60% of their RI, and the combination of 2 or 3 foods between 75 and 90% of their RI. Pregnant women could benefit from achieving 40-45% of their RI with one fortified *milk* product and 50-60% of their RI if they included 2 or 3, respectively.

Potential contributions to folate intakes in different Spanish population groups were also studied through the combination of available published food consumption data, and our analytical folic acid results for *breakfast cereals* and *milk and derivatives*. Our results indicate that women of fertile age could achieve on average 19 to 23% of

their RI if they substitute their regular dietary consumption of milk, namely semi-skimmed, with a fortified product. Similarly, elderly women could reach on average 15 to 21% of their RI from semi-skimmed fortified milk.

We found that only children between 2 and 5 years reached 100% of RI at average consumption of *yogurt* fortified at Level 4. In addition, our results show a potential risk of exceeding the UL for children aged 2 to 5 years at the highest percentile of *yogurt* consumption (P90), if it was fortified at Level 4. Children are the most vulnerable group as they are more likely to exhibit high intakes of fortified products and their UL for folic acid are lower. Finally, regardless fortified *breakfast cereals* are one of the main products in the market, their contribution to average intakes at Level 1 fortification is 5,3% RI for children aged 2 to 5 years, reaching 20% of their RI when Level 4 fortification is considered.

5. CONCLUSIONS

- 5.1. Our Database may be a useful tool to manage, update and retrieve available data and information on folic acid fortified foods, both as manufacturer declared levels of fortification and analytical values. It is essential to use standardized vocabulary and modes of expression in order to make data interchangeable between international Databases.
- 5.2. Updated composition data for folic acid fortified food products are necessary for the assessment, evaluation and monitoring of population folate and folic acid dietary intakes, as well as nutritional research. Continuous updating work is required in order to make complete information available to users.
- 5.3. There is a high variability in folic acid fortification levels among different voluntarily fortified food groups but mainly, products provide $\leq 35\%$ of Dietary Reference Intakes for folic acid per declared serving and label information declaring folic acid is not always readily available.

- 5.4.** Agreement between folate methods of analysis, microbiological assay and affinity chromatography-HPLC, shows that both methods can be used for analyzing folic acid fortified foods when other methods are not available. However, affinity chromatography-HPLC discriminates added folic acid and so it should be chosen for fortified food analysis.
- 5.5.** According to our laboratory analyses, the highest folic acid fortification levels per declared serving were observed in *milk and derivatives*, moreover, this group presented the major proportion of products with higher folic acid values than those declared by manufacturers. The lowest folic acid levels per serving were found in *cereals and derivatives* and for *breakfast cereals* also significantly lower than declared values were observed.
- 5.6.** Voluntary folic acid fortification in Spain is not targeted to women of childbearing age, the population group that could mostly benefit from it. Population group or age target as well as food consumption patterns are of main importance in order to provide fit-for-purpose tailored voluntary folic acid fortification.

At folic acid levels observed in our work, inclusion of up to three fortified products as part of a balanced breakfast could be of nutritional interest for several vulnerable folate deficient population groups without posing a risk of excessive intakes. Only children between 1 to 3 years could potentially exceed established Upper Intake Limits.

- 5.7.** Voluntary fortification in Spain may potentially and significantly contribute to improve overall folate/folic acid intake in vulnerable population groups. However, it is important to stress that fortified food consumption data is limited and there is a need to design and validate dietary assessment methodologies that consider fortified products as part of the regular diet. Potential impact of voluntary fortification on folate status remains unknown and warrants additional studies.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. SISTEMA EUROFIR/LANGUAL PARA LA CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS**The LANGUAL 2009 Thesaurus - Systematic display [169]****EUROFIR FOOD CLASSIFICATION [A0777]****BEVERAGE (NON-MILK) (EUROFIR) [A0840]**

- ALCOHOLIC BEVERAGE (EUROFIR) [A0846]
 - ALCOHOLIC MIXED DRINK (EUROFIR) [A0851]
 - BEER OR OTHER MALT BEVERAGE (EUROFIR) [A0847]
 - CIDER, PERRY OR SIMILAR DRINK (EUROFIR) [A0848]
 - LIQUEUR OR SPIRITS (EUROFIR) [A0850]
 - WINE, FORTIFIED WINE OR WINE-LIKE BEVERAGE (EUROFIR) [A0849]
- JUICE OR NECTAR (EUROFIR) [A0841]
- NON ALCOHOLIC BEVERAGE (EUROFIR) [A0842]
 - COFFEE, TEA, COCOA (EUROFIR) [A0845]
 - SOFT DRINK (EUROFIR) [A0843]
 - WATER (EUROFIR) [A0844]

EGG OR EGG PRODUCT (EUROFIR) [A0790]

- EGG DISH (EUROFIR) [A0792]
- FRESH OR PROCESSED EGG (EUROFIR) [A0791]

FAT OR OIL (EUROFIR) [A0805]

- BUTTER OR OTHER ANIMAL FAT (EUROFIR) [A0808]
 - BUTTER (EUROFIR) [A0809]
 - FISH OILS (EUROFIR) [A0811]
 - OTHER ANIMAL FATS (EUROFIR) [A0810]
- MARGARINE OR LIPID OF MIXED ORIGIN (EUROFIR) [A0807]
- VEGETABLE FAT OR OIL (EUROFIR) [A0806]

FRUIT OR FRUIT PRODUCT (EUROFIR) [A0833]

- PROCESSED FRUIT PRODUCT (EUROFIR) [A0834]

GRAIN OR GRAIN PRODUCT (EUROFIR) [A0812]

- BREAD (EUROFIR) [A0817]
 - BREAD PRODUCT (EUROFIR) [A0820]
 - LEAVENED BREAD (EUROFIR) [A0818]
 - UNLEAVENED BREAD (EUROFIR) [A0819]
- BREAKFAST CEREAL (EUROFIR) [A0816]
- FINE BAKERY WARE (EUROFIR) [A0821]
- FLOUR OR STARCH (EUROFIR) [A0813]
- PASTA (EUROFIR) [A0815]
- RICE OR OTHER GRAIN (EUROFIR) [A0814]
- SAVOURY CEREAL DISH (EUROFIR) [A0822]

PASTA DISH [A1204]

MEAT OR MEAT PRODUCT (EUROFIR) [A0793]

MEAT ANALOGUE (EUROFIR) [A0800]
MEAT DISH (EUROFIR) [A0799]
OFFAL (EUROFIR) [A0796]
POULTRY MEAT (EUROFIR) [A0795]
PRESERVED MEAT (EUROFIR) [A0797]
RED MEAT (EUROFIR) [A0794]
SAUSAGE OR SIMILAR MEAT PRODUCT (EUROFIR) [A0798]

MILK, MILK PRODUCT OR MILK SUBSTITUTE (EUROFIR) [A0778]

CHEESE (EUROFIR) [A0784]
 CURED CHEESE (EUROFIR) [A0785]
 PROCESSED CHEESE (EUROFIR) [A0787]
 UNCURED CHEESE (EUROFIR) [A0786]
FERMENTED MILK PRODUCT (EUROFIR) [A0783]
FROZEN DAIRY DESSERT (EUROFIR) [A0789]
IMMITATION MILK PRODUCTS (EUROFIR) [A0788]
MILK (EUROFIR) [A0779]
 CREAM (EUROFIR) [A0782]
 LIQUID MILK (EUROFIR) [A0780]
 PROCESSED MILK (EUROFIR) [A0781]

MISCELLANEOUS FOOD PRODUCT (EUROFIR) [A0852]

PREPARED FOOD PRODUCT (EUROFIR) [A0861]
 DESSERT (EUROFIR) [A0864]
 DESSERT SAUCE (EUROFIR) [A0863]
 EGG DISH (EUROFIR) [A0792]
 MEAT DISH (EUROFIR) [A0799]
 POTATO DISH (EUROFIR) [A0830]
 PREPARED SALAD (EUROFIR) [A0866]
 PULSE DISH (EUROFIR) [A0832]
 SANDWICH (EUROFIR) [A1203]
 SANDWICH FILLING (EUROFIR) [A0867]
 SAVOURY CEREAL DISH (EUROFIR) [A0822]
 PASTA DISH [A1204]
 SAVOURY SAUCE (EUROFIR) [A0862]
 SAVOURY SNACK (EUROFIR) [A0868]
 SEAFOOD DISH (EUROFIR) [A0804]
 SOUP (EUROFIR) [A0865]
 VEGETABLE DISH (EUROFIR) [A0828]

SPICE, CONDIMENT OR OTHER INGREDIENT (EUROFIR) [A0853]
 BAKING INGREDIENT (EUROFIR) [A0854]
 CONDIMENT (EUROFIR) [A0858]
 CHUTNEY OR PICKLE (EUROFIR) [A0860]
 DRESSING, MAYONNAISE (EUROFIR) [A0859]
 FLAVOURING OR ESSENCE (EUROFIR) [A0855]

HERB OR SPICE (EUROFIR) [A0857]
SEASONING OR EXTRACT (EUROFIR) [A0856]

NUT, SEED OR KERNEL (EUROFIR) [A0823]

NUT OR SEED PRODUCT (EUROFIR) [A0824]
PRODUCT FOR SPECIAL NUTRITIONAL USE OR DIETARY SUPPLEMENT (EUROFIR) [A0869]

DIETARY SUPPLEMENT (EUROFIR) [A0870]
FOOD FOR SPECIAL NUTRITIONAL USE (EUROFIR) [A0871]
FOOD FOR INFANTS (EUROFIR) [A0873]
FOOD FOR WEIGHT REDUCTION [A1205]
MEDICAL FOOD (EUROFIR) [A0872]
SPORTS FOOD [A1206]

SEAFOOD OR RELATED PRODUCT (EUROFIR) [A0801]

FISH OR RELATED ORGANISM (EUROFIR) [A0802]
SEAFOOD PRODUCT (EUROFIR) [A0803]
SEAFOOD DISH (EUROFIR) [A0804]

SUGAR OR SUGAR PRODUCT (EUROFIR) [A0835]

CHOCOLATE OR CHOCOLATE PRODUCT (EUROFIR) [A0839]
JAM OR MARMALADE (EUROFIR) [A0837]
NON-CHOCOLATE CONFECTIONERY OR OTHER SUGAR PRODUCT (EUROFIR) [A0838]
SUGAR, HONEY OR SYRUP (EUROFIR) [A0836]

VEGETABLE OR VEGETABLE PRODUCT (EUROFIR) [A0825]

CHUTNEY OR PICKLE (EUROFIR) [A0860]
PULSE OR PULSE PRODUCT (EUROFIR) [A0831]
PULSE DISH (EUROFIR) [A0832]
STARCHY ROOT OR POTATO (EUROFIR) [A0829]
POTATO DISH (EUROFIR) [A0830]
VEGETABLE (EXCLUDING POTATO) (EUROFIR) [A0826]
VEGETABLE PRODUCT (EUROFIR) [A0827]
VEGETABLE DISH (EUROFIR) [A0828]

ANEXO 2. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

2.1. Publicaciones en revistas científicas

Peer-reviewed publications

1. Samaniego-Vaesken, M.L., G. Varela-Moreiras, and E. Alonso Aperte, *Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos*. *Nutricion Hospitalaria*, 2009. 24(4): p. 459-466.
2. Samaniego-Vaesken, M.L., E. Alonso-Aperte, and G. Varela-Moreiras, *Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market*. *Journal of Food Composition and analysis*, 2010. 23(5): p. 419-423.
3. Samaniego-Vaesken, M.d.L., E. Alonso-Aperte, and G. Varela-Moreiras, *Vitamin food fortification today*. *Food Nutr Res*, 2012. 56.
4. Samaniego Vaesken, M.L., E. Alonso Aperte, and G. Varela-Moreiras, *Predicted contribution of folic acid voluntary fortification in Spain to children's dietary intakes, as assessed with new food folate composition data*. *Food Chemistry*, 2012. *Under phase 2 revision*.

Publicación 1

Samaniego-Vaesken, M.L., G. Varela-Moreiras, and E. Alonso Aperte, *Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos*. *Nutricion Hospitalaria*, 2009. 24(4): p. 459-466.

Original

Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos

M. de L. Samaniego Vaesken, E. Alonso-Aperte y G. Varela-Moreiras

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

Resumen

Introducción: El ácido fólico presenta una relevancia potencial en la prevención de diversas patologías (malformaciones congénitas, enfermedad cardiovascular, cáncer, enfermedades neurodegenerativas), lo cual ha supuesto la implantación de estrategias para aumentar su ingesta: educación nutricional, suplementación farmacológica y fortificación obligatoria o voluntaria. En España se comercializan alimentos fortificados voluntariamente con ácido fólico, aunque se carece de datos específicos y no es posible evaluar su impacto en la ingesta de la población.

Objetivos: Obtener un mayor conocimiento de las prácticas de fortificación de los alimentos con ácido fólico.

Métodos: Se diseñó una Base de Datos de alimentos fortificados con ácido fólico a partir de un estudio de mercado y se recopiló datos de alimentos no fortificados procedentes de Tablas de Composición de Alimentos.

Resultados y discusión: La Base de Datos incluyó 260 alimentos fortificados. El grupo mayoritario fue el de "Cereales y derivados" (52%) seguidos por "Leche y derivados" (17%). La mayoría de productos carecía de población diana de consumo (37%) o iban dirigidos a población con "Sobrepeso" (28%) e "Infantil" (23%), siendo minoritarios los dirigidos a mujeres en edad fértil (2%). El número de alimentos no fortificados fue de 690.

El nivel de fortificación declarado por los fabricantes se encontró entre 15 y 430% de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de ácido fólico por 100 g/ml, y la adición conjunta de vitaminas B₆ y B₁₂ en un 75% de los productos.

El mercado español ofrece ya una importante cantidad de alimentos fortificados con ácido fólico de forma voluntaria, a un nivel $\geq 15\%$ de la CDR por 100 g/ml o ración.

(Nutr Hosp. 2009;24:459-466)

Palabras clave: Alimentos fortificados. Ácido fólico. Folatos. Base de datos. Composición de alimentos. Fortificación.

Correspondencia: Gregorio Varela-Moreiras.
 Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación.
 Facultad de Farmacia (Universidad CEU San Pablo).
 Ctra. Boadilla, km. 5,3.
 28668 Boadilla del Monte (Madrid).
 E-mail: gvarela@ceu.es

Recibido: 29-VII-2008.
 Aceptado: 19-VIII-2008.

FOLIC ACID FORTIFIED FOODS AVAILABLE IN SPAIN: TYPES OF PRODUCTS, LEVEL OF FORTIFICATION AND TARGET POPULATION GROUPS

Abstract

Introduction: Folic acid is a potentially relevant factor in the prevention of a number of pathologies (congenital abnormalities, cardiovascular disease, colorectal cancer and neurocognitive decline). This has led to the introduction of different strategies in order to increase folate intake: nutritional education, pharmacological supplementation and mandatory or voluntary fortification of staple foods with folic acid. In Spain there is a growing number of folic acid fortified products on a voluntary basis, but there is also a lack of reliable data to assess their impact on the population's dietary folate intakes.

Objective: To gather a better knowledge of folic acid food fortification practices in Spain.

Methods: A Food Composition Database was developed using data from a market study. Also, previously published data of unfortified staple foods from Food Composition Tables was reviewed.

Results and discussion: The Database included 260 folic acid fortified food items and it was periodically updated. Food groups included were primarily "Cereals and derivatives" (52%) followed by "Dairy products". Most of these foodstuffs lacked a target population for their consumption (37%) or were aimed at "Weight control" (28%) and "Children" (23%), but only 2% targeted women at a reproductive age. Number of unfortified foods included was 690.

Fortification levels declared by manufacturers ranged between 15 and 430% of the Recommended Dietary Allowances (RDA) for folic acid per 100 g/ml, and simultaneous addition of B₆ and B₁₂ vitamins was observed in 75% of the products.

Currently, Spain market offers a significant number of folic acid fortified products on a voluntary basis and at a level $\geq 15\%$ of the RDA per 100 g/ml or serving declared by manufacturers.

(Nutr Hosp. 2009;24:459-466)

Key words: Fortified foodstuffs. Folic acid. Folate. Food composition database. Fortification.

Introducción

Entre las funciones del ácido fólico en el organismo se encuentran la *clásica*, o prevención de la anemia macrocítica, y las *nuevas funciones reconocidas*, fundamentalmente la prevención de los Defectos del Tubo Neural (DTN) mediante la suplementación periconcepcional^{1,2}. Otras *nuevas funciones* emergentes son su relación con la enfermedad cardiovascular, a través de las concentraciones plasmáticas de homocisteína³, un efecto modulador sobre el cáncer colorectal⁴ y un posible papel junto a la vitamina B₁₂ sobre las enfermedades neurodegenerativas⁵. Para estas *funciones potenciales*, se han observado requerimientos nutricionales superiores a los necesarios para la prevención de la deficiencia clásica.

La reducción del riesgo de DTN por la suplementación con ácido fólico fue confirmada mediante ensayos de intervención controlada⁶, aunque el mecanismo subyacente es aún desconocido. Como consecuencia, las autoridades sanitarias, tanto a nivel europeo como en los Estados Unidos (EEUU), han establecido recomendaciones para que todas las mujeres en edad fértil o que pretendan quedarse embarazadas consuman 400 µg de ácido fólico/día, adicionales a los folatos procedentes de una dieta variada⁷. Con el objeto de aumentar y/o adecuar la ingesta de ácido fólico en la población, se han instaurado tres estrategias: la *educación nutricional* de la población que permita aportar más folatos a través de la dieta, la *suplementación farmacológica*; y la *fortificación obligatoria* o *voluntaria*. Cada una ha sido utilizada, de forma conjunta o individual, con mayor o menor éxito en distintos países⁸.

La *fortificación obligatoria*, estrategia introducida en los EEUU y Canadá desde 1998, consiste en la adición de ácido fólico de forma obligatoria y regulada a productos derivados de cereales y harinas⁷. Aunque en la actualidad se encuentra implantada en más de 40 países, en Europa existe una importante reticencia a su introducción hasta que se evalúan mejor las consecuencias de una mayor exposición a la vitamina⁸. Así en España únicamente se fortifican los alimentos con ácido fólico de *forma voluntaria*, lo cual supone la adición de la vitamina de acuerdo a los criterios de la industria alimentaria.

El ácido fólico se ha considerado tradicionalmente una vitamina segura y carente de efectos tóxicos. Hasta ahora se ha descrito el riesgo de que ingestas elevadas puedan enmascarar el diagnóstico de la deficiencia en vitamina B₁₂ en personas de edad; cuestión ésta especialmente seria considerando los posibles daños neurológicos derivados de dicha deficiencia⁹. Sin embargo, ha aumentado la preocupación acerca de los riesgos que podrá suponer una ingesta elevada de ácido fólico a través de suplementación o fortificación, dado que desconocemos los posibles efectos adversos de un consumo excesivo y a largo plazo de la vitamina³. Estudios en humanos apuntan a que considerando la limitada capacidad reductora del hígado en el metabolismo del

ácido fólico, ciertas dosis ingeridas a través de alimentos fortificados podrán conducir a la aparición en plasma de una cantidad significativa de la vitamina sin metabolizar¹⁰.

En los últimos años se ha observado en España una fuerte irrupción de alimentos *fortificados* con ácido fólico de forma *voluntaria* por la industria. La necesidad de su introducción en la alimentación diaria es muy controvertida ya que, si bien su aparición responde a las demandas del consumidor, que reconoce la dieta como factor determinante en la prevención de enfermedades, surge el interrogante acerca de los riesgos que podrán derivar del consumo de una amplia variedad de alimentos modificados en su composición.

En este contexto, y a pesar de la presencia de dichos alimentos en el mercado español, no existen estudios que cuantifiquen su disponibilidad, composición y nivel de fortificación, información esencial para realizar una estimación del impacto sobre las ingestas de ácido fólico que el consumo de los mismos podrá estar teniendo en los diferentes grupos de población. Además, su presencia pone de manifiesto la continua evolución de la oferta de la industria alimentaria y la dificultad para recopilar Bases de Datos que den lugar a Tablas de Composición de alimentos (TCA) precisas y actualizadas¹¹. Olivares y cols.¹² evaluaron la calidad de los datos de composición en folatos en TCA españolas encontrando entre éstas marcadas diferencias y/o falta de consenso. Tras una revisión de los principales estudios de evaluación de la ingesta de folatos en países europeos, de Bree y cols.¹³ encontraron que la mayoría de estos estudios no utilizaban TCA estandarizadas o internacionalmente reconocidas. Los retos actuales en cuanto a la obtención de datos de composición de folatos en los alimentos se plantean en dos frentes: por una parte, los datos de composición de alimentos de consumo habitual (no fortificados) no están normalizados¹², y por otra, la presencia de alimentos procesados a los que se añade esta vitamina (fortificados), complica aún más la elaboración de TCA completas.

En base a lo anterior, el *objetivo* del presente trabajo se centró en conocer la disponibilidad actual y la composición de alimentos *fortificados voluntariamente* con ácido fólico en España.

Métodos

Recopilación de datos de alimentos fortificados con ácido fólico mediante estudio de mercado

Se realizó un estudio de mercado en establecimientos comerciales de la Comunidad de Madrid: grandes superficies, tiendas de descuento y tiendas especializadas. En cada visita, se siguió un esquema de trabajo cuya finalidad fue abarcar toda la superficie de venta destinada a alimentos propiamente dichos. Se revisaron los envases cuyo etiquetado presentaba declaraciones relativas al enriquecimiento y/o fortificación con

Tabla I
 Información de los alimentos fortificados con ácido fólico recogida en la base de datos

Datos de etiquetado general	Datos de etiquetado nutricional	Datos para organización de la base de datos
<ul style="list-style-type: none"> Nombre comercial y descripción del alimento. Marca comercial. Código de barras. Alegaciones nutricionales del envase o etiquetado. Ración recomendada por el fabricante (g o ml). 	<ul style="list-style-type: none"> Energía (kcal/100 g o ml). Folatos, ácido fólico, folacina o vitamina B₉ (µg/100 g o ml). Vitamina B₆ (mg/100 g o ml). Vitamina B₁₂ (µg/100 g o ml). 	<ul style="list-style-type: none"> Grupo de alimentos de acuerdo a la clasificación del Código Alimentario Español³⁶. Denominación genérica o subgrupo de alimentos. Población diana para su consumo. Fecha de adquisición en el mercado (mes/año).

vitaminas. Se comprobó la presencia del ácido fólico, mediante cualquiera de sus denominaciones (*ácido fólico, folacina o vitamina B₉*), en el listado de ingredientes como indicación de adición por el fabricante, y se procedió a su adquisición. Se recogió también la adición simultánea de las vitaminas B₆ y B₁₂ por estar implicadas en el metabolismo de los folatos⁹. Otra fuente de información de los alimentos fortificados con ácido fólico fue la facilitada por algunas de las principales industrias alimentarias, las cuales facilitaron únicamente la información reflejada en el etiquetado de los productos, es decir, aquella disponible al consumidor.

Se almacenó la información de relevancia sobre el producto (tabla I) en un formulario prediseñado para facilitar la estandarización en el registro de datos. Se realizó una muestra fotográfica para su inclusión en la ficha de producto y se registró la fecha de adquisición.

Se estipularon dos actualizaciones, con un intervalo de cuatro meses. Su objeto fue determinar la aparición de nuevos alimentos y la posible retirada de otros, así como una reformulación del contenido en fólico. En la tabla II se presenta la distribución temporal del estudio de mercado, que abarcó entre septiembre de 2006 y mayo de 2007.

Revisión de tablas de composición de alimentos para alimentos fortificados y no fortificados

Se revisaron las TCA y Bases de Datos publicadas a nivel nacional e internacional, en sus últimas ediciones, con objeto de recopilar los datos de composición de ambos tipos de alimentos e incluirlos en una nueva Base de Datos. En concreto, se utilizaron dos TCA españolas^{14,15}, una inglesa¹⁶ y la Base de Datos de Nutrientes del Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19)¹⁷.

Estructura de la base de datos

Se diseñó una Base de Datos *relacional* utilizando la aplicación Access 2000[®] de Microsoft Office[®] (Microsoft Co., EEUU). La misma se compone de *tablas* con información interrelacionada: cada una incluye un único registro por alimento, el cual contiene toda la

información referente al mismo. A partir de las tablas, se crean *formularios* que actúan como interfaz entre la información de la Base de Datos y el usuario, haciendo posible la visualización de una *ficha de producto* que contiene toda la información referente al alimento.

Para clasificar los datos se utilizaron *consultas*, que dieron lugar a "*búsquedas por criterios*", a partir de las cuales el usuario puede tener un acceso rápido a la información que seleccione. Las consultas establecidas en la Base de Datos fueron por grupos y subgrupos de alimentos y de acuerdo a las poblaciones diana de consumo para cada uno de los productos.

Resultados

Base de datos del contenido en ácido fólico y folatos de los alimentos

La Base de Datos se compone de la información obtenida en el estudio de mercado llevado a cabo en establecimientos de la Comunidad de Madrid, así como de los datos recopilados de las TCA más utilizadas en nuestro país¹⁴⁻¹⁷. Incluye un total de 946 alimentos, de los cuales 256 son alimentos fortificados y 690 no lo son. Dado su formato digital se almacena en cd-rom y se encuentra disponible previa solicitud a los autores.

Los centros visitados para la obtención de datos de alimentos fortificados fueron ocho en total. Los dos canales de distribución donde se encontró mayor número y/o diversidad de productos fueron las grandes superficies y supermercados. Los estudios del Ministerio de Alimentación, Pesca y Agricultura (MAPA) establecen la preferencia del consumidor por estos dos tipos de establecimientos para la adquisición de la denominada "alimentación seca" entre la que se encuentran los alimentos fortificados¹⁸. El número de alimentos fortificados que se incluyeron en las diferentes actualizaciones queda reflejado en la tabla II.

Se constató una escasa cantidad de datos relativos a los alimentos fortificados en las TCA consultadas. La recopilación más completa fue la Base de Datos del Departamento de Agricultura de los EEUU (*United States Department of Agriculture, USDA*)¹⁷, aunque no se incluyeron estos datos al proceder de productos que no pertenecen al mercado español.

Fechas	Establecimientos visitados	Alimentos nuevos incluidos
Septiembre 2006: 1ª visita	8	192
Enero 2007: 1ª actualización	6	21
Mayo 2007: 2ª actualización	4	43
Total alimentos fortificados		256

Grupos de alimentos fortificados con ácido fólico

Mediante la creación de la Base de Datos, fue posible llevar a cabo la identificación de los grupos y subgrupos de alimentos fortificados con ácido fólico más representativos. Del total de 6 grupos, el mayoritario fue el de los "Cereales y derivados" (fig. 1) y, dentro de éste, fueron los *cereales para desayuno* (56 %) (tabla III) el subgrupo mayoritario. Le siguió el grupo "Leche y derivados" y en éste, las *leches, batidos y preparados lácteos* (59 %) como subgrupo mayoritario. Dentro del grupo "Alimentos para lactantes y niños de corta edad" (12%), fueron las *papillas* (86%) las más representati-

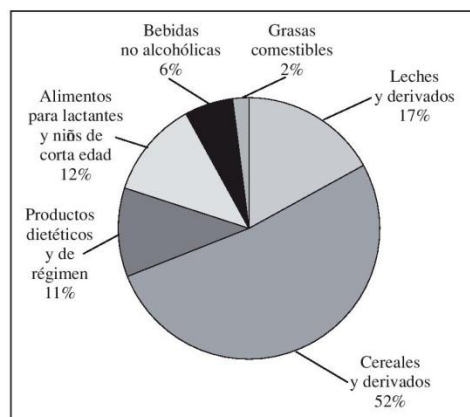


Fig. 1.—Distribución de los grupos de alimentos fortificados con ácido fólico.

vas; y dentro de los "Productos dietéticos" (11%) los *sustitutos de comidas* (68%) el subgrupo mayoritario. En menor medida encontramos las "Bebidas no alcohólicas" (6%) como *zumos y néctares envasados* y las "Grasas comestibles" (2%).

Grupos de Alimentos	Subgrupos	n_1	Ácido fólico $\mu\text{g}/100\text{ g}$ o ml	% CDR ^a por 100 g o ml	n_2	B_9 , $\text{mg}/100\text{ g}$ o ml	% CDR ^a por 100 g o ml	B_{12} , $\mu\text{g}/100\text{ g}$ o ml	% CDR por 100 g o ml
Cereales y derivados	Cereales para desayuno	74	202,5 ± 62,85	101,2%	73	1,86 ± 0,57	93%	0,92 ± 0,3	92%
	Galletas	35	91,82 ± 37,31	45,9%	20	0,84 ± 0,47	42%	0,43 ± 0,23	43%
	Barritas de cereales	16	139,7 ± 41,1	69,5%	15	1,45 ± 0,37	72,5%	0,72 ± 0,19	72%
	Panadería	4	104,3 ± 70,7	52,1%	0	-	-	-	-
	Pastelería y bollería	3	70	35%	0	-	-	-	-
	Subtotal	132			108				
Leche y derivados	Leches, batidos y preparados lácteos	26	45,1 ± 55,1	22,5%	13	0,31 ± 0,03	15,5%	0,23 ± 0,12	23%
	Yogures y leches fermentadas	13	30	15%	12	0,3	15%	0,21 ± 0,02	21%
	Postres lácteos	4	59 ± 33,52	29,5%	2	0,3	15%	0,15	15%
	Quesos frescos	1	30	15%	1	0,3	15%	0,15	15%
	Subtotal	44			28				
Alimentos para lactantes y niños de corta edad	Papillas	26	24,7 ± 14,5	24,7% ^b	21	0,2 ± 0,14	28,5% ^b	0,22 ± 0,12	31,4% ^b
	Leches de continuación	4	15,7 ± 7,1	15,7% ^b	4	0,11 ± 0,1	15,7% ^b	0,24 ± 0,1	34,2% ^b
	Subtotal	30			25				
Productos dietéticos y de régimen	Sustitutos de comidas	20	105,4 ± 46,7	52,7% ^c	15	1 ± 0,53	66,6% ^c	0,75 ± 0,35	53,5% ^c
	Varios*	7	1598,7 ± 1451,4	800% ^c	2	3,5 ± 0,71	233% ^c	1,5 ± 0,71	107% ^c
	Postres lácteos y batidos	2	387,5 ± 379,7	193% ^c	1	6,25	416% ^c	3,12	222% ^c
	Subtotal	29			18				
Bebidas no alcohólicas	Zumos y néctares envasados	12	37 ± 23,29	18,5%	7	0,32 ± 0,17	16%	0,16 ± 0,08	16%
	Café, cacao e infusiones	4	550,5 ± 437,2	275,2%	1	3	150%	1,5	150%
	Subtotal	16			8				
Grasas comestibles	Grasas untables	5	860 ± 313	430%	5	4,6 ± 0,89	230%	4,3 ± 1,57	430%
Total alimentos		256			192				

Valores para las tres vitaminas, declarados en el etiquetado nutricional por 100 g o ml de producto, expresados como media de n productos ± desviación estándar.

n_1 : Número de alimentos fortificados con ácido fólico; n_2 : Número de alimentos fortificados conjuntamente con ácido fólico, B_9 y B_{12} .

^a Directiva 90/496/CEE, 1990²: Cantidad Diaria Recomendada (CDR): ácido fólico 200 $\mu\text{g}/\text{día}$.

^b Directiva 96/4/CE y 96/5/CE de 1996^{2,22}: ácido fólico 100 μg .

^c Directiva 96/8/CE²²: ácido fólico 200 μg .

* incluye 4 suplementos multivitamínicos.

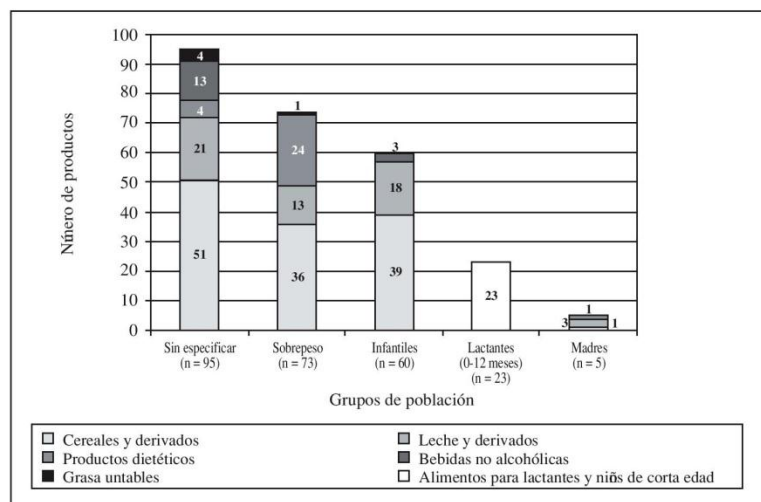


Fig. 2.—Grupos de población diana y de alimentos fortificados con ácido fólico.

Nivel de fortificación con ácido fólico y fortificación conjunta con vitaminas relacionadas

Se evaluó el nivel de fortificación con ácido fólico declarado por los fabricantes así como el nivel de fortificación y frecuencia de adición conjunta de las vitaminas B₆ y B₁₂. Estas participan en el ciclo de la metionina y los folatos como cofactores enzimáticos esenciales para su adecuado funcionamiento⁹. De hecho, para las *nuevas funciones potenciales* se evidencia en muchas ocasiones la actuación conjunta de estas vitaminas¹⁹.

Al analizar el nivel medio de fortificación *declarado* (tabla III), encontramos unos rangos de adición de ácido fólico que cubran del 15% al 430% de la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de ácido fólico por 100 g o ml de producto. Se encontró también que, de los 256 alimentos fortificados con ácido fólico, un 75% declaraba la adición conjunta de las vitaminas B₆ y B₁₂ (n = 192). Para la vitamina B₆ los rangos medios de adición se encontraban entre el 15% y el 233% y para la vitamina B₁₂ entre el 15% y el 430%, expresados como porcentaje de la CDR por 100 g o ml de producto.

El grupo de “Cereales y derivados” fue el que mayor dispersión entre subgrupos presentó para los niveles de fortificación con ácido fólico, abarcando un rango del 35 al 101% de la CDR por 100 g de producto. De este grupo, un 81,8% se encontraba adicionado con vitaminas B₆ y B₁₂. Los cereales para desayuno, subgrupo mayoritario, presentaron un nivel medio de fortificación declarada correspondiente al 101%, 93% y 92% de la CDR por 100 g para ácido fólico, vitaminas B₆ y B₁₂ respectivamente. El grupo de “Leche y derivados” fue el que menor dispersión en los niveles de fortificación presentó, observándose para las tres vitaminas unos rangos medios de entre el 15% y el 29% de la CDR por 100 g o ml. Del total de alimentos que compo-

nen este grupo, encontramos la adición conjunta en un 63,3% (n = 28).

Cabe destacar que el grupo de los “Productos dietéticos y de régimen” incluye el subgrupo “varios” que alcanzaba hasta un 800% de la CDR de ácido fólico por 100 g o ml, pero debe tenerse en cuenta que la mayoría de estos correspondían a productos deshidratados, como cacao en polvo, cuyas raciones de consumo no suelen alcanzar los 10 g.

Grupos de población diana para los alimentos fortificados con ácido fólico

En la Base de Datos se clasificaron los alimentos fortificados en función a la “población diana” a la que van dirigidos. Para definir estos grupos, se tomó como referencia la alegación directa mediante marketing del envase, la denominación de venta o mediante declaración propiamente dicha en el producto. Así se establecieron cuatro grupos: “Lactantes” (0-12 meses), “Infantil” (1 año en adelante), “Madres” y “Sobrepeso”. Debemos tener en cuenta que estos se definen tanto por la edad del grupo poblacional, como por requerimientos nutricionales específicos de cada uno.

En la figura 2 observamos que la mayoría de productos (37%) carecía de población diana, es decir, no especificaban el grupo poblacional al que iban dirigidos. Un 28% de los productos correspondieron a los de bajo aporte energético dirigidos a población con “Sobrepeso”, siendo éste un segmento con necesidades nutricionales específicas que ha presentado en los últimos años un notable incremento en número de productos en el mercado²⁰. Los grupos de alimentos encontrados para este segmento fueron en su mayor parte los “Cereales y derivados” (49%), seguidos por los “Productos

dietéticos” (31%) en forma de “Sustitutivos de comidas” y, por último, el grupo de “Leche y derivados” (17%). Un 23% de los productos iban dirigidos a la población infantil, de los cuales el 65% correspondieron al grupo “Cereales y derivados”, siendo los cereales para desayuno el subgrupo mayoritario (79%). Le siguieron en importancia el grupo de “Leche y derivados” (16%) en el que eran mayoritarias las leches denominadas de “energía y crecimiento”, alegación que se presentaba incluida en la denominación de venta en la mayoría de casos para esta población.

El grupo de los lactantes (0 a 12 meses) constituye un caso especial, debido a que todos los alimentos de este grupo tienen una legislación concreta^{21,22} y, por tanto, se clasifican como “Alimentos para lactantes y niños de corta edad”, representando un 9% del total.

Discusión

La Base de Datos elaborada es una herramienta pionera en España para la estimación y evaluación de la adecuación de la ingesta de folatos de la dieta, tanto a través de alimentos tradicionales como de alimentos fortificados.

La creciente oferta de nuevos productos en un corto periodo de tiempo es una de las principales limitaciones para mantener una Base de Datos actualizada¹¹. Los datos recogidos en este estudio señalan que, en un margen de cuatro meses, un consumidor podrá encontrar ampliada considerablemente la oferta de alimentos fortificados. Así en la primera y segunda actualización, el número de alimentos se incrementó en un 10 y un 22% respectivamente sobre el número de alimentos recogidos inicialmente. Cabe destacar que al no incluir las oficinas de farmacia entre las superficies de venta para el muestreo de productos, es posible que el número de alimentos incluidos en el grupo “Lactantes (0-12 meses)” sea menor que los disponibles realmente en el mercado.

Los grupos de alimentos fortificados encontrados en el mercado coinciden en gran parte con los alimentos que forman parte de los hábitos alimentarios de nuestro país²⁰ si bien, en el caso de los *cereales para desayuno*, son alimentos de reciente introducción en la dieta española. Aunque carecemos de datos concretos del consumo de este subgrupo, datos publicados en 2007 indican que su volumen de ventas se ha incrementado de forma considerable²⁰.

La importante diversificación encontrada en el mercado es reflejo de la actual demanda de productos fortificados con nutrientes. En concordancia, estudios realizados en países como Reino Unido y Alemania^{8,23} observaron una distribución similar de grupos y un importante número de alimentos fortificados con ácido fólico. En Alemania se estudió el consumo de estos alimentos en una muestra de 861 sujetos de edades comprendidas entre 6 meses y 18 años; y se observó que hasta un 61% consumió al menos un producto fortifi-

cado con ácido fólico al día, siendo mayoritarios las fórmulas infantiles (44%) y los cereales para desayuno (20%)²³. A nivel nacional, no existe ningún estudio publicado que cuantifique o estime la disponibilidad y el impacto en el consumo de los alimentos fortificados con ácido fólico.

Al evaluar el nivel de fortificación con ácido fólico se consideró apropiado expresar los valores por 100 g o ml de producto y no por ración ya que, para un mismo subgrupo de alimentos, existía una gran variabilidad en las “raciones recomendadas” por el fabricante. Además, un 15% (n = 39) de los alimentos recogidos no declaraba estas raciones en su etiquetado. El empleo de “raciones recomendadas” puede, en ocasiones, generar errores: un estudio realizado en población adulta estadounidense observó que, para un alimento fortificado de consumo habitual como los cereales para desayuno, las raciones que realmente consumían eran casi el doble de las recomendadas en el etiquetado²⁴.

De acuerdo con la legislación vigente, tanto a nivel europeo como nacional, la CDR establecida por la Comisión Europea (CE) para ácido fólico es de 200 µg/día^{25,26}. Aunque estos valores no tienen en cuenta las necesidades nutricionales específicas de distintos grupos de población, constituyen en la actualidad la única referencia legal para el nivel de adición y el etiquetado del contenido de ácido fólico en los alimentos. Además, según esta legislación, para considerar que un alimento contiene cantidades significativas de esta vitamina, y poder así realizar una declaración de contenido en el envase, debe contener como mínimo un 15% de la CDR especificada por 100 g, ml o ración recomendada por el fabricante²⁷. En este contexto, podemos decir que todos los productos estudiados cubran los mínimos establecidos. Asimismo, la normativa establece que dichos productos no deben superar el 100% de las CDR con la ingesta diaria recomendada por el fabricante en el etiquetado²⁷, pero debe tenerse en cuenta que rara vez es ésta la ración consumida y que existe la posibilidad de consumir varios alimentos fortificados combinados, aumentando de esta forma el riesgo de ingestas excesivas de fólico.

Se observó una muy baja proporción de productos fortificados con ácido fólico dirigidos específicamente al segmento que denominamos “Madres” o con la mención de la importancia del estatus en folatos para la gestación. Sin embargo, dadas las Ingestas Recomendadas de este grupo de población en relación con la prevención de los DTN, muchos de estos productos fortificados podrán ser adecuados para alcanzar las recomendaciones de *complementar* una alimentación rica en fuentes naturales de folatos.

La importancia de la diferenciación de producto de acuerdo a los distintos grupos de población radica en los distintos requerimientos de energía y nutrientes de cada uno. En nuestro caso, si bien las CDR establecidas por la CE no tienen en cuenta los distintos requerimientos, las Ingestas Recomendadas (IR) de ácido fólico para la población española son de 100 a 200 µg/día

para la población infantil (1-9 años) y de 400 µg/día para los adultos (600 µg/día en la gestación)²⁸; pero de acuerdo a la legislación vigente en materia de etiquetado nutricional, los valores de referencia son los establecidos por las CDR (200 µg/día), independientemente del grupo al que vaya dirigido un producto.

El segmento de población infantil y adolescente presenta también una ingesta inadecuada de folatos, debido a la baja frecuencia de consumo de frutas y verduras, tal como lo han reflejado estudios recientes a nivel nacional²⁹. Ante esta situación, diversos autores coinciden en que los alimentos fortificados con ácido fólico podrán ser una fuente adecuada para alcanzar las ingestas recomendadas; pero consideran que la educación nutricional debe ser prioritaria^{23,29}. Hay que tener en cuenta que este grupo, al encontrarse en periodo de crecimiento, presenta altos requerimientos nutricionales con lo que aumenta el riesgo de que sufran deficiencias. Pero por otro lado, como comentan Aranceta y cols.³⁰ los desequilibrios nutricionales tanto por exceso como por defecto pueden tener un mayor impacto en esta etapa de desarrollo. Por este motivo, es importante considerar los riesgos potenciales para la salud que podrán derivar del consumo excesivo de un determinado nutriente, ya que la fortificación de alimentos implica la presencia de aquellos en cantidades significativamente superiores a las que presentará un alimento sin fortificar. Serra-Majem y cols.²⁹ consideran que el riesgo de toxicidad es mayor con el uso de suplementos que con el consumo de alimentos fortificados. Estos autores subrayan que el riesgo es mínimo cuando se aplican criterios de fortificación a un nivel inferior o igual a las Ingestas Recomendadas, ya que en muchos casos estos valores son diez veces inferiores a los Niveles Máximos Tolerables de Ingesta (NMT).

Sin duda, las personas de edad constituyen un grupo de riesgo para la deficiencia en folatos. La disminución de la ingesta, enfermedades crónicas, cuadros de malabsorción y polimedicación son factores que pueden determinar una ingesta y/o absorción deficiente de folatos, aumentando así los requerimientos vitamínicos para este grupo³⁰. Considerando las necesidades derivadas de los cambios fisiopatológicos asociados a la edad, los alimentos fortificados podrán constituir fuentes importantes de folatos, siempre en función de los patrones de consumo. Resultados de nuestro grupo recientemente publicados del estudio SENECA (*Survey in Europe on Nutrition and the Elderly, a Concerted Action*), en personas de edad avanzada, encontraron una significativa correlación inversa entre los valores plasmáticos de folatos y vitamina B₁₂ y la homocisteína plasmática, uno de los factores de riesgo de enfermedad arterioesclerótica precoz³¹. Nuestros resultados reflejan que en el mercado español no existía ningún alimento dirigido específicamente a este grupo de edad.

Un estudio llevado a cabo en la población estadounidense³² evaluó el impacto de la fortificación en la ingesta diaria de micronutrientes, encontrando que

éstos aumentaron de forma significativa en todos los grupos de edad y sexo estudiados y, de forma especial, en la población infantil. Los cereales para desayuno y los zumos azucarados habitualmente muy consumidos por dicho grupo de edad aportaron la mayor contribución a las ingestas de ácido fólico. Es importante resaltar que en países como los EEUU, donde se lleva a cabo de forma *conjunta* la fortificación *obligatoria* y *voluntaria* con ácido fólico, las ingestas de la población han excedido en aproximadamente el doble las predicciones iniciales del incremento del consumo de esta vitamina a través de los alimentos³³. Este hecho se ha asociado a una adición superior a la declarada en el etiquetado o en la legislación aplicable, de las cantidades de ácido fólico^{33,34}. En países donde sólo se permite la *fortificación voluntaria* de los alimentos con ácido fólico, como Reino Unido⁸, se pudo observar un efecto menos significativo sobre las ingestas de fólico de niños y adultos, concluyendo que los niveles empleados en este tipo de fortificación no eran suficientes para la prevención de los DTN.

No obstante, para evaluar correctamente el impacto y la seguridad de la adición de ácido fólico a los alimentos sobre las ingestas de la población, se hace absolutamente necesario conocer el contenido real de la vitamina en los mismos. Estudios que han comparado el contenido en fólico añadido a alimentos fortificados, declarado en el etiquetado, con valores obtenidos analíticamente, han encontrado excesos. Concretamente, para el caso del folato total (ácido fólico más folatos naturales) analizado en el periodo posterior a la implantación de la fortificación en EEUU, Rader y cols.³⁴ encontraron un incremento significativo sobre los valores de ácido fólico declarados en las etiquetas y sobre los valores regulados, en una amplia gama de productos derivados de cereales. Observaciones similares realizaron Whittaker y cols.²⁴, ya que encontraron, en cereales para desayuno fortificados voluntariamente con hierro y ácido fólico, un incremento del 80 al 190% y del 98 al 320%, respectivamente, frente a los valores declarados. Análisis químicos más recientes del contenido en ácido fólico y folatos en productos fortificados estadounidenses (cereales y derivados) encontraron, no obstante, una mejor adecuación de los niveles de fortificación a los estándares regulados³⁵. Dichos análisis, al diferenciar el ácido fólico añadido de los folatos naturales propios de las materias primas, conllevan mayor exactitud en la cuantificación de esta vitamina³⁵.

Conclusiones

El mercado español dispone de un elevado número de alimentos fortificados con ácido fólico, aunque parece necesario en el futuro adecuarlos a las necesidades por grupos de población, así como evaluar el impacto de la fortificación en grupos vulnerables. Para ello, resultará esencial disponer de datos analíticos del contenido en folatos y ácido fólico de estos alimentos.

Agradecimientos

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión del proyecto AGL2005-06957 (Plan Nacional de I+D+D 2004-2007) (Contenido y Biodisponibilidad del ácido fólico presente en los alimentos fortificados españoles. Impacto en la ingesta de grupos vulnerables de población y evaluación como potenciales alimentos funcionales.)

Bibliografía

1. Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131-137.
2. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-1835.
3. Rader JI. Folic Acid Fortification, Folate Status and Plasma Homocysteine. *J Nutr* 2002; 132: 2466S-2470.
4. Kim Y-I. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1123-1128.
5. Morris MS et al. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 193-200.
6. Daly LE et al. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *JAMA* 1995; 274: 1698-1702.
7. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Panel on Folate, other B vitamins and Choline. Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. National Academy Press, 1998.
8. Folate and Disease Prevention. Scientific Advisory Committee on Nutrition. Food Standards Agency. Department of Health. London TSO, United Kingdom, 2006.
9. Selhub J et al. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 614s-620.
10. Sweeney M et al. Folic acid fortification and public health: Report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health* 2007; 7: 41.
11. Greenfield H, Southgate DAT. Food composition data. Production, management and use. FAO publishing management service, 2003.
12. Olivares AB et al. Quality of data on folic acid content in vegetables included in several Spanish food composition tables and new data on their folate content. *Nutrición Hospitalaria* 2006; 21: 97-108.
13. De Bree A et al. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51: 643-660.
14. Farran A et al. Tablas de Composición de los Alimentos del CESNID. Ed. Universitat de Barcelona. Mc. Graw-Hill. Interamericana, 2003.
15. Moreiras O et al. Tablas de Composición de Alimentos. Pirámide, 2006.
16. Holland B, Welch AA, Unwind ID, Buss DH, Paul AA, Southgate DAT, Mc Cance and Widdowson's The Composition of foods, 1991.
17. United States Department of Agriculture, A.R.S. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19: Composition of foods, raw, processed, prepared. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. Accedido: 25 de Noviembre de 2006.
18. La Alimentación en España 2006. En Estudios sobre la comercialización Agroalimentaria en España. Panel de Consumo Alimentario, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2006.
19. Tucker KL et al. Breakfast cereal fortified with folic acid, vitamin B-6, and vitamin B-12 increases vitamin concentrations and reduces homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 805-811.
20. Alimentación en España 2007. Producción, industria, distribución y consumo. Mercasa, 2007.
21. Directiva 96/4/CE de la Comisión, de 16 de Febrero de 1996, por la que se modifica la Directiva 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación. DOCE num. L 49 de 28 de febrero de 1996.
22. Directiva 96/5/CE de la Comisión, de 16 de Febrero de 1996, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. DOCE num. L 49 de 28 de febrero de 1996.
23. Sichert-Hellert W, Kersting M. Fortifying Food with Folic Acid Improves Folate Intake in German Infants, Children, and Adolescents. *J Nutr* 2004; 134: 2685-2690.
24. Whittaker P et al. Iron and Folate in Fortified Cereals. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 247-254.
25. Directiva 90/496/CEE del Consejo, de 24 de Septiembre, relativa al etiquetado de propiedades nutritivas de los productos alimenticios. DOCE num. L 276, de 6 de Octubre.
26. Real Decreto 930/1992, de 17 de julio, por el que se aprueba la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios. BOE num. 187 de 5 de agosto de 1992.
27. Real Decreto 1275/2003, de 10 de octubre, relativo a los complementos alimenticios. BOE nú. 246, de 14.10.2003, p 36779-36784
28. Moreiras O et al. Ingestas Recomendadas de energía y nutrientes para la población española. Departamento de Nutrición. Universidad Complutense de Madrid. En Tablas de Composición de los Alimentos (10^{edn}), Pirámide, 2006.
29. Serra-Majem L. Vitamin and mineral intakes in European children. Is food fortification needed? *Public Health Nutrition* 2001; 4: 101-107.
30. Aranceta Bartrina J et al. Las vitaminas en la alimentación de los españoles. Estudio eVe. Análisis en población general. En Libro Blanco: Las Vitaminas en la Alimentación de los Españoles. Estudio eVe (Aranceta Bartrina J et al., eds.), 49-89. Editorial Médica Panamericana, 2000.
31. Varela-Moreiras G et al. Homocisteína, vitaminas relacionadas y estilos de vida en personas de edad avanzada: estudio SBECA. *Nutrición Hospitalaria* 2007; 22: 363-370.
32. Berner LA et al. Fortification Contributed Greatly to Vitamin and Mineral Intakes in the United States, 1989-1991. *J Nutr* 2001; 131: 2177-2183.
33. Quinlivan EP, Gregory JF. III Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 221-225.
34. Rader JI et al. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chemistry* 2000; 70: 275-289.
35. Póo-Prieto R et al. Use of the Affinity/HPLC Method for Quantitative Estimation of Folic Acid in Enriched Cereal-Grain Products. *J Nutr* 2006; 136: 3079-3083.
36. Déleuze Isasi P. Legislación alimentaria. Código alimentario español y disposiciones complementarias. Tecnos, 2006.
37. Directiva 96/8/CE de la Comisión, de 26 de Febrero de 1996, relativa a los alimentos destinados a ser utilizados en dietas de bajo valor energético para reducción de peso. DOCE num. L 55 de 6 de marzo de 1996.

Publicación 2

Samaniego-Vaesken, M.L., E. Alonso-Apperte, and G. Varela-Moreiras, *Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market*. *Journal of Food Composition and analysis*, 2010. 23(5): p. 419-423.

Original Article

Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market

Ma de Lourdes Samaniego-Vaesken, Elena Alonso-Apperte, Gregorio Varela-Moreiras*

Facultad de Farmacia, Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 February 2009
Received in revised form 2 January 2010
Accepted 4 February 2010

Keywords:
Folic acid
Voluntary fortification
Breakfast cereals
Trienzyme extraction
Microbiological assay
Food composition
Food analysis

ABSTRACT

Folic acid (FA) is a relevant factor in the prevention of a number of pathologies; thus supplementation and/or fortification strategies using FA have been widely introduced as a result. In Spain, there is a lack of reliable data to assess the impact of the increasing number of FA fortified foods. The objective of this work was to evaluate FA fortification levels in breakfast cereal products in Spain. Seventy-three breakfast cereals were analysed for total folate (TF) content. Adequacy was evaluated vs. labelled values (LV), recommended intakes (RI) and tolerable upper intake levels (ULs). Mean TF content ranged from 253 to 427 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (76–128 $\mu\text{g}/30\text{ g}$) in different cereal matrix categories. Higher TF content was found in wheat and bran/whole-wheat cereals. As for commercial types, low-fat cereals contained the highest TF levels (445–630 $\mu\text{g}/100\text{ g}$). By consuming these, children (1–9 years old) and women of childbearing age could meet 40–160% and 20–40% of their RIs, respectively, with a standard serving size (30 g). However, children 1–6 years old are at higher risk of excessive FA intake, since low-fat cereals contain more than 50% of their ULs. Our conclusion is that overage (the addition of excess vitamin content) is a practice in FA fortified breakfast cereals. This could be a potential risk for children, but a benefit for women of reproductive age. Physiological status and age are therefore critical factors to take into account to give pertinent advice in consuming FA fortified foods.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Folic acid (FA) is the synthetic form of a naturally occurring water soluble B-group vitamin, generically known as "folate". It is an essential nutrient involved in the prevention of macrocytic anaemia (Wills, 1931). In the second half of the last century, it was identified as a potential relevant factor in the prevention of cardiovascular disease (Rader, 2002), colorectal cancer (Kim, 2004), neurocognitive decline (Morris et al., 2007), and congenital abnormalities affecting the development of the spinal cord and central nervous system, known as neural tube defects (NTDs) (Czeizel and Dudas, 1992; MRC, 1991). The evidence linking FA to NTDs prevention led to the introduction of public health strategies to increase folate intake: pharmacological supplementation, mandatory or voluntary fortification of staple foods with FA, and the advice to increase the intake of folate-rich foods. In 1998, mandatory fortification of wheat flour and other cereal products with FA was introduced in the US and Canada (IOM, 1998). At present, more than 40 countries have implemented this policy, but

most European countries, including Spain, only require addition of this vitamin on a voluntary basis (CDC, 2008).

It has been stated that nutritional folate requirements for disease prevention may be higher than those needed for prevention of the classical vitamin deficiency syndromes (IOM, 1998), for which an adequate folate status can be achieved through regular diet. However, scientific evidence is still inconclusive (Wald et al., 2006; Rader, 2002) and the only established recommendations at present are aimed at women of childbearing age for reducing their risk of having a NTDs affected pregnancy. In 1998, the US Food and Nutrition Board advised that all women capable of becoming pregnant should consume a daily dose of 400 μg of synthetic FA, either in the form of fortified foods or supplements, in addition to naturally occurring folates from food (IOM, 1998). In Spain, the recommended dietary intakes have been set for FA at the same level (400 $\mu\text{g}/\text{day}$) for women of childbearing age, 600 $\mu\text{g}/\text{day}$ for the second half of pregnancy and 500 $\mu\text{g}/\text{day}$ for women who are breastfeeding (Moreiras et al., 2008a).

Folic acid is a monoglutamate highly stable form of folate, which is more easily absorbed in the intestinal tract than the natural vitamers. Traditionally, it has been considered a safe vitamin; nonetheless, excessive intakes could derive in the masking of vitamin B12 deficiency in the elderly, a condition that

* Corresponding author. Tel.: +34 913724726; fax: +34 913510496.
E-mail address: gvarela@ceu.es (G. Varela-Moreiras).

has been proven to cause irreversible neurological damage (Morris et al., 2007). In the past few years, serious concerns have arisen concerning other potential risks, mainly in vulnerable groups such as children and the elderly (Kim, 2007). FA does not occur in nature and its metabolism and bioavailability in humans is not completely understood (Wright et al., 2007). Recent studies using labelled folates coupled with sensitive LC–MS/MS techniques have hypothesised that the liver could be the initial site of FA metabolism in humans, and that because of its low capacity for FA reduction, saturation could take place at certain intake levels, resulting in unmetabolised FA entering the systemic circulation (Wright et al., 2007). A number of studies highlight the chronic presence of increased unmetabolised FA in the bloodstream as a potential risk factor for other deleterious effects (Kalmbach et al., 2008; Troen et al., 2006). Nevertheless, the values for tolerable upper daily intake limits (UL) were established by taking into consideration only data related to the masking of B12 deficiency (EC, 2000). For all these reasons, European authorities are still reluctant to implement mandatory FA fortification (SACN, 2006).

It is quite contradictory to observe that, regardless of these findings, there is only limited information on food folate and FA content. Folate data in food composition tables and databases are scarce or incomplete: moreover, several studies suggest that current data values are derived from assay procedures that underestimate folate content in foods (Gregory III, 1998; Arcot and Shrestha, 2005). Fortification of staple foods with FA has added difficulty to this task (Pawlosky et al., 2003; Johnston and Tamura, 2004) and despite the increasing number of FA fortified products available in Spain, limited work has been done to identify these products and assess their actual FA content (Perez Prieto et al., 2006).

Scientific work groups across Europe have underlined that this lack of reliable data on folate content of fortified foods makes the evaluation of dietary folate intake levels among vulnerable population groups usually unfeasible (Finglas, 2005; Dragsted et al., 2009). As stated in an International Life Sciences Institute's (ILSI) workshop, held in 2005 (Bologna, Italy), "New Horizons for the safe addition of micronutrients to food", FA fortified food composition data has been considered a key research need in order to apply sound risk-benefit analysis methodologies (Dragsted et al., 2009).

The objective of this study was to evaluate voluntary FA fortification levels in commonly available breakfast cereal products in Spain and assess their adequacy for increasing the daily folate intake in different population age groups.

2. Materials and methods

The use of an updated food composition database developed by our group, which includes FA fortified products available in the Spanish market (Samaniego-Vaesken et al., 2009), allowed us to identify breakfast cereals as the most representative food group.

Briefly, assayed total folate values (TF) were compared with FA label values (LV) and used to calculate the theoretical adequacy of these products to both Spanish recommended folate intakes (RI) (Moreiras et al., 2008a) and tolerable upper intake levels (ULs) (EC, 2000) for different age groups on a basis of manufacturer's average recommended standard serving size (30 g).

2.1. Food sample trienzyme extraction

A total of 73 commercial breakfast cereal products were purchased at local supermarkets and retail stores and analysed for TF content. Two different batches of each sample were independently grounded, processed and analysed in triplicate under subdued light, minimising contact with air. All assays were

completed within a month of the product's acquisition and reagents were purchased at analytical grade. Taking the high starch matrix composition into account, extraction and enzyme treatments were carried according to a previously described trienzyme extraction method (Martin et al., 1990) with modifications (Póo-Prieto et al., 2006). Shortly, 0.5–1 g of sample was homogenised in 10 vol. of 0.026 M Tris–HCl extraction buffer (pH 7.4) containing sodium ascorbate (1% w/v) in polyallomer centrifuge tubes (Beckman Instruments, Germany). Tubes were capped and autoclaved for 15 min at 120 °C (1.034 bar). Homogenates were then cooled and sequentially incubated in a shaking water bath at 37 °C with a 20 mg/mL α -amylase solution (*Bacillus* sp (EC.3.2.1.1), Sigma) and chicken pancreas conjugase (Difco, Detroit, MI, EEUU) (Keagy, 1985) for 4 h, followed by a 2 mg/mL protease solution (type XIV, *Streptomyces griseus*, Sigma) for 1 h. Enzyme activity was stopped in a boiling water bath for 5 min. Homogenates were cooled on ice and centrifuged for 20 min at 36,000 \times g at 4 °C. Finally, supernatants were filtered through sterile syringe filters (Millex-AA, 0.8 μ m, Milipore) and stored at –20 °C until further analysis.

2.2. Microbiological assay of folates

TF was determined in each extracted sample by a method that relies on *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (ATCC 7469) folate-dependant growth (Horne and Patterson, 1988; Tamura, 1990).

An automatic microplate reader fixed at $\lambda = 600$ nm (DigiScan Reader, Asys Hitech, Austria) and sterile 96-well microplates were used. Enzyme blanks were assayed to account for potential endogenous folate contribution. Sterile plastic, glassware, water and reagents were used. Standard stock solutions were prepared by dissolving FA (Sigma) in 0.01 mol/L NaOH (20 μ mol/L) and concentrations were determined in pH 7.0 buffered solutions, using UV absorption at $\lambda = 282$ nm for FA and a molar extinction coefficient (ϵ) of 27,000 mol⁻¹ cm⁻¹ (Blakley, 1969). Suitable volumes of the stock solution were diluted with water to construct an 8-point calibration curve.

2.3. Quality control and statistical analysis

A Standard Reference Material, FA fortified infant formula (SRM 1846, NIST) (Sharpless et al., 1997), was used to monitor inter- and intra-assay variation. A subsample of SRM 1846 was analysed with every batch to monitor repeatability. Recovery experiments were performed using commercial wheat flour spiked with FA standard solutions prepared as described above, at a 1.5 μ g AF/g level.

Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 work package. For each sample, two different batches were analysed and TF values obtained in each were compared with Student's *t*-test for independent samples, with a significance level set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Quality control of the trienzyme-microbiological assay

Intra- and inter-assay precision values obtained for SRM 1846 were (mean \pm S.D.) 1.45 \pm 0.6 mg/kg ($n = 6$) (%CV = 4.1) and 1.5 \pm 0.8 mg/kg ($n = 6$) (%CV = 5.7), respectively. Values were higher than the mass fraction of 1.29 \pm 0.28 mg/kg determined by microbiological assay with *L. casei* for this material (Sharpless et al., 1997). The reason for this difference may be due to that SRM 1846 was developed with an extraction method that does not include the trienzymatic extraction, therefore yielding a lower folate release from the food matrix. Recovery values for FA spiked wheat flour were 87.5 \pm 5% (CV = 5.7%, $n = 10$).

Microbiological assay is the method of choice for the determination of folate content of foods if data on individual folates is not deemed necessary; it is therefore suitable for food composition data and nutritional labelling purposes (Finglas, 2005). Moreover, in FA fortified cereal-based matrixes, endogenous folates, mainly 5-methyltetrahydrofolate, contribute to TF values only at a very low proportion (1–30 µg/100 g, Póo-Prieto et al., 2006).

3.2. TF content in breakfast cereals

Folic acid fortified cereal-grain products comprise 52% of the total availability of FA fortified products in the Spanish market. FA fortified breakfast cereals represent 56% of these products and, in turn, is the group with the highest amount of added FA, as declared in the label (Samaniego-Vaesken et al., 2009).

Our results showed that the mean TF concentrations ranged from 253 to 427 µg per 100 g (76–128 µg per 30 g serving) in five different cereal matrix categories (Table 1). Higher TF values were observed in wheat and bran/whole wheat based cereals; when assayed values were compared to labelled ones, also bran/whole wheat as well as oat-based cereals was 1.8 times higher than their labelled FA values.

Natural folate content of different cereal flours ranges from 4 to 48 µg per 100 g and 79 µg/100 g for wheat bran according to data from the Spanish Food Composition Tables (Farran et al., 2003; Moreiras et al., 2008b). On average and considering the upper values of our results, this would represent approximately 11% (wheat) to 21% (wheat bran) of the TF content assayed for the different cereal matrixes. Final natural folate content in these products could be even lower depending on the different manufacturing processes they undergo. For this reason and according to results published in 2006 (Póo-Prieto et al., 2006), the excess levels found in breakfast cereals could possibly account for added FA.

When considering breakfast cereal commercial type (Table 1), we found that low-fat cereals contained the highest absolute TF levels (445–630 µg/100 g) but the greatest increase in percentage of LV was observed in Muesli products (ca. 2.2 times). The majority of breakfast cereals, which were targeted at children ($n = 34$, 47% of total) contained on average 1.6 times higher amounts of TF than their LV.

Our results are consistent with data from authors who also observed higher than expected TF values in a wide variety of cereal-based foods, including breakfast cereals (98–320% of declared label values) (Rader et al., 2000; Whittaker et al., 2001). In contrast, a recent US study reported FA values, measured by both reversed-phase HPLC and microbiological assay, in breakfast cereals to be very consistent with label values (Póo-Prieto et al., 2006). Authors argue that it is plausible that food

manufacturers could have modified FA amounts added in this country since mandatory fortification was initiated in 1998.

TF was also analysed in four different brands of one of the most consumed breakfast cereal type: corn flakes. In this case, we observed a wide fortification range between the analysed brands from 103 to 593 µg/100 g, which accounted for overages between 126 and 350% of LV. Only one brand did not reach the LV (51% of LV). Therefore suggesting there is a great variability of folate levels, depending on brand selection, within potentially similar products.

3.3. Evaluation of breakfast cereals folic acid voluntary fortification levels

Fig. 1 shows the average TF values found in five types of analysed breakfast cereals, expressed as percentage of the Recommended Folate Intakes (RI) (Moreiras et al., 2008a) per recommended serving (30 g) and for different age groups. Pregnancy and breastfeeding were also included as these physiological situations demand the highest FA intakes.

The contribution of these products ranged between 40 and 160% of the RI for children aged 1–9 years. On the other hand, women of childbearing age could just cover 20–40% of their RI with a standard serving size (30 g). It should be noted that these theoretically calculated figures could widely vary according to breakfast cereal consumption patterns among different groups.

The Enkid study (Aranceta Bartrina and Serra-Majem, 2000) evaluated the food consumption patterns of Spanish schoolchildren and adolescents (2–24 years, $n = 3534$). Data available on breakfast cereals indicated an average consumption of 37 ± 0.5 g/day (mean \pm SEM) for girls and 42 ± 2 g/day for boys. These figures are in good agreement with recommended servings declared by manufacturers. In a US study conducted in regular breakfast cereal adult consumers, an average serving size of 56 ± 4 g (mean \pm SEM) for females and 75 ± 6 g for males (Whittaker et al., 2001) was found, which is more than twice the average recommended serving (30 g).

Children aged 1–6 years present a higher risk of excessive FA intakes as low-fat breakfast cereals reach more than 50% of their ULs (Fig. 2). Nevertheless, it is quite important to outline that the products targeting this age group (Children's) only reach between 26 and 40% of their ULs per 30 g recommended serving.

Risk of FA overconsumption is hard to evaluate given the lack of accurate fortified food intake patterns of the Spanish population. Total grain and derivatives consumption is 214 g/day per capita according to newly published data on Spanish Diet and Food Consumption Panel (Varela-Moreiras et al., 2008); white bread remains the principal contributor with 134 g/day per capita. This is a difficult matter to assess because of the wide variety of food products and commercial brands, which can result in a day's consumption of several FA fortified products (i.e. breakfast cereals with milk) (Sichert-Hellert and Kersting, 2004;

Table 1
Total folate (TF) content in breakfast cereals commercialised in Spain.

	<i>n</i>	Analysed TF µg/100g	Labelled folic acid values µg/100g	Percent of label value (%) ^a	
Cereal matrix	<i>Wheat</i>	25	427 (347–507)	231 (201–261)	182 (160–205)
	<i>Corn</i>	18	253 (193–312)	183 (163–202)	145 (110–182)
	<i>Bran/whole wheat</i>	17	362 (310–416)	208 (174–241)	186 (152–221)
	<i>Oat</i>	8	301 (206–395)	161 (123–200)	187 (137–237)
	<i>Rice</i>	5	301 (227–375)	168 (166–170)	180 (135–223)
Comercial type	<i>Children's</i>	34	264 (232–300)	170 (157–181)	160 (140–177)
	<i>Low fat</i>	15	537 (445–630)	284 (261–310)	192 (160–221)
	<i>Muesli</i>	3	317 (172–463)	150 (42–258)	217 (106–330)

n = number of products in each matrix and commercial type group. Results are expressed as average from triplicates from two batches of *n* products in each group (confidence interval of 95%).

^a % label value = (analysed TF/labelled folic acid) \times 100.

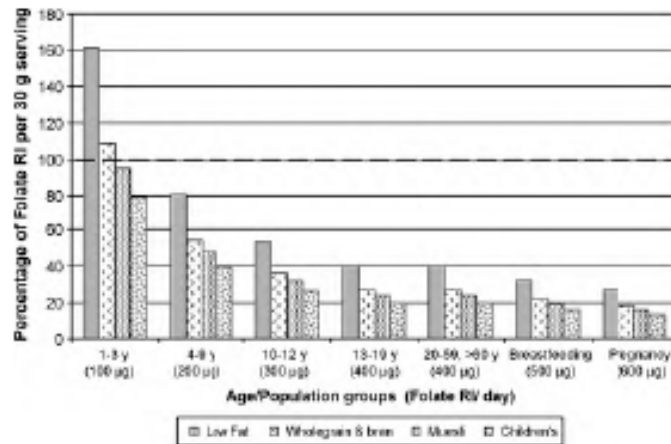


Fig. 1. Estimated contribution of breakfast cereals to recommended folate intakes (RI) for the Spanish population.

Samaniego-Vaesken et al., 2009). In addition, food fortification practices within the same brand/product may widely vary from one product batch to another; although our data are only preliminary, a high percentage of difference was observed for specific breakfast cereals, between two batches acquired with a 2-month difference. We found TF values significantly differed ($p < 0.05$) between the two analysed batches in 48% of the products. Of these, 66% of Batch 1 products were significantly higher ($p < 0.05$) with an average increase (\pm S.D.) of $23.4 \pm 11\%$. In Batch 2, 33% of products were significantly higher ($p < 0.05$) with an average increase of $19.7 \pm 6.3\%$.

A few years after mandatory fortification was introduced in the US, Rader and colleagues found, in cereal-grain fortified products, that manufacturers added overages of FA (i.e. addition of excess vitamin content to processed foods) (Rader et al., 2000). They stated this practice could compensate for theoretical vitamin losses throughout food process and shelf-life to ensure that products contained at least the amount of the nutrient shown on the label. However, FA is a highly stable form (Blakley, 1969), and this relies mainly on the nature/matrix and industrial processes of the different fortified food groups and preservation techniques, none of which are well studied (Jagerstad et al., 2005).

In the US, where mandatory and voluntary fortification coexist, the practice of overage and the number of fortified products

available could have contributed to an excessive folic acid intake (Choumenkovich et al., 2002). However, at present, a decrease in these trends have been addressed (Pfeiffer et al., 2007). Recent analysis of a wide variety of this country's FA fortified cereal-grain products found better agreement between analysed and IV (P60-Prieto et al., 2006). Nonetheless, researchers from the US also associate this trend to changes in the dietary patterns, towards a lower consumption of carbohydrate-rich food products which are likely to be FA fortified (Pfeiffer et al., 2007).

Voluntary fortification with FA was evaluated in studies conducted in Australia (27–77 years, $n = 468$) (Hidding et al., 2005) and Northern Ireland ($n = 441$, 18–92 years) (Hoey et al., 2007), finding a general improvement in serum folate status as well as a decrease in total homocysteine concentrations, a potential risk factor for cardiovascular disease (JOM, 1998). In the Australian study, this effect was observed with consumption of at least one FA fortified food in the previous week. The second study highlighted an improvement in B12, B6 and riboflavin status, vitamins which are also added to FA fortified products. They found that breakfast cereals were consumed by 63% of participants at least once per week. However, it is noteworthy that FA intake values were calculated using an in-house food composition database including food FA data from labelling or manufacturers (Hoey et al., 2007) that could possibly lead to an underestimation of FA intakes.

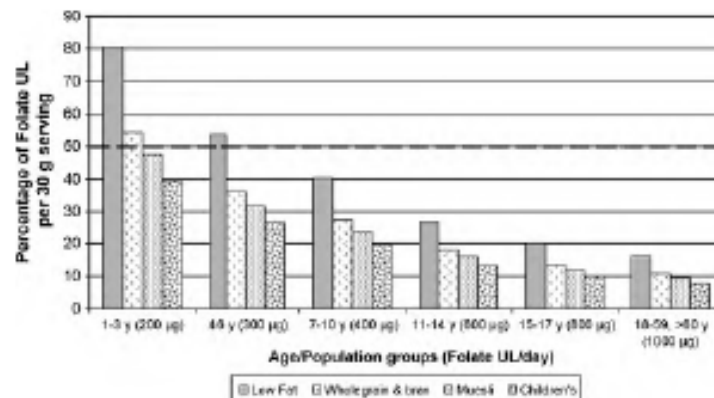


Fig. 2. Estimated contribution of breakfast cereals to folic acid tolerable upper intake levels (ULs).

4. Conclusions

Our results indicate that overages are a current practice in FA fortified breakfast cereals commonly available in Spain, as analysed values were higher than those declared by manufacturers in most cases. However, only one population age group (children) could potentially be at risk of excessive FA intake by consuming FA fortified breakfast cereals at recommended serving sizes. Other age groups, namely women of reproductive age, could actually benefit from including these products in their diet.

In order to achieve an adequate folate status, consumption of naturally folate-rich foods should be encouraged in the context of a healthy diet. However, the actual widespread practice of food fortification with FA can also play an important role as a complementary FA source for population groups who are unlikely to meet their folate requirements by diet alone. Further research needs to be undertaken in other representative FA fortified food groups commercialised in Spain, especially considering the future possibility of mandatory FA fortification of foods in European countries.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Education and Science for supporting the project AGL2005-06957 ("Content and bioavailability of folic acid in fortified foods in Spain. Impact on vulnerable population groups intakes and evaluation as potentially functional foods") and Dr. Maria King for her kind assistance in editing the final English version of this manuscript.

References

- Aranceta Bartrina, J., Serra-Majem, L., 2000. Hábitos alimentarios y consumo de alimentos en la población infantil y juvenil española (1998–2000). Estudio enKid. Masson, Barcelona.
- Arcot, J., Shrestha, A., 2005. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 16 (6–7), 253–266.
- Blakley, R., 1969. *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- CDC, 2008. Centers for Disease Control and Prevention. Trends in wheat-flour fortification with folic acid and iron worldwide, 2004 and 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 57, 8–10.
- Czeizel, A.E., Dudas, I., 1992. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New England Journal of Medicine* 327 (26), 1832–1835.
- Choumenkovitch, S.F., Selhub, J., Wilson, P.W.F., Rader, J.I., Rosenberg, I.H., Jacques, P.F., 2002. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. *Journal of Nutrition* 132 (9), 2792–2798.
- Dragsted, L., Renwick, A., Verhagen, H., Flynn, A., Tuijtelars, S., 2009. New Horizons for the Safe Addition of Micronutrients to Food. ILSI Europe.
- EC, 2000. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Folate. Retrieved January 12, 2009 from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80e_en.pdf.
- Farran, A., Zamora, R., Cervera, P., 2003. *Tablas de composición de los alimentos del CESNID*. Ed. Universitat de Barcelona. Mc Graw-Hill, Interamericana.
- Finglas, P.M., 2005. *Folate: From Food to Functionality and Optimal Health*. Institute of Food Research (IFR) Retrieved January 2009 from: http://www.ifr.ac.uk/Folate/Final_Report.pdf.
- Gregory III, J.F., 1998. Do available food composition data for folate meet current research needs? In: 22nd National Nutrient Data Bank Conference Proceedings, San Francisco, USA.
- Hickling, S., Hung, J., Knuiman, M., Jamrozik, K., McQuillan, B., Beilby, J., Thompson, P., 2005. Impact of voluntary folate fortification on plasma homocysteine and serum folate in Australia from 1995 to 2001: a population based cohort study. *Journal of Epidemiology & Community Health* 59 (5), 371–376.
- Hoey, L., McNulty, H., Askin, N., Dunne, A., Ward, M., Pentieva, K., Strain, J.J., Molloy, A.M., Flynn, C.A., Scott, J.M., 2007. Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamin status, and homocysteine in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 86 (5), 1405–1413.
- Horne, D.W., Patterson, D., 1988. Lactobacillus casei microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. *Clinical Chemistry* 34 (11), 2357–2359.
- IOM, 1998. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Panel on Folate, Other B Vitamins and Choline. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press, Washington, D.C.
- Jagerstad, M., Piironen, V., Walker, C., Ros, G., Carnovale, E., Holasova, M., Nau, H., 2005. Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. *Trends in Food Science & Technology* 16 (6–7), 298–306.
- Johnston, K.E., Tamura, T., 2004. Folate content in commercial white and whole wheat sandwich breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (20), 6338–6340.
- Kalmbach, R.D., Choumenkovitch, S.F., Troen, A.M., D'Agostino, R., Jacques, P.F., Selhub, J., 2008. Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. *American Journal of Clinical Nutrition* 88 (3), 763–768.
- Keagy, P.M., 1985. Folicin. Microbiological and animal assays. In: *Methods of Vitamin Assay*, 4th ed. Wiley, New York, pp. 445–463.
- Kim, Y.-I., 2004. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *American Journal of Clinical Nutrition* 80 (5), 1123–1128.
- Kim, Y.-I., 2007. Folic acid fortification and supplementation—good for some but not so good for others. *Nutrition Reviews* 65, 504–511.
- Martin, J.L., Landen, W.O., Soliman, A.M., Eitenmiller, R.R., 1990. Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. *Journal of the Association of Analytical Chemists* 73 (5), 805–808.
- Moreiras, O., Carvajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C., 2008a. *Ingestas Recomendadas de energía y nutrientes para la población española (revisadas y ampliadas 2006)*, 12ª ed. Departamento de Nutrición. Universidad Complutense de Madrid. *Tablas de Composición de los Alimentos*. Pirámide, pp. 228–229.
- Moreiras, O., Carvajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C., 2008b. *Tablas de Composición de Alimentos*, 12ª ed. Pirámide, Madrid.
- Morris, M.S., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., Selhub, J., 2007. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *American Journal of Clinical Nutrition* 85 (1), 193–200.
- MRC, 1991. Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338, 131–137.
- Pawlosky, R.J., Hertrampf, E., Flanagan, V.P., Thomas, P.M., 2003. Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile. *Journal of Food Composition and Analysis* 16 (3), 281–286.
- Perez Prieto, S., Cancho Grande, B., Garcia Falcon, S., Simal Gandara, J., 2006. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food Control* 17 (11), 900–904.
- Pfeiffer, C.M., Johnson, C.L., Jain, R.B., Yetley, E.A., Picciano, M.F., Rader, J.I., Fisher, K.D., Mulinare, J., Osterloh, J.D., 2007. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988–2004. *American Journal of Clinical Nutrition* 86 (3), 718–727.
- P60-Prieto, R., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., Rogers, G., Choumenkovitch, S.F., Jacques, P.F., Selhub, J., 2006. Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products. *Journal of Nutrition* 136 (12), 3079–3083.
- Rader, J.I., 2002. Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. *Journal of Nutrition* 132 (8), 2466S–2470S.
- Rader, J.I., Weaver, C.M., Angyal, G., 2000. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chemistry* 70 (3), 275–289.
- SACN, 2006. Folate and Disease Prevention. Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) Food Standards Agency. Department of Health, London TSO, United Kingdom Retrieved January 15, 2009 from: http://www.sacn.gov.uk/pdfs/folate_and_disease_prevention_report.pdf.
- Samaniego-Vaesken, M.L., Alonso Aperte, E., Varela-Moreiras, G., 2009. Folic acid fortified foods available in Spain: type of products, level of fortification and target population groups. *Nutricion Hospitalaria* 24 (4), 459–466.
- Sharpless, K., Schiller, S., Margolis, S., Thomas, J., Iyengar, G., Colbert, J., Gills, T., Wise, S., Tanner, J., Wolf, W., 1997. Certification of nutrients in standard reference material 1846: infant formula. *Journal of AOAC International* 80, 611–621.
- Sichert-Hellert, W., Kersting, M., 2004. Fortifying food with folic acid improves folate intake in German infants, children, and adolescents. *Journal of Nutrition* 134 (10), 2685–2690.
- Tamura, T., 1990. Microbiological assay of folates. In: *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*, Wiley-Liss, Inc., pp. 121–137.
- Troen, A.M., Mitchell, B., Sorensen, B., Wener, M.H., Johnston, A., Wood, B., Selhub, J., McTiernan, A., Yasui, Y., Oral, E., Potter, J.D., Ulrich, C.M., 2006. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *Journal of Nutrition* 136 (1), 189–194.
- Varela-Moreiras, G., Ávila, J., Cuadrado, C., del Pozo de la Calle, S., Moreno, E., Moreiras, O., 2008. Valoración de la Dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario. Fundación Española de la Nutrición (FEN), Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Wald, D.S., Wald, N.J., Morris, J.K., Law, M., 2006. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ* 333 (7578), 1114–1117.
- Whittaker, P., Tufaro, P.R., Rader, J.I., 2001. Iron and folate in fortified cereals. *Journal of the American College of Nutrition* 20 (3), 247–254.
- Wills, L., 1931. Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia" with special reference to yeast extract as a curative agent. *Nutrition* 7 (5), 323–327.
- Wright, A.J.A., Dainty, J.R., Finglas, P.M., 2007. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *British Journal of Nutrition* 98, 667–675.

Publicación 3

Samaniego-Vaesken, M.d.L., E. Alonso-Apperte, and G. Varela-Moreiras, *Vitamin food fortification today*. Food Nutr Res, 2012. 56.

Vitamin food fortification today

Maria de Lourdes Samaniego-Vaesken, Elena Alonso-Apperte and Gregorio Varela-Moreiras*

Department of Pharmaceutical and Food Sciences, Faculty of Pharmacy, CEU San Pablo University, Madrid, Spain

Abstract

Historically, food fortification has served as a tool to address population-wide nutrient deficiencies such as rickets by vitamin D fortified milk. This article discusses the different policy strategies to be used today. Mandatory or voluntary fortification and fortified foods, which the consumer needs, also have to comply with nutritional, regulatory, food safety and technical issues. The 'worldwide map of vitamin fortification' is analysed, including differences between developed and developing countries. The vitamins, folate and vitamin D, are taken as practical examples in the review of the beneficial effect of different strategies on public health. The importance of the risk-benefit aspect, as well as how to identify the risk groups, and the food vehicles for fortification is discussed.

Keywords: *food fortification; folic acid; vitamin D; policies; deficiencies*

In the past, food fortification along with nutritional education and the decrease in *food costs* relative to income have been of great success in eliminating the common nutritional deficiencies. These deficiencies, such as goiter, rickets, beriberi and pellagra, have since been replaced with another set of 'emergent deficiencies' that were not previously considered a problem (e.g. folate and neural tube defects, zinc and child growth and selenium and cancer). In addition, the different nutrition surveys in the so-called affluent countries have identified 'shortfall' nutrients specific to various age and/or physiological status. Complex, multiple lifestyle diseases, such as atherosclerosis, diabetes, cancer and obesity, have emerged. It is widely known that these are not simply deficiency diseases, but rather conditions that are present in a relatively well-nourished society. Food fortification was proven an effective tool for tackling nutritional deficiencies among population; but today, a more reasonable approach is to use food fortification as a mean to support but not replace dietary improvement strategies (i.e. nutritional education campaigns) (1).

The main goal of the present article is to review the past record and its effect on public health including a look into the future.

An example of success in food fortification programmes can be found in the United States, where great efforts have been made within public health officials and educators, the private industry and epidemiological evaluation (2). In the early 1920s, medical researchers announced that iodine

could prevent goiter that was widespread at that time (2). Through this was a successful fortification programme. Thereafter in 1932, milk was fortified with vitamin D, and again, this was heavily supported by the medical community because of the prevalence of rickets in children (2). This was followed by the 1941 fortification of flour and bread with the B vitamins, which was 'presented as insurance against nutritional deficiencies', when B vitamin deficiencies were prevalent in the United States and most of Europe (3). Cooperation between the private and public sectors was essential to address public health needs. That said, are the products that are currently on the market serving the nutritional needs of the population? It is clear that nowadays is a *different world*. What began in the 1920s of the last century as a response to a public health need has escalated into an industry-driven fortification with frequent conflicts of interests with the public health campaign. One of the main issues today is that consumers are seeking foods with health benefits, in an era of complex diseases. Currently, international organisations and the public sector are actively working on this field (4).

Food fortification in today's world

Historically, food fortification, such as iodised salt or vitamin D-fortified milk, served as a public health measure to address population-wide nutrient deficiencies. By means of restoring nutrients removed during food processing or replacing nutrients in substitute foods, today's food fortification comprises several initiatives,

where foods must meet not only consumer needs and preferences but also comply with nutritional, regulatory, food safety and technical constraints. Previous fortification policies were great successes, but authorities are facing other problems in developed countries that seem to be inhabited by well-nourished people.

More than 67 countries require fortification of certain staple foods. The main examples are folic acid fortified wheat or maize flour to reduce the risk of neural tube defects (NTD) and limitation of fortification of foods with certain nutrients such as vitamin D. The first question to consider is whether these approaches are aligned with nutritional needs, as *nutritional deficiencies are often limited to a subset of the population* (5). And secondly, if all food ingredients are safe at the level of addition when used as intended, or in other words: *which is the right dose of the fortificant so that it is effective but not toxic?* (5).

Internationally, the Codex Alimentarius of the Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) have established general principles for the addition of vitamins and minerals to foods. For example, the guidelines on food fortification with micronutrients published in 2006 (6) outline FAO/WHO initiatives for folic acid. However, each country determines its own policy or regulations, and fortification approaches can vary widely throughout the world.

In the past few years, food industry made calcium and vitamin D-fortified juices, breads fortified with omega-3 fatty acids and vegetable oil spreads with plant sterols available for consumers searching for foods with additional health benefits (7). This is the basis of voluntary fortification, the practice by which different concentrations of vitamins, mineral and other nutrients are added to processed foods, and decisions about which products and how to fortify them are made by food manufacturers. Harmonisation of this practice is essential as it is common in many countries. Therefore, it is expected that Europe will be under a unique regulation in the near future. This regulation will control the addition of nutrients to foods and the nutritional claims stated on their labels (Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods).

Remarkably, the indiscriminate addition of nutrients to foods and the fortification of fresh products are not allowed by the US Government, and fortification of unprocessed foods is prohibited in European countries. Furthermore, fortification of certain types of foods, such as sugars and some snack foods (e.g. candies and carbonated beverages), is discouraged. Importantly, food has to taste good and be appealing to consumers, so fortification is often self-limiting.

Who are the usual consumers of supplements and fortified foods?

Fortified foods and multivitamin supplements are frequently included in the daily diets of many populations from western developed countries. Amongst frequent users are women and their relatives, the elderly and chronic patients but especially people who are well educated or from a high socio-economic background (8). This group are considered the 'healthy and active people', who paradoxically may not necessarily present any nutritional deficiency. Recent publications from the US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) reported a high proportion of seniors (9, 10) and also of children 1–13 years (11) who were frequent consumers of these products. A new era in nutrition has clearly evolved very recently with unknown expected results at population level in the future.

Vitamin content and stability in processed and ready-to-eat foods

Vitamin content of foods is susceptible to losses and/or can be destroyed during technological/cooking processes induced by a number of factors. Most losses are because of their solubility in water that is dependent on the cooking method used. However, some vitamins are subject to additional losses: B vitamins are more labile to temperature and light, whereas fat-soluble vitamins are labile to oxygen (12, 13). Losses depend on the type of food and its process: for example, thiamine, natural folates and vitamin C can reach up to 100% loss when different concomitant cooking and processing conditions are given (12, 14).

Although the availability of processed foods containing added vitamins and other nutrients is increasing, food tables and databases show a lack of accurate and updated data on their composition. This is the case for not only critical nutrients such as folic acid and iron but also for many other nutrients and non-nutritive compounds (15–17). To overcome these difficulties, the EuroFIR project is making a great contribution in unifying and harmonising food composition databases across Europe (18).

Is it possible to follow the Mediterranean diet adherence in a 'fortified world'?

The Mediterranean diet model is based on a high consumption of 'fresh' products, including vegetables, fruits, legumes and fish, with olive oil as the main source of fat. Recent publications underline the concern that Mediterranean countries are drifting away from this healthy model (19, 20), moving towards a higher intake of meat, processed, high-fat, high-salt and sugary foods (21). These 'new' patterns affect the nutritional status of different population groups living in these countries, particularly as vitamin recommended intakes are not met by a high percentage of the population (22).

In addition, serving/portion size is an untargeted issue in fortification of staples. Recommended and/or standard serving sizes are the basis for intake assessments, but it should be taken into account that they will vary depending on the population–age–gender group: they each have specific requirements and recommended intakes. Manufacturers normally include fixed serving sizes in the nutrition label of their products, but how realistic are these? In a pilot study, Whittaker et al. (16) found that regular adult breakfast cereal consumers ate nearly twice the recommended serving found on the product's label, meaning that they also consumed twice the intended vitamin/mineral content per serving of cereal. This fact is of great importance for monitoring and assessing nutrient intakes, especially for children and adolescents. Moreover, nutrient contents/levels in fortified food labels do not always match label information. Different studies, including those from our group, found overages in fortified products, showing that manufacturers may add higher quantities of the nutrient to ensure its presence at declared levels throughout shelf life (16, 23, 24).

In the Spanish market, we found a wide choice of fortified food groups that may contain different nutrient levels depending on product group (dairy, cereals, etc.), brand name and target population (i.e. children). However, there is a high proportion of products that present no specific target population for consumption (Fig. 1) (25).

The 'big two' in vitamin fortification today: folic acid and vitamin D

Folic acid

Folate is a general denomination that includes all vitamers with the activity of the B vitamin pteroylglutamic acid. Folic acid is a monoglutamate synthetic compound added to food for fortification; it is a more chemically stable form than the natural vitamers (26). Several studies have found a higher bioavailability in men

for folic acid, (27) and the result of these findings was the establishment and use of the dietary folate equivalents (DFE). The term DFE accounts for the higher bioavailability of the synthetic form versus the natural folate vitamers, where DFE equals the micrograms of food folate plus 1.7 times the micrograms of added folic acid. Then, use of DFE was recommended by the US Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine for planning and evaluating folate intakes (28).

Folic acid is an essential micronutrient involved in the prevention of macrocytic anaemia that acts as a co-factor in cellular development and homeostasis throughout all life stages (29). It has been identified as a potential factor in the aetiology of vascular disease (30), certain types of cancer (31, 32), cognitive impairment in the elderly (33) and prevention of congenital abnormalities known as NTD (34, 35). As scientific evidence is still inconclusive (36, 37), the only established recommendations at present are aimed at women of childbearing age for reducing their risk of having a NTD affected pregnancy.

Strategies to improve folate status in the target population

The evidence linking folic acid to NTD prevention led to the introduction of three potential strategies to improve folate status among target populations: pharmacological supplementation, mandatory or voluntary fortification of staple foods with folic acid and the advice to increase intakes of natural folate food sources. The potential strengths and weaknesses of these approaches, summarised in Table 1, have been widely evaluated, but questions remain regarding their effectiveness.

The main public health measure for primary prevention of NTD in many countries is the recommendation of folic acid supplements taken periconceptionally amongst women who are planning a pregnancy. Increasing awareness and knowledge of the role of periconceptional folate in women of childbearing age by educational campaigns is difficult, as women do not generally plan their

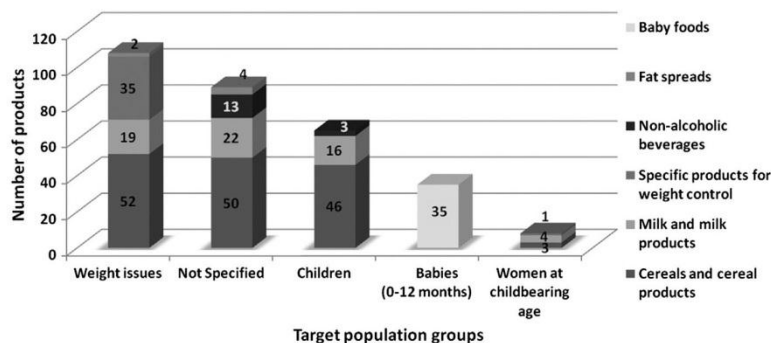


Fig. 1. Distribution and main target consumption population groups of folic acid-fortified foods available in the Spanish market.

Note: Adapted from Samaniego-Vaesken et al. (25).

M de Lourdes Samaniego-Vaesken et al.

Table 1. Comparative analysis of strategies to improve folate intake

	Strengths	Weaknesses
Nutritional advice: natural folate sources	Overall improvement of population's nutritional status Diet should provide all nutrients needed (38)	Difficulty to change dietary habits Low amounts in foods and limited number of food sources (legumes, green leaf vegetables, etc.) Bioavailability and chemical stability of folates is questioned (39, 40)
Pharmacological supplementation	Target population specificity (e.g. women at childbearing age) (41, 42) Better dosage	Lower adherence Depends on socio-economical status (9) Potentially higher risk of toxicity when combined with fortification practices (10)
Mandatory fortification	Reaches all population groups No need to change dietary habits Better cost-effectiveness (28, 40)	Dosage is a function of serving size Risk of high intakes in untargeted population Different fortification ranges and laws across countries (43)
Voluntary fortification	Target consumption with marketing of products (e.g. breakfast cereals for children) (25) Consumption is a matter of food choice	Different fortification levels depending on manufacturers and food groups (25) Higher costs Potentially high or insufficient intakes depending on consumption patterns/dietary habits (16)

pregnancies, and those at higher risk of NTD affected pregnancies (lower socio-economic, education status) are not always reached by health promotion messages and are less likely to be supplement takers (9).

In 1998, the US Food and Nutrition Board advised that all women capable of becoming pregnant should consume a daily dose of 400 µg of synthetic folic acid, either in the form of fortified foods or supplements, in addition to naturally occurring folates from food (28).

With regard to the advice to increase dietary intake of naturally occurring folate, efforts, such as health promotion campaigns to achieve dietary changes on a population basis, have been proven to have limited success (21, 44). Not only does it require a behavioural change, but changes also need to be accessible, affordable and sustainable (21). In addition, some countries introduced mandatory fortification of a staple food and/or allowed manufacturers to voluntarily fortify certain foodstuffs (17).

Voluntary fortification requires women to know about and choose fortified foods, or that commonly and regularly eaten staple foods are fortified (e.g. milk) and affordable. In other words, most women must consume the fortified foods whether or not they are aware of their folic acid content. In addition, variations in folic acid amounts added by different manufacturers to different foodstuffs (25), or higher than expected content 'overages' (16, 24), add difficulty to monitoring folate intakes from these foods by the population.

Mandatory fortification seems to be the key to overcome many of the drawbacks described above. Most women will consume fortified food regardless of socio-economic disparities or family planning. Many countries adopted this measure starting more than 10 years ago in

the United States and Canada (28). So far, about 67 fortify either wheat or maize flour with folic acid (45). Conversely, other countries are still reluctant to implement this population-wide strategy, as is the case in European countries that only allow addition of this vitamin on a voluntary basis (45).

In a recent report on folic acid-preventable spina bifida and anencephaly, Bell and Oakley (41) estimated that 27% of the world's population now has access to folic acid-fortified flour. However, after 18 years of knowledge, only 10% of preventable birth defects are actually prevented by current fortification programmes. The main lack is in developing countries (41).

Examination of selected national policies towards mandatory folic acid fortification

Mandatory folic acid fortification raises a number of scientific, ethical and technical challenges (46). Lawrence et al. (43) summarised the implications of different folic acid fortification policies worldwide to assess their nature and rationale, as well as the lessons learned from their implementation. All of the reviewed countries have identified the folic acid/NTD relationship as important and recommend the consumption of folic acid supplements (400 µg/day) and food folate for women of childbearing age. Despite having access to the same epidemiological evidence, the selected countries have diverse policy positions on mandatory folic acid fortification, which reflect different interpretations of the potential risks and benefits. An example of two countries that apply different fortification policies are China and Finland. Differences are, for instance, the high NTD rates in China in contrast to those in Finland (43).

In China, the recommendation states that all women of childbearing age obtain health information and advice on folic acid supplementation of 400 µg/day, for 3 months before and after conception. This advice is given premaritally and at their periconceptional checkup that is conducted through the maternal and infant health care system. In 2001, it was agreed to initiate a flour fortification pilot programme at 2 mg folic acid/kg of flour. The pilot trial of fortified flour consumption was conducted during 2003–2006. In 2004, fortified flour was introduced into the marketplace. Although certain local government regions encouraged implementation of folic acid fortification of flour, in 2006, the State Grain Bureau drafted a national standard for fortified flour, which is still awaiting government authorisation. The main lesson learned concerns the fact that China has a diverse consumption pattern of food staples and so it is difficult to assess the best food candidate for fortification. In addition, the NTD incidence is highest in remote and less developed regions of China. Generally, in these regions, people consume homemade flour rather than commercial flour that has been fortified with folic acid (43).

In contrast, Finland does not allow mandatory fortification of staple foods with folic acid, and there are no policy discussions at the moment. A balanced diet, rich in folate, is recommended for all women planning a pregnancy or in early pregnancy, to obtain at least 400 µg of folate daily. In addition, a daily supplement of 400 µg folic acid is recommended for all women planning a pregnancy or in the early stages of pregnancy. Nevertheless, voluntary fortification of certain food products is allowed. In this country, between 37 and 86% of pregnancies are planned, but the first pre-natal visit is far too late for NTD prevention. The major limitation for risk evaluation and monitoring of any fortification programme to be implemented is the need for updated data on folate intake of the target group and the population in general. This can be applied to most countries whether they adopt mandatory fortification or not. In summary, policies should be determined and assessed on a 'fit for purpose' basis meaning each country has to address the potential risks and benefits taking into consideration its unique circumstances and possibilities.

Concerns related to folic acid fortification today

Increased folic acid intakes in some population groups have raised special concerns about potential adverse effects, as scientific evidence has still not clarified if the benefits outweigh the risks, mainly in children and the elderly.

Because high doses of folic acid are able to correct the anaemia associated with vitamin B₁₂ deficiency, high intakes could delay the diagnosis of the latter vitamin by masking its deficiency, which could lead to irreversible neurological damage/higher risk of memory impairment

(47). Scientific data are still inconclusive as to whether folic acid supplementation accelerates or delays age-related cognitive decline (48).

Of further and more recent concern is the association of folic acid with a potential increase in the risk of cancer, particularly colorectal (49). Folic acid has a role as a co-factor in nucleotide synthesis, and its availability can promote proliferation of rapidly dividing malignant cells. Observations from both animal and human studies have suggested the possibility of a 'dual effect' of this vitamin in cancer development, depending on the timing and dose of the intervention (49). High intakes may suppress the development of early lesions in normal tissues, probably by maintaining genetic stability but may in turn increase the progression of neoplastic cells. This complex relationship that was referred to as the 'double-edged sword' by Kim (50) is exerting a necessary halt/delay in the widespread folic acid fortification in many countries, although the safety of this policy is ensured for all population groups (51). Moreover, adequacy of other vitamin status, such as B₂, B₆ and B₁₂, has to be taken into account, as they are interconnected and serve as co-factors for crucial enzymes of the one-carbon metabolism.

As previously described, recently published results from the NHANES study in the United States estimated that in 2003–2006, 53% of the population used dietary supplements, and from these, 34.5% used dietary supplements that contained folic acid. Total folate intake (in DFE) was higher for men than for women and higher for non-Hispanic whites than for Mexican Americans and non-Hispanic blacks. Total folate and folic acid intakes were highest for those aged 50 years, and 5% exceeded the tolerable upper intake level. Improved total folate intakes were observed in targeted populations (10). However, it is noteworthy that the authors specify that estimates of folic acid intakes from food sources and dietary supplements rely on the product's label not analytical values and that those amounts could be higher than declared (23, 52) as is the case for fortified foods.

To quantify the health and economic outcomes of mandatory folic acid fortification in the United States, Bentley et al. (53) conducted a cost-effectiveness analysis considering different health outcomes in four projected scenarios (including 'no fortification') and taking the adult population with folate intake distributions from the NHANES (1988–1992 and 1999–2000) as reference. The greatest benefits from fortification implementation were predicted for myocardial infarction prevention. All post-fortification strategies provided quality-adjusted life years gains and cost savings for all sub-groups, much higher for the so-called 700 µg/100 g 'strategy'. It was concluded that health and economic gains could outweigh the losses for the US population as a whole.

In Spain, where currently voluntary folic acid fortification is allowed, the food industry is offering a significant

M de Lourdes Samaniego-Vaesken et al.

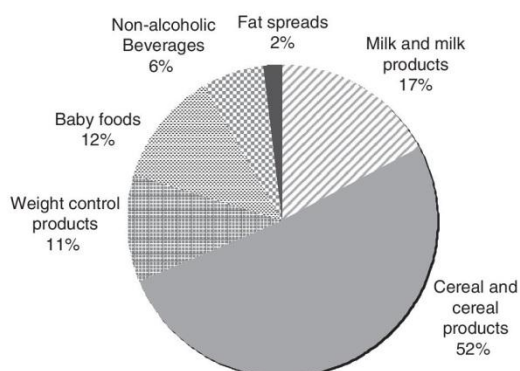


Fig. 2. Distribution of main folic acid-fortified food groups available in Spain.

Note: Adapted from Samaniego-Vaesken et al. (25).

and increasing number of folic acid-fortified products from different food groups aimed at a wide variety of populations (Fig. 2) (25). Furthermore, overage seems to be a common practice, and there is still a lack of reliable data to assess the impact of the increasing number of folic acid-fortified foods. In a recently published study by our group, breakfast cereal products were analysed to evaluate folic fortification levels. According to laboratory values, 'low fat' ($n = 15$) contained the highest total folate (445–630 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), which represented almost twice the declared label values, but similar results were obtained for fibre, muesli and corn flake categories (24).

Vitamin D

Background: how many whole nations become vitamin D deficient?

The term vitamin D is a generic term that comprises a family of fat-soluble metabolites involved in calcium metabolism and homeostasis and thus bone formation and resorption. The physiologically active form of vitamin D is the 1,25-dihydroxyvitamin D_3 . Without an adequate status of this metabolite, the small intestine cannot absorb more than 10%–15% of dietary calcium (54). Sun exposure (ultraviolet B radiation) is the main source of vitamin D_3 to humans as it can be synthesised in the skin. In fact, our ape ancestors probably had adequate vitamin D status unlike the modern human: we cover about 95% of our skin surface, spend less time in the sun, wear sunscreen and are subjected to geographical differences that account for less sun hours per day. Awareness of the role excessive exposure plays in increasing risk of skin cancer has risen. In addition, nutritional sources of vitamin D are limited: oily fish is considered to be one of the best and its recommended intakes are of at least 3–4 times per week (55). But a question that has evolved recently is: 'are there enough fish in the sea?' it seems not (55). Foods such as milk, orange juice, cereals and some breads are fortified

with vitamin D, but contribution from diets is very variable (54). Human's requirements of vitamin D are met mostly by casual exposure to sun. During winter, storage of body fat can be utilised as the skin has a large synthesis capacity (54).

Epidemiological evidence shows that there is a high prevalence of vitamin D deficiency especially among elderly population groups. It is a known fact that vitamin D production in the skin decreases about four times with age (55); in addition, this group is prone to avoid sun exposure and limit their outdoor activities. The survey in Europe on nutrition and the elderly: a concerted action (SENECA) study revealed that there is scarce cutaneous vitamin D production from November to May in most of European seniors. This was primarily a consequence of avoiding the sun, and surprisingly, lowest levels were observed in the Mediterranean seniors (56, 57).

How many are deficient? The SENECA study: vitamin D status in elderly population

Van der Wielen et al. (56) measured 25-hydroxyvitamin D in serum (25(OH)-D), in adult population across 11 European countries during winter and found that free-living elderly, regardless of geographical location, were at high risk of inadequate vitamin D status. Thirty-six percent of men and 47% of women had 25(OH)-D concentrations below 30 nmol/L; threshold with an increased risk of osteomalacia (bone disease produced by severe vitamin D deficiency i.e. 25(OH)-D ≤ 25 nmol/L). Authors' recommended dietary enrichment or supplementation with vitamin D should be seriously considered during this season. In the studied population, major food sources of vitamin D were fish (62%), eggs (20%) and dairy products (8%) and intakes ($\mu\text{g}/\text{day}$), as well as serum 25(OH)-D levels (nmol/L) were lower for women. Assessment of overall vitamin D status was regarded as marginal in 62% of seniors.

In the Optimal Fortification with Vitamin D (OPTIFORD) European project, relative contribution of both sun exposure during summer and diet to vitamin D status were analysed across five European countries, comparing adolescents versus elderly women. When dietary intake of vitamin D was assessed, authors found that elderly females consumed 3.9 ± 5.0 $\mu\text{g}/\text{day}$, whereas adolescent girls consumed 2.8 ± 2.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ with fish and eggs as the main food sources. However, sun exposure, measured with an adhesive skin dosimeter (J/m^2), revealed that Spanish elderly women received less than half the sun exposure of their adolescent counterparts (58). This situation was not observed in the rest of the participating countries (i.e. Finland).

When vitamin D exposure and status, measured as 25(OH)-D in plasma in winter versus summer, in a Spanish elderly women population were compared, both were clearly higher in the latter. Nevertheless,

vitamin D deficiency affected 28% of the women during summer time, although this percentage was doubled in winter. In addition, dietary intakes of $\geq 95\%$ of the population sample did not reach the recommended dietary intakes for vitamin D in the summer or winter season (34.5 and 31.3%, respectively); with oily fish as the main food source (59).

Vitamin D fortification and supplementation: implications and public health potential

Available evidence found in meta-analyses of double-blinded trials indicates that supplemental vitamin D has dose-dependent beneficial effects on bone health and muscle strength. These are both related to prevention of falls and, therefore, hip and other non-vertebral fractures that are the main causes of disability in the elderly (60). 25(OH)-D serum concentrations of 75–110 nmol/L provide an adequate status for fall and fracture prevention (61).

What remains to be proven are other additional and not less important, public health benefits. In cancer prevention, vitamin D may have a role downregulating or inhibiting cell proliferation in colorectal cancer (62). It has also been shown to act as an important immune system regulator: vitamin D receptors are present on T-cells, B-cells, macrophages and other immune cells, providing modulatory effects that could have benefits for the occurrence of autoimmune diseases such as Type I diabetes, rheumatoid arthritis and asthma (63).

Based on data of a benefit–risk assessment published in 2009 by Bischoff-Ferrari et al. (61), it has been proposed that 800–1,000 IU of vitamin D per day may be needed to achieve a satisfactory status in all adults of 75–100 nmol/L of 25(OH)-D. However, as in the case of folic acid, authors agree that larger trials are needed to confirm benefits and safety of these new and promising approaches.

Vitamin D supplements use and adherence

In a recent study that estimated the prevalence and patterns of use of over-the-counter medications and dietary supplements in a sample of adults aged 57–85 years ($n=3,005$), findings showed that 49% (95% CI, 46.2%–52.7%) used a dietary supplement (64). Amongst the most popular supplements were multivitamins (28%), calcium (17%) and vitamin C (9%). Only 4.5% of the users declared a daily consumption of Vitamin D supplements.

Another study conducted in Italy investigated the global adherence to osteoporosis treatment in a nationwide survey carried out in post-menopausal women ($n=9,851$) (65). They were referred to centres for osteoporosis management for a follow-up assessment, at least 1 year after having been prescribed either a treatment with calcium+vitamin D alone or other drugs (hormone replacement therapy, etc.). Results showed that 19.1%

of the patients discontinued the prescribed drug before attending the bone mass re-evaluations. Most frequent reasons for discontinuation were drug-related side effects, insufficient motivation to treatment and fear of side effects. Lack of motivation was the most common cause for poor compliance in the case of calcium+vitamin D supplements, whereas best treatment adherence was observed in patients with severe osteoporosis (65).

Fortification tomorrow

At present, it seems clear that ‘optimal nutrition’ remains a moving target in the food fortification field: to appropriately design a fortification programme, nutritional status of many micronutrients has to be assessed. Furthermore, as nutrigenomic studies identify individuals with higher, or at least different nutrient requirements, nutrient fortification may help optimise an individual’s nutritional needs. The scientific evidence base continues to evolve, and discovery of new compounds with health-promoting effects will call for new strategies involving both nutrition guidance and fortification with a focus on benefit–risk assessment.

In summary, questions and issues to be fully addressed regarding whether we are targeting the most appropriate food vehicles with nutrients and the levels needed by those who actually consume them are currently still under discussion. Further studies comprising the monitoring of population intakes in countries, where fortification is implemented at different levels will grant greater insight into improved policies. What is clear is that harmonising food fortification policies, within the scope of optimal and safe levels, will enable suitable competition in a global food supply with no trade barriers and possibly achieve the necessary right balance for vitamin food fortification.

Conflict of interest and funding

The authors have not received any funding or benefits from industry or elsewhere to conduct this study.

References

1. Tontisirin K, Nantel G, Bhattacharjee L. Food-based strategies to meet the challenges of micronutrient malnutrition in the developing world. *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 243–50.
2. Backstrand JR. The history and future of food fortification in the United States: a public health perspective. *Nutr Rev* 2002; 60: 15–26.
3. Bishai D, Nalubola R. The history of food fortification in the United States: its relevance for current fortification efforts in developing countries. *Econ Develop Cult Chan* 2002; 51: 37–53.
4. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union L* 404/9.
5. Refsum H, Smith AD. Are we ready for mandatory fortification with vitamin B-12? *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 253–4.

M de Lourdes Samaniego-Vaesken et al.

6. Allen L, de Benoist B, Dary O, Hurrell R. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2006, pp. 19–20, 61–4.
7. Dragsted L, Renwick A, Verhagen H, Flynn A, Tuijthelaars S. New horizons for the safe addition of micronutrients to food. Europe: ILSI; 2009, pp. 11–2.
8. Shaikh U, Byrd RS, Auinger P. Vitamin and mineral supplement use by children and adolescents in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey: relationship with nutrition, food security, physical activity and health care access. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009; 163: 150–7.
9. Yang Q, Cogswell ME, Hamner HC, Carriquiry A, Bailey LB, Pfeiffer CM, et al. Folic acid source, usual intake, and folate and vitamin B-12 status in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2006. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 64–72.
10. Bailey RL, Dodd KW, Gahche JJ, Dwyer JT, McDowell MA, Yetley EA, et al. Total folate and folic acid intake from foods and dietary supplements in the United States: 2003–2006. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 231–7.
11. Bailey RL, McDowell MA, Dodd KW, Gahche JJ, Dwyer JT, Picciano MF. Total folate and folic acid intakes from foods and dietary supplements of US children aged 1–13 years. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 353–8.
12. Harris RS, Karmas E. Nutritional evaluation of food processing, 2nd ed. Westport: AVI Publishers; 1975, pp. 318–9.
13. Priestley RJ. Vitamins. Effects of heating on foodstuffs. London: Applied Science publishers; 1979, pp. 121–56.
14. McKillop DJ, Pentieva K, Daly D, et al. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J Nutr* 2002; 88: 681–8.
15. Gregory III JF. Do available food composition data for folate meet current research needs? 22nd National Nutrient Data Bank Conference Proceedings. San Francisco, USA, 1998 [cited 16 April 1998].
16. Whittaker P, Tufaro PR, Rader JI. Iron and folate in fortified cereals. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 247–54.
17. Bouckaert KP, Slimani N, Nicolas G, Vignat J, Wright AJ, Roe M, et al. Critical evaluation of folate data in European and international databases: recommendations for standardization in international nutritional studies. *Mol Nutr Food Res* 2010; 55: 166–80.
18. Westenbrink S, Oseredczuk M, Castanheira I, Roe M. Food composition databases: the EuroFIR approach to develop tools to assure the quality of the data compilation process. *Food Chem* 2009; 113: 759–67.
19. Cucó G, Fernández-Ballart J, Martí-Henneberg C, Arija V. Food group and macronutrient intake behavior in a Spanish Mediterranean population. *Nutr Res* 2003; 23: 857–68.
20. Varela-Moreiras G, Ávila JM, Cuadrado C, del Pozo S, Ruiz E, Moreiras O. Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: S37–43.
21. Wolf A, Elmadfa I, Ronald RW, Victor RP. Fruit and vegetable intake of mothers in Europe: risks/benefits. In: Ross WR, Victor RP, eds. *Bioactive foods in promoting health*. San Diego: Academic Press; 2010, pp. 161–172.
22. Elmadfa I, Freisling H. Nutritional status in Europe: methods and results. *Nutr Rev* 2009; 67: S130–4.
23. Rader JI, Weaver CM, Angyal G. Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chem* 2000; 70: 275–89.
24. Samaniego-Vaesken ML, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market. *J Food Compos Anal* 2010; 23: 419–23.
25. Samaniego-Vaesken ML, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Folic acid fortified foods available in Spain: type of products, level of fortification and target population groups. *Nutr Hosp* 2009; 24: 459–66.
26. Blakley R. The biochemistry of folic acid and related pteridines. Amsterdam: North-Holland Publishing; 1969, pp. 76–8.
27. Gregory III JF. The bioavailability of folate. In: Bailey LB, ed. *Folate in Health and Disease*. New York: M. Dekker; 1995, pp. 195–235.
28. IOM. Panel on Folate, other B vitamins and Choline. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: National Academy Press, National Academy of Sciences, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board; 1998, pp. 207–10.
29. Wills L. Treatment of pernicious anaemia of pregnancy and tropical anaemia with special reference to yeast extract as a curative agent. *Nutr* 1931; 7: 323–7.
30. Bazzano LA. Folic acid supplementation and cardiovascular disease: the state of the art. *Am J Med Sci* 2009; 338: 48–9.
31. Hirsch S, Sanchez H, Albala C, De la Maza MP, Barrera G, Leiva L, et al. Colon cancer in Chile before and after the start of the flour fortification program with folic acid. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 436–39, doi: 10.1097/MEG.0-b013e328306ccdb.
32. Kim Y-I. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1123–8.
33. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 193–200.
34. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New Engl J Med* 1992; 327: 1832–5.
35. MRC. Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131–7.
36. Wald DS, Wald NJ, Morris JK, Law M. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ* 2006; 333: 1114–7.
37. Rader JI. Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. *J Nutr* 2002; 132: S2466–S70.
38. Hung J, Yang TL, Urrutia TF, Li R, Perry CA, Hata H, et al. Additional food folate derived exclusively from natural sources improves folate status in young women with the MTHFR 677 CC or TT genotype. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 728–34.
39. Gregory III JF, Quinlivan EP, Davis SR. Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends Food Sci Technol* 2005; 16: 229–40.
40. Caudill MA. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 1455S–60S.
41. Bell KN, Oakley J, GP. Update on prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Birth Defects Research Part A: Clin Mol Teratol* 2009; 85: 102–7.
42. Czeizel AE, Puhó EH, Langmar Z, Acs N, Bánhidý F. Possible association of folic acid supplementation during pregnancy with reduction of preterm birth: a population-based study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 148: 135–40.
43. Lawrence MA, Weizhong C, Raija K, Irwin HR, John S, Alison T. Examination of selected national policies towards mandatory folic acid fortification. *Nutr Rev* 2009; 67: S73–8.
44. Öhrvik VE, Olsson JC, Sundberg BE, Witthoft CM. Effect of 2 pieces of nutritional advice on folate status in Swedish

- women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1053-8.
45. Maberly G, Grummer-Strawn L, Jeffers M. Trends in wheat-flour fortification with folic acid and iron – worldwide, 2004 and 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57: 8-10.
 46. Smith AD. Folic acid fortification: the good, the bad, and the puzzle of vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 3-5.
 47. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 1733-44.
 48. EFSA. Folic acid: an update on scientific developments. Meeting summary report. Uppsala: European Food Safety Authority; 2009, pp. 10-1.
 49. Smith AD, Kim Y-I, Refsum H. Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 517-33.
 50. Kim YI. Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? *Gut* 2006; 55: 1387-9.
 51. Mason JB. Folate, cancer risk, and the Greek god, Proteus: a tale of two chameleons. *Nutr Rev* 2009; 67: 206-12.
 52. Dwyer J, Holden J, Andrews K, Roseland J, Zhao C, Schweitzer A, et al. Measuring vitamins and minerals in dietary supplements for nutrition studies in the USA. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 37-46.
 53. Bentley TGK, Weinstein MC, Willett WC, Kuntz KM. A cost-effectiveness analysis of folic acid fortification policy in the United States. *Public Health Nutr* 2009; 12: 455-67.
 54. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 362-71.
 55. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, Mathieu J, Person KS, Zhang A, et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 2007; 460: 213-7.
 56. van der Wielen RPJ, de Groot LCPGM, van Staveren WA, Löwik MRH, van den Berg H, Haller J, et al. Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe. *Lancet* 1995; 346: 207-10.
 57. Moreiras O, Carbajal A, Perea I, Varela-Moreiras G. The influence of dietary intake and sunlight exposure on the vitamin D status in an elderly Spanish group. *Int J Vitam Nutr Res* 1992; 62: 303-7.
 58. Rodriguez-Sangrador M. Influence of diet and sun exposure in vitamin D nutritional status among adolescent and elderly women. OPTIFORD Study-European Union (Vitamin D fortification). Presented as Doctoral Thesis at Complutense University. 2006.
 59. Rodriguez-Sangrador M, Beltrán de Miguel B, Quintanilla Murillas L, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuny O. The contribution of diet and sun exposure to the nutritional status of vitamin D in elderly Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project). *Nutr Hosp* 2008; 23: 567-76.
 60. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339: b3692.
 61. Bischoff-Ferrari H, Shao A, Dawson-Hughes B, Hathcock J, Giovannucci E, Willett W. Benefit-risk assessment of vitamin D supplementation. *Osteoporos Int* 2009; 21: 1121-32.
 62. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, et al. Optimal Vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta-analysis. *Am J Prev Med* 2007; 32: 210-6.
 63. Roger B, Heike B-F, Walter W. Vitamin D and Health: perspectives from mice and man. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 974-9.
 64. Qato DM, Alexander GC, Conti RM, Johnson M, Schumm P, Lindau ST. Use of prescription and over-the-counter medications and dietary supplements among older adults in the United States. *JAMA* 2008; 300: 2867-78.
 65. Rossini M, Bianchi G, Di Munno O, Giannini S, Minisola S, Sinigaglia L, et al. Determinants of adherence to osteoporosis treatment in clinical practice. *Osteoporos Int* 2006; 17: 914-21.

*Gregorio Varela-Moreiras

Department of Pharmaceutical and Food Sciences
 Faculty of Pharmacy
 CEU San Pablo University
 ES-28668 Boadilla del Monte (Madrid), Spain
 Tel: +(0034) 913724726
 Fax: +(0034) 913510496
 Email: gvarela@ceu.es

Publicación 4
(En revisión)

Samaniego Vaesken, M.L., E. Alonso Aperte, and G. Varela-Moreiras, *Predicted contribution of folic acid voluntary fortification in Spain to children's dietary intakes, as assessed with new food folate composition data*. Food Chemistry, 2012. Submitted.

Title Page

[Click here to view linked References](#)

Predicted contribution of folic acid voluntary fortification in Spain to children's dietary intakes, as assessed with new food folate composition data

Samaniego-Vaesken, ML. *

Alonso-Aperte E.

& Varela-Moreiras G.

Department of Pharmaceutical and Food Sciences. Faculty of Pharmacy, CEU San Pablo University, Madrid, Spain.

* Corresponding author

Word count (exc. Figures/tables): 3000

* Request for reprints should be addressed to

Maria de Lourdes Samaniego-Vaesken

Department of Pharmaceutical and Food Sciences
Faculty of Pharmacy,
CEU San Pablo University, Madrid, Spain
Ctra. Boadilla del Monte Km: 5.300
28668 Boadilla del Monte (Madrid)
Tel. 91.372.47.00 (Ext: 4843)
e-mail: l.samaniego@ceu.es

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 **1. Introduction**

2

3 Folic acid (FA) is the synthetic form of a water soluble vitamin group also regarded as folates or
4 B₉. In the past decade it has gained great attention because of the finding that it can prevent
5 Neural tube Defects (NTDs) in a high proportion (Czeizel, Bártfai, & Bánhid, 2011), as well as
6 for other potential benefits on cardiovascular health (McCully, 2007) neurocognitive status
7 (Reynolds, 2006) and some types of cancer (Kim, 2006) (Alonso-Aperte, Gonzalez, Poo-Prieto,
8 & Varela-Moreiras, 2007) (G Varela-Moreiras, González, & Alonso-Aperte, 2005). Recently, the
9 European Food Safety Authority (EFSA, 2009) and a number of researchers worldwide have
10 focused on the risk-benefit analysis of inadequate intakes of folic acid (Dragsted, Renwick,
11 Verhagen, Flynn, & Tuijelaars, 2009; Verkerk, 2010). While some of the benefits of an optimal
12 folate status in humans are studied, it remains unknown to what extent a lifetime exposure to
13 high doses of FA can be detrimental. Most FA deleterious effects described in the literature are
14 observed with high doses of the synthetic form of the vitamin, some being potential or
15 unconfirmed; but what seems to be clear, is that vitamin requirements and status comprise
16 different issues depending on the population group we focus on (Lawrence et al., 2009; Smith,
17 Kim, & Refsum, 2008). Women at a fertile age are clearly a target population for optimal folate
18 intake and these needs were addressed by means of different policies in order to increase
19 their intakes. US and Canada were the first countries to adopt a mandatory fortification policy
20 for flours and cereal derivatives back in 1998 (IOM, 1998).

21

22 In Spain, as in the rest of Europe, only voluntary fortification of processed foods is taking place
23 at the moment (EFSA, 2009; Verkaik-Kloosterman, 2009). The Spanish market offers an
24 important number of FA voluntarily fortified products. In a previous work, we developed the
25 first database in Spain for commercialized FA fortified foods which include up to six food
26 groups from which *cereals and derivatives* were the main group (52% of total inventory foods,
27 (Samaniego-Vaesken, Alonso-Aperte, & Varela-Moreiras, 2009)). Adding vitamin overages
28 seems to be a common practice, as we observed in ready-to-eat breakfast cereals (RTEC) and
29 dairy products, when analyzed total folate was compared to declared values (Samaniego-
30 Vaesken, Alonso-Aperte, & Varela-Moreiras, 2010). Another important fortified food group
31 were *dairy products* (17%) which mainly comprised cow's milk and yogurt products
32 (Samaniego-Vaesken, et al., 2009).

33

34 Folate intakes from Spanish children are insufficient as found by the enKid Study, which was
35 conducted nationwide amongst a representative sample of children and adolescents aged 2-24
36 y (Serra-Majem, García-Closas, Ribas Barba, Pérez-Rodrigo, & Aranceta Bartrina, 2001). Serra-
37 Majem et al. also conducted a meta-analysis of available nutritional studies in Spanish children
38 and adolescents aged 4 to 18 y, and they describe a risk of inadequate intakes (defined as $\leq 2/3$
39 of folate RDI) specially in adolescent females (13-18 y, n=1,270)(Serra-Majem et al., 2001).
40 Insufficient folate intake was also observed in Spanish adults (G. Varela-Moreiras et al., 2010)
41 and the elderly (Milà Villarroel, Abellana Sangrà, & Farran Codina, 2009) whose intakes of
42 naturally rich sources of folates were not meeting recommendations.

43

44 There is an important number of voluntarily fortified products currently available in the
45 Spanish market and a great percentage of these are targeted at children by means of product
46 marketing and labeling, mainly RTEC and dairy products (milk, yogurt, etc.) (Samaniego-
47 Vaesken, et al., 2009). However, there is a lack of updated FA data of processed products in
48 food composition tables and databases (Bouckaert et al., 2010) given the difficulty of keeping
49 up to date with the ever growing market of processed products, and the fact that methods of
50 folate analysis comprise a great difficulty (Finglas et al., 2006). In a previous work we analyzed
51 a representative sample of FA fortified RTEC by trienzyme extraction and microbiological
52 assay; but data obtained by this methodology, while being one of the most widely used in food
53 total folate analysis (Arcot & Shrestha, 2005), seems also controversial in the literature, as a
54 number of researchers suggest the use of individual analysis of folate vitamers as a better
55 approach to assessing population folate intakes (Konings et al., 2001).

56

57 For all above stated, we aimed to further analyze a number of FA fortified food products,
58 including ready to eat breakfast cereals and milk products, by extracting, purifying and
59 quantifying their two main folate vitamers by HPLC, and assess their contribution to potential
60 FA intake in a vulnerable population group such as children aged 2 to 13 years.

61

62 **2. Materials and methods**

63

64 Basically, food products analysis methodology involved three key steps: trienzyme extraction
65 and deconjugation of folates from the FA fortified food matrix, their purification and
66 concentration by affinity chromatography and finally their analysis and quantification by HPLC,
67 as previously described in the literature (P. J. Bagley & Selhub, 2000; Martin, Landen, Soliman,
68 & Eitenmiller, 1990; Póo-Prieto et al., 2006). Added FA and 5-methyltetrahydrofolate (5-

69 MTHF), the main natural folate vitamer in our food samples, cereals (Póo-Prieto, et al., 2006)
70 and milk (Forssén, Jägerstad, Wigertz, & Witthöft, 2000), were quantified by HPLC coupled
71 with fluorescence and UV detection. Resulting data were used to calculate theoretical folate
72 and folic acid intakes, and then assessed by comparing them to their age-specific folate intake
73 recommendations in Spain (RDI) (Moreiras, Carvajal, Cabrera, & Cuadrado, 2008) but also vs.
74 Upper intake Limits (EC, 2000). Children food consumption data that accounted for intakes
75 (grams per day) of equivalent products of the analyzed fortified food products was obtained
76 from the enKid Study (Serra-Majem, García-Closas, et al., 2001).

77

78 **2.1. Chemicals and reagents**

79 **Folate standards.** Folic acid and 5-MTHF were obtained from Sigma (Spain) in analytical grade.
80 Standard stock solutions were prepared separately in 1% ascorbic acid, protected from light
81 and stored at -80 °C.

82 **Quality control.** Standard Reference Material 1846, a FA fortified milk-based infant formula
83 powder from NIST (National Institute of Standards and Technology) (Sharpless et al., 1997) was
84 used as a quality control throughout the assay.

85 **Folate binding protein (FBP).** Bovine milk FPB was isolated from a commercially available whey
86 protein concentrate by the method published by Bagley and Selhub (Pamela J. Bagley, Selhub,
87 & John W. Suttie, 1997). Affi-Gel 102 from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, US), was used
88 as a stationary phase for purification of FBP.

89 **Enzymes.** Rat plasma was used as folate conjugate source (Horne, Krumdieck, & Wagner, 1981)
90 and was obtained from Charles Rivier Laboratories (France); α -amylase from *Bacillus* sp.
91 (EC.3.2.1.1) and protease from *Streptomyces griseus* type XIV (EC.3.4.24.31) were acquired
92 from Sigma (Spain). All enzymes solutions were filtered in sterile conditions and stored at -20
93 °C. New enzyme batches were prepared on a weekly basis.

94 **Reagents.** Tris-HCl, sodium ascorbate, trifluoroacetic acid, 2-mercaptoethanol, piperazine,
95 potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, and concentrated phosphoric
96 acid ($\geq 85\%$ wt.) were purchased from Sigma (Spain) in analytical grade. Dithioeritritol was
97 obtained from Bio-Rad Labs. (Spain) and HPLC grade acetonitrile from Panreac (Spain).
98 Recovery from food folate extraction and purification processes, as well as FBP activity was
99 assessed by addition of [3', 5', 7, 9-³H] folic acid diamonium salt tracer (69 Ci/mmol), from
100 Movereck Biochemicals (Brea, CA, US).

101 **2.2. Food samples and storage**

102 Fortified food products were purchased at local supermarkets and retail stores from Madrid
103 Region, Spain, and consisted of pre-packaged ready-to-eat breakfast cereals (RTEC, n=68) from
104 different food matrixes (wheat, rice, oat, mixed) and toppings (dried fruit, nuts, chocolate);
105 and heat-sterilized cow milk (n=25) with different fat content (whole, semi-skimmed,
106 skimmed). Each sample was stored at room or refrigeration temperature until individual
107 processing (grinding and/or homogenizing) and finally flushed with nitrogen and frozen at -20
108 °C. Label data such as ingredients, nutritional values and a photography of the product was
109 recorded at our food composition database (Samaniego-Vaesken, et al., 2009).

110 **2.3. Folic acid and folate quantification in fortified ready-to-eat cereals and milk**

111 FA and 5-MTHF content in extracted and purified samples was separated and quantified by
112 HPLC with fluorescence and UV detection as described by Póo-Prieto et al. (Póo-Prieto, et al.,
113 2006).

114 **2.4. Estimation of folic acid and folate intake in a children population**

115 Folic acid fortified foods were categorized in four fortification levels. These were defined by
116 calculating the percentage of FA Recommended Daily Allowances (%RDA) ("Council Directive
117 90/496/EEC of 24 September 1990 on nutrition labelling for foodstuffs,") per serving (in grams
118 or milliliters) with the declared values on each product's label. Defined values for each were
119 set as follows: Level 1: ≤ 33 , Level 2: 33,1-51, Level 3 51,1-70 and Level 4: $\geq 70,1$ μg of
120 FA/serving.

121 Average and percentile values of consumption of the analyzed foods groups (RTEC and milk),
122 were obtained from published results of the enKid Study by Serra-Majem et al. (Aranceta
123 Bartrina & Serra-Majem, 2000). For the present study, selected population groups were boys
124 and girls aged 2 to 5, 6 to 9 and 10 to 13 years. Age-specific Folate Recommended Dietary
125 Intakes (RDI) for the Spanish population reviewed by Moreiras et al. (Moreiras, et al., 2008),
126 and folic acid tolerable Upper Intake Levels (ULs) published by the European Commission,
127 Health and Consumer protection Directorate (EC, 2000), were used as reference for
128 assessment of adequate or excessive vitamin intakes.

129 **3. Results and discussion**

130

131 **3.1. Folic acid and folate content in fortified products**

132

133 A total of 113 FA fortified food products from 18 different commercial brands were analyzed
134 and values were used for the calculation of potential intakes. **Table 1** shows a summary of the
135 results expressed as micrograms of FA and 5-MTHF per 100 grams or milliliters as well as
136 defined fortification levels found in each food category.

137
138 Contents of folic acid found in fortified RTEC are comparable to those of Rader et al. who
139 analyzed 28 different breakfast cereals in the USA back in 2000, few years after mandatory
140 fortification was implemented (Rader, Weaver, & Angyal, 2000). However, their data reflects
141 total folate values rather than FA only. In a previous study, we found overages (defined as
142 higher than declared values), analyzing RTEC by using microbiological assay (Samaniego-
143 Vaesken, et al., 2010), but our HPLC data shows lower FA values in some but not all cases (*data*
144 *not published*). This was also observed by Konings et al. for different food groups (Konings, et
145 al., 2001). On the other hand, Poó-Prieto et al. found a number of lower FA levels than those
146 declared in cereal products commercialized in the USA (Póo-Prieto, et al., 2006) using the same
147 methodology for extraction and quantification as in the present work.

148
149 Spanish researchers studied a number of FA fortified milk products using HPLC as
150 quantification method, and they found lower levels than ours, similar to the statements on the
151 products labels (Perez Prieto, Cancho Grande, Garcia Falcon, & Simal Gandara, 2006). A study
152 published by Johnston et al. using also the extraction method by Martin et al. (Martin, et al.,
153 1990) but with quantification of total folates by the microbiological assay (Johnston, Dirienzo,
154 & Tamura, 2002), found similar levels to ours for milk and derivatives.

155

156 **3.2. Estimation of folic acid and folate intake in the enKid Study population**

157

158 Effectiveness of nutritional policies such as a fortification program relies on adequately
159 reaching target population groups in order to meet their recommended intakes. In a recent
160 publication by Yeung et al., the authors studied the contributions of the three main sources of
161 folic acid in the USA: RTEC, supplements and mandatory fortification in children from the
162 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (Yeung et al., 2011). They found
163 that only children, who consumed FA supplements or a combination of the three sources,
164 could be potentially exposed to intakes above the ULs.

165

166 While the situation in Europe is quite different as we do not have mandatory fortification in
167 course (EFSA, 2009), the growing market of processed foods with added vitamins puts forward
168 a great interest on the potential contributions to both recommended or excessive intakes.

169

170 In **Figure 1** we present the results obtained when assessing the percentage of folate
171 Recommended Intakes (%RDI) according to children's RTEC intake and applying the highest
172 fortification level found in our analysis of 68 different samples of RTEC. For average RTEC
173 consumption levels, highest fortification level (Level 4) RTEC provided a range from 6 to 21% of
174 folate RDI, being boys aged 2 to 5 y the subgroup with the highest intake. When focusing on
175 highest percentile of consumption (P90) for RTEC, boys aged 6 to 9 y could have a potential
176 intake >60% of their folate RDI, while girls from the same age only reach 42%. In contrast, the
177 main natural folate vitamer (5-MTHF) levels found in analyzed RTEC products reached less than
178 1% of children's folate RDI.

179 Age-specific tolerable Upper Intake Level (ULs) was used as indicator of potential excessive
180 intakes when percentages were $\geq 100\%$. **Figure 2** shows that for RTEC consumption,
181 fortification Level 4 average intakes reached a maximum of 10% ULs for boys aged 2 to 5 y, and
182 when higher level of consumption (P90) is analyzed, boys aged 6 to 9 reach $\leq 31,6\%$ of ULs. In
183 this case only FA values were used as ULs apply only for the synthetic form of the vitamin and
184 not for natural folates (EC, 2000).

185 High level fortification milk (Level 4) provided on average 136% and 130% of RDI, for boys and
186 girls aged 2 to 5, respectively (**Figure 3**). At the higher level of milk consumption (P90) these
187 values reached 252% and 234% of RDI. As expected, children aged 2 to 5 y, were the only
188 subgroups to potentially exceed folic acid ULs by intake of fortified milk products (**Figure 4**);
189 obtained values were 26% and 17% above ULs, for boys and girls at the 90th percentile of
190 intake respectively.

191

192 Selected population-age groups were shown to have a high percentage of folate deficiency
193 related to their food habits, which are based on a low vegetable, legume and fruit diet
194 according to the authors of the enKid study (Serra-Majem, García-Closas, et al., 2001; Serra-
195 Majem, Ribas Barba, et al., 2001). Our results suggest that at current FA fortification levels
196 requirements can be achieved by the intake of a single fortified food product such as milk, as
197 can be observed in **Figure 3**, average intake for children 2 to 9 could be expected to provide
198 between 92% and 135% of the RDI.

199

200 Children's folic acid ULs are an extrapolation from adults values, based on body weight, as
 201 there is no evidence of deleterious effects available for this population group (IOM, 1998).
 202 Potential consequences of excessive intakes are, to date, unknown (Smith, 2010).
 203 Children's eating patterns are of great concern today, because not only they can lead
 204 to excess in other areas of nutritional balance (sugars, fats, sodium), but could also
 205 negatively affect the intake of natural folate sources (green vegetables, fruits,
 206 legumes).

207

208 4. Conclusion

209 Voluntary fortification of specific processed foods could be a useful strategy for improving folic
 210 acid intakes amongst Spanish children. Nonetheless, our results suggest that while some age
 211 groups could achieve optimal intakes through current FA fortification levels, younger children
 212 at higher consumption levels could be exposed to excessive FA intakes, especially with milk
 213 products. Concerns regarding unknown consequences of this, underline the importance of
 214 adequate target group identification and warrants further research in this field.

215 Acknowledgements

216 This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, Project entitled:
 217 *"Folic acid content and bioavailability in fortified foods in Spain. Impact on folate intake in*
 218 *population groups at risk and evaluation as potential functional foods"* (reference AGL2005-
 219 06957).

220

Table 1.

Analyzed food products: levels of folic acid fortification and 5-methyltetrahydrofolate ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ or ml).

	Fortification Level ^A ($\mu\text{g}/\text{serving}$)	N	Folic Acid ^B	5-MTHF ^C
Ready to eat breakfast cereals (RTEC)	1 (≤ 33)	11	69,4 \pm 14,6	5,8 \pm 4,4
	2 (33,1-51)	23	131,3 \pm 20,8	7,6 \pm 7,9
	3 (51,1-70)	19	181,7 \pm 23,8	6,4 \pm 3,8
	4 (≥ 70)	15	280,6 \pm 62,2	5,5 \pm 3,3
Cow milk	3 (51,1-70)	2	34,2 \pm 0,4	3,7 \pm 0,2
	4 (≥ 70)	23	53,9 \pm 22,6	7,8 \pm 2,4

^A Calculated as % of Recommended Daily Allowances per serving as stated on product's label. N: number of food products. 5-MTHF: 5-methyltetrahydrofolic acid. ^{B,C} Values expressed as average \pm standard deviation of two independent trienzyme extractions, purifications and HPLC analysis, per sample.

Figure(s)

Figure 1.

Contribution of ready-to-eat breakfast cereals with high level of folic acid fortification (Level 4) of folic acid fortification to Folate Recommended Dietary Intakes (RDI) based on the enKid Study [3] food consumption data.

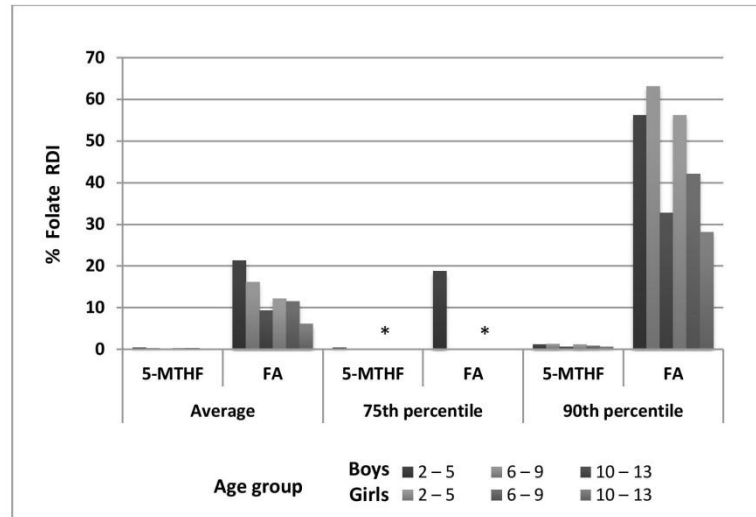


Figure 2.

Assessment of ready-to-eat breakfast cereals with high level of folic acid fortification (Level 4) of folic acid fortification to Folic Acid tolerable Upper Intake Levels (ULs) based on the enKid Study [3] food consumption data.

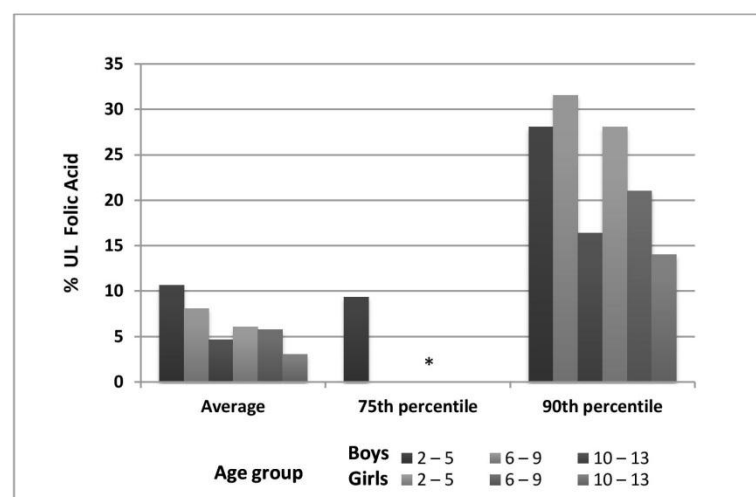


Figure 3.

Contribution of cow milk with high level of folic acid fortification (Level 4) of folic acid fortification to folate Recommended Dietary Intakes (RDI) based on the enKid Study [3] food consumption data.

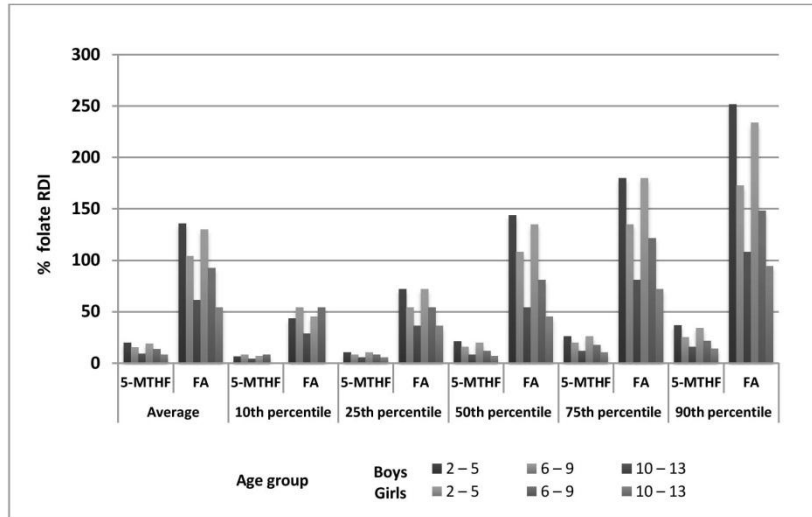
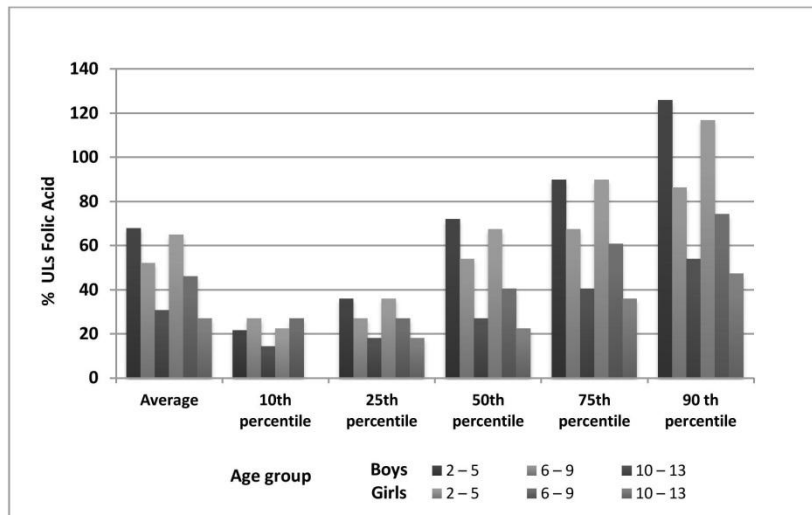


Figure 4.

Assessment of cow's milk with Level 4 of folic acid fortification to Folic Acid tolerable Upper Intake Levels (ULs) based on the enKid Study [3] food consumption data.



221 **References**

- 222 Alonso-Aperte, E., Gonzalez, M. P., Poo-Prieto, R., & Varela-Moreiras, G. (2007). Folate status
223 and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in colorectal
224 adenocarcinoma in humans. *Eur J Clin Nutr*, 62(2), 295-298.
- 225 Aranceta Bartrina, J., & Serra-Majem, L. (2000). Hábitos alimentarios y consumo de alimentos
226 en la población infantil y juvenil española (1998-2000) *Estudio enKid*. Barcelona:
227 Masson.
- 228 Arcot, J., & Shrestha, A. (2005). Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science &*
229 *Technology*, 16(6-7), 253-266.
- 230 Bagley, P. J., & Selhub, J. (2000). Analysis of folate form distribution by affinity followed by
231 reversed-phase chromatography with electrochemical detection. *Clinical Chemistry*,
232 46(3), 404-411.
- 233 Bagley, P. J., Selhub, J., & John W. Suttie, C. W. a. D. B. M. (1997). Analysis of folates using
234 combined affinity and ion-pair chromatography *Methods in Enzymology* (Vol. Volume
235 281, pp. 16-25): Academic Press.
- 236 Bouckaert, K., Slimani, N., Nicolas, G., Vignat, J., Wright, A., Roe, M., . . . Finglas, P. (2010).
237 Critical evaluation of folate data in European and international databases:
238 Recommendations for standardization in international nutritional studies. *Mol Nutr*
239 *Food Res*, 55, 166-180.
- 240 Council Directive 90/496/EEC of 24 September 1990 on nutrition labelling for foodstuffs. (*OJ*
241 *L276*, p40, 06/10/1990). Available at: [http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0496:EN:HTML)
242 [lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0496:EN:HTML](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0496:EN:HTML) (Accessed on
243 may 2010).
- 244 Czeizel, A. E., Bártfai, Z., & Bánhidy, F. (2011). Primary prevention of neural-tube defects and
245 some other congenital abnormalities by folic acid and multivitamins: history, missed
246 opportunity and tasks. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 2(4), 173-188. doi:
247 10.1177/2042098611411358
- 248 Dragsted, L., Renwick, A., Verhagen, H., Flynn, A., & Tuijtelars, S. (2009). *New horizons for the*
249 *safe addition of micronutrients to food*. Summary Report of a workshop held in
250 September 2005 in Bologna, Italy, organized by the ILSI Europe addition of Nutrients to
251 Food Task Force. ILSI Europe.
- 252 EC. (2000). European Commission, Health & Consumer protection Directorate. Opinion of the
253 Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Folate. Disponible
254 en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80e_en.pdf . (Accessed on june 2009).
- 255 EFSA. (2009). ESCO Report: Prepared by the EFSA Scientific Cooperation Working Group on
256 Analysis of Risks and Benefits of Fortification of Food with Folic Acid. Available at:
257 <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/3e.htm>. (Accessed on may 2010).
- 258 Finglas, P. M., de Meer, K., Molloy, A., Verhoef, P., Pietrzik, K., Powers, H. J., . . . Wright, A. J. A.
259 (2006). Research goals for folate and related B vitamin in Europe. *Eur J Clin Nutr*, 60(2),
260 287-294.

- 261 Forssén, K. M., Jägerstad, M. I., Wigertz, K., & Witthöft, C. M. (2000). Folates and dairy
262 products: A critical update. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(2), 100S-
263 110S.
- 264 Horne, D. W., Krumdieck, C. L., & Wagner, C. (1981). Properties of folic acid gamma-glutamyl
265 hydrolase (conjugase) in rat bile and plasma. *J Nutr*, 111(3), 442-449.
- 266 IOM. (1998). *Panel on Folate, other B vitamins and Choline. Dietary Reference Intakes for*
267 *thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin,*
268 *and choline. National Academy of Sciences. Institute of Medicine. Food and Nutrition*
269 *Board. Washington D.C.: National Academy Press.*
- 270 Johnston, K. E., Dirienzo, D. B., & Tamura, T. (2002). Folate Content of Dairy Products
271 Measured by Microbiological Assay with Trienzyme Treatment. *Journal of Food*
272 *Science*, 67(2), 817-820. doi: doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb10683.x
- 273 Kim, Y. I. (2006). Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer
274 prevention? *Gut*, 55(10), 1387-1389. doi: 10.1136/gut.2006.095463
- 275 Konings, E. J. M., Roomans, H. H. S., Dorant, E., Goldbohm, R. A., Saris, W. H. M., & van den
276 Brandt, P. A. (2001). Folate intake of the Dutch population according to newly
277 established liquid chromatography data for foods. *Am J Clin Nutr*, 73(4), 765-776.
- 278 Lawrence, M. A., Weizhong, C., Rajja, K., Irwin, H. R., John, S., & Alison, T. (2009). Examination
279 of selected national policies towards mandatory folic acid fortification. *Nutrition*
280 *Reviews*, 67(s1), S73-S78.
- 281 Martin, J. I., Landen, W. O., Soliman, A. M., & Eitenmiller, R. R. (1990). Application of a tri-
282 enzyme extraction for total folate determination in foods. *Journal of the Association of*
283 *Analytical Chemists*, 73(5), 805-808.
- 284 McCully, K. S. (2007). Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr*,
285 86(5), 1563S-1568.
- 286 Milà Villarroel, R., Abellana Sangrà, R., & Farran Codina, A. (2009). Valoración nutricional de los
287 menús en cinco residencias geriátricas y su adecuación a las ingestas recomendadas
288 para la población anciana. *Actividad Dietética*, 13(2), 51-58.
- 289 Moreiras, O., Carvajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2008). Ingestas Recomendadas de
290 energía y nutrientes para la población española (revisadas y ampliadas 2006).
291 Departamento de Nutrición. Universidad Complutense de Madrid. *Tablas de*
292 *Composición de los Alimentos* (12ª ed., pp. 228-229): Pirámide.
- 293 Perez Prieto, S., Cancho Grande, B., Garcia Falcon, S., & Simal Gandara, J. (2006). Screening for
294 folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food Control*, 17(11), 900-904.
- 295 Póo-Prieto, R., Haytowitz, D. B., Holden, J. M., Rogers, G., Choumenkovitch, S. F., Jacques, P. F.,
296 & Selhub, J. (2006). Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of
297 folic acid in enriched cereal-grain products. *Journal of Nutrition*, 136(12), 3079-3083.
- 298 Rader, J. I., Weaver, C. M., & Angyal, G. (2000). Total folate in enriched cereal-grain products in
299 the United States following fortification. *Food Chemistry*, 70(3), 275-289.

- 300 Reynolds, E. (2006). Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology*,
301 5(11), 949-960.
- 302 Samaniego-Vaesken, M. L., Alonso-Aperte, E., & Varela-Moreiras, G. (2009). Folic acid fortified
303 foods available in Spain: type of products, level of fortification and target population
304 groups. *Nutricion Hospitalaria*, 24(4), 459-466.
- 305 Samaniego-Vaesken, M. L., Alonso-Aperte, E., & Varela-Moreiras, G. (2010). Analysis and
306 evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish
307 market. *Journal of Food Composition and analysis*, 23(5), 419-423.
- 308 Serra-Majem, L., García-Closas, R., Ribas Barba, L., Pérez-Rodrigo, C., & Aranceta Bartrina, J.
309 (2001). Food patterns of Spanish schoolchildren and adolescents: The enKid Study.
310 *Public Health Nutrition*, 4, 1433-1438
- 311 Serra-Majem, L., Ribas Barba, L., Ngo, J., Pérez Rodrigo, C., Quemada, M., Tojo, R., & Vázquez,
312 C.-. (2001). Risk of inadequate intakes of vitamins A, B1, B6, C, E, Folate, Iron and
313 Calcium in the Spanish population aged 4 to 18. *Int J Vitam Nutr Res*, 71(6), 325-331.
- 314 Sharpless, K., Schiller, S., Margolis, S., Thomas, J., Iyengar, G., Colbert, J., . . . Wolf, W. (1997).
315 Certification of nutrients in standard reference material 1846: infant formula. *Journal*
316 *of AOAC International*, 80, 611-621.
- 317 Smith, A. D. (2010). Folic acid nutrition: what about the little children? *Am J Clin Nutr*, 91(5),
318 1408-1409.
- 319 Smith, A. D., Kim, Y.-I., & Refsum, H. (2008). Is folic acid good for everyone? *American Journal*
320 *of Clinical Nutrition*, 87(3), 517-533.
- 321 Varela-Moreiras, G., Avila, J. M., Cuadrado, C., del Pozo, S., Ruiz, E., & Moreiras, O. (2010).
322 Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food
323 Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr*, 64(S3), S37-S43.
- 324 Varela-Moreiras, G., González, M. P., & Alonso-Aperte, E. (2005). Impaired methionine and
325 folate metabolism in colorectal carcinogenesis. *Trends in Food Science & Technology*,
326 16(6-7), 282-288.
- 327 Verkaik-Kloosterman, J. (2009). Evaluation of the Dutch legislation on food fortification with
328 folic acid and vitamin D; focus on young children: National Institute for Public Health
329 and the Environment (RIVM).
- 330 Verkerk, R. H. J. (2010). The paradox of overlapping micronutrient risks and benefits obligates
331 risk/benefit analysis. *Toxicology*, 278(1), 27-38.
- 332 Yeung, L. F., Cogswell, M. E., Carriquiry, A. L., Bailey, L. B., Pfeiffer, C. M., & Berry, R. J. (2011).
333 Contributions of enriched cereal-grain products, ready-to-eat cereals, and
334 supplements to folic acid and vitamin B-12 usual intake and folate and vitamin B-12
335 status in US children: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES),
336 2003-2006. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 172-185.
- 337
- 338

- 6.** Título: *“Predicted contribution of folic acid voluntary fortification in Spain to children’s dietary intakes, as assessed with new food folate composition data”*.
Autores: Samaniego Vaesken L, Alonso-Alerte E, Varela-Moreiras G.
Tipo de participación: Póster
Congreso: 9th International Food Data Conference. “Food composition and sustainable diets”
Lugar celebración: Norwich, Reino Unido Fecha: Septiembre de 2011

- 7.** Título: *“Folic acid, 5-methyltetrahydrofolate and total folate content in Spanish fortified products: a comparison of methods”*.
Autores: Samaniego Vaesken L, Alonso-Alerte E, Varela-Moreiras G.
Tipo de participación: Póster
Congreso: 2nd International Vitamin Conference
Lugar celebración: Copenhague, Fecha: Mayo de 2012
Dinamarca

IX. BIBLIOGRAFIA

1. *Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos* DOCE num. L 404 de 30 de diciembre de 2006.
2. Aranceta Bartrina, J. and L. Serra-Majem, *Hábitos alimentarios y consumo de alimentos en la población infantil y juvenil española (1998-2000)*, in *Estudio enKid2000*, Masson: Barcelona.
3. Ruiz Moreno, E., et al., *Encuesta de Nutrición de la Comunidad de Madrid, ENUCAM 2009. En prensa* 2011.
4. Carpenter, K.J., *A Short History of Nutritional Science: Part 3 (1912–1944)*. *The Journal of Nutrition*, 2003. **133**(10): p. 3023-3032.
5. Czeizel, A.E. and I. Dudas, *Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation*. *New England Journal of Medicine*, 1992. **327**(26): p. 1832-1835.
6. *CDC Grand Rounds: Additional Opportunities to Prevent Neural Tube Defects with Folic Acid Fortification*, in *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 2010, Centers for disease control and prevention. p. 980-984.
7. Dragsted, L., et al., *New horizons for the safe addition of micronutrients to food*, 2009, ILSI Europe.
8. EFSA, *ESCO Report: Prepared by the EFSA Scientific Cooperation Working Group on Analysis of Risks and Benefits of Fortification of Food with Folic Acid*. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/3e.htm>. (Último acceso: mayo 2010), 2009.
9. Varela-Moreiras, G., et al., *Evaluación del consumo de alimentos enriquecidos/fortificados en España a través del Panel de Consumo Alimentario, 2011*, Fundación Española de la Nutrición (FEN), Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM).
10. Mayer, C., et al., *Informed Systematic Review and Critical Comparison of Analytical Methods for the Quantification of Blood Folate Status in the Population*, 2009, Food Standards Agency - Open Access "FoodBase" http://www.foodbase.org.uk/results.php?f_report_id=336. (Último acceso: junio 2009).
11. AOAC, *Association of Official Analytical Chemists. Folic acid (pteroyl-monoglutamic acid) in infant formula, microbiological methods.*, in *Official methods of analysis2000*: Gaithersburg, MD, EEUU. p. Sec 992.05, Cáp. 50.1.21.
12. Samaniego Vaesken, M.L., *Contenido en folatos de los alimentos. Valoración de la fortificación voluntaria con ácido fólico en España*, in *Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación2007*, Universidad San Pablo CEU. Facultad de Farmacia: Madrid.
13. Rosenfeld, L., *Vitamine—vitamin. The early years of discovery*. *Clin Chem*, 1997. **43**(4): p. 680-685.

14. Backstrand, J.R., *The history and future of food fortification in the United States: A public health perspective*. Nutrition Reviews, 2002. **60**(1): p. 15-26.
15. Dary, O. and J.O. Mora, *Food Fortification to Reduce Vitamin A Deficiency: International Vitamin A Consultative Group Recommendations*. The Journal of Nutrition, 2002. **132**(9): p. 2927S-2933S.
16. Markel, H., "When it rains it pours": endemic goiter, iodized salt, and David Murray Cowie, MD. Am J Public Health, 1987. **77**(2): p. 219-229.
17. Rajakumar, K., et al., *Solar ultraviolet radiation and Vitamin D: A Historical Perspective*. Am J Public Health, 2007. **97**(10): p. 1746-1754.
18. Park, Y., et al., *Effectiveness of food fortification in the United States: the case of pellagra*. Am J Public Health, 2000. **90**(5): p. 727-738.
19. IOM, *Panel on Folate, other B vitamins and Choline. Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. National Academy of Sciences. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board*1998, Washington D.C.: National Academy Press.
20. Whittaker, P., P.R. Tufaro, and J.I. Rader, *Iron and folate in fortified cereals*. Journal of the American College of Nutrition, 2001. **20**(3): p. 247-254.
21. MRC, *Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study*. Lancet, 1991. **338**: p. 131-137.
22. Allen, L., et al., *Guidelines on food fortification with micronutrients*, 2006, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
23. Moreiras, O., et al., *Ingestas Recomendadas de energía y nutrientes para la población española (revisadas y ampliadas 2006)*. Departamento de Nutrición. Universidad Complutense de Madrid., in *Tablas de Composición de los Alimentos*2008, Pirámide. p. 228-229.
24. ILSI, *Addition of Nutrients to food: nutritional and safety considerations. Moving towards a scientific consensus*, in *ILSI Europe Report Series*1998.
25. Varela-Moreiras, G., J.M. Escudero, and E. Alonso-Aperte, *Homocisteína, vitaminas relacionadas y estilos de vida en personas de edad avanzada: estudio SÉNECA*. Nutricion Hospitalaria, 2007. **22**(3): p. 363-70.
26. Serra-Majem, L., et al., *Dietary patterns and nutritional adequacy in a Mediterranean country*. British Journal of Nutrition, 2009. **101**(SupplementS2): p. S21-S28.
27. Varela-Moreiras, G., et al., *Valoración de la Dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario*2008: Fundación Española de la Nutrición (FEN), Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) 2006.
28. Varela-Moreiras, G., et al., *Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food Consumption Survey: updated information*. Eur J Clin Nutr, 2010. **64**(S3): p. S37-S43.

29. Elmadfa, I. and H. Freisling, *Nutritional status in Europe: methods and results*. Nutrition Reviews, 2009. **67**(s1): p. S130-S134.
30. Maberly, G., L. Grummer-Strawn, and M. Jefferds, *Trends in Wheat-Flour Fortification with Folic Acid and Iron - Worldwide, 2004 and 2007*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2008. **57**(1): p. 8-10.
31. Pfeiffer, C.M., et al., *Trends in Circulating Concentrations of Total Homocysteine among US Adolescents and Adults: Findings from the 1991-1994 and 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys*. Clin Chem, 2008: p. 2007.100214.
32. Hirsch, S., et al., *Colon cancer in Chile before and after the start of the flour fortification program with folic acid*. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2009. **21**(4): p. 436-439 10.1097/MEG.0b013e328306ccdb.
33. Duthie, S.J., *Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis*. J Inherit Metab Dis, 2010.
34. Howlett, J., *Functional Foods - From Science to Health and Claims*, in *ILSI Europe Concise Monograph Series 2008:1-1-36*, ILSI, Editor 2008.
35. Wheat Flour Fortification Status - May 2012. Map of Global Progress. Countries With Mandatory Wheat Flour Fortification Regulations. Disponible en: <http://www.sph.emory.edu/wheatflour/globalmap.php> . (Último acceso: mayo 2012).
36. Buttriss, J., *Strategies designed to increase awareness about folates and health, and to increase folate intake: A review*. Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(6-7): p. 246-252.
37. Lawrence, M.A., et al., *Examination of selected national policies towards mandatory folic acid fortification*. Nutrition Reviews, 2009. **67**(s1): p. S73-S78.
38. Varela-Moreiras, G., et al., *Valoración Nutricional de la Dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) 2008*, 2008.
39. Bailey, R.L., et al., *Total folate and folic acid intake from foods and dietary supplements in the United States: 2003-2006*. Am J Clin Nutr, 2010(1): p. 231-237.
40. Brough, L., et al., *Social and ethnic differences in folic acid use preconception and during early pregnancy in the UK: effect on maternal folate status*. J Hum Nutr Diet, 2009.
41. FSAI, *Food Safety Authority of Ireland. Report of the Implementation Group on Folic Acid Food Fortification to the Department of Health and Children*. Disponible en www.fsai.ie/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=7602. (Último acceso: julio 2010), 2008.
42. SACN, *Folate and disease prevention. Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN)*. 2006. Food Standards Agency. Department of Health. London TSO, United Kingdom. Disponible en: http://www.sacn.gov.uk/pdfs/folate_and_disease_prevention_report.pdf. (Último acceso: julio 2010).

43. EC, *European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General. Discussion Paper on the setting of maximum and minimum amounts for vitamins and minerals in foodstuffs*, 2006.
44. Öhrvik, V.E., et al., *Effect of 2 pieces of nutritional advice on folate status in Swedish women: a randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2009: p. ajcn.2008.27192.
45. Hung, J., et al., *Additional food folate derived exclusively from natural sources improves folate status in young women with the MTHFR 677 CC or TT genotype*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2006. **17**(11): p. 728-734.
46. Cucó, G., et al., *Food group and macronutrient intake behavior in a Spanish Mediterranean population*. Nutrition Research, 2003. **23**(7): p. 857-868.
47. Gregory III, J.F., E.P. Quinlivan, and S.R. Davis, *Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification*. Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(6-7): p. 229-240.
48. Caudill, M.A., *Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status*. Am J Clin Nutr, 2010: p. ajcn.2010.28674E.
49. Czeizel, A.E., et al., *Possible association of folic acid supplementation during pregnancy with reduction of preterm birth: a population-based study*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2010. **148**(2): p. 135-140.
50. Wills, J.M., et al., *Exploring global consumer attitudes toward nutrition information on food labels*. Nutrition Reviews, 2009. **67**(s1): p. S102-S106.
51. Samaniego-Vaesken, M.L., G. Varela-Moreiras, and E. Alonso Aperte, *Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos*. Nutricion Hospitalaria, 2009. **24**(4): p. 459-466.
52. Sweeney, M., J. McPartlin, and J. Scott, *Folic acid fortification and public health: Report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum*. BMC Public Health, 2007. **7**(1): p. 41.
53. Hoey, L., et al., *Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamin status, and homocysteine in healthy adults*. American Journal of Clinical Nutrition, 2007. **86**(5): p. 1405-1413.
54. Dietrich, M., C.J.P. Brown, and G. Block, *The Effect of Folate Fortification of Cereal-Grain Products on Blood Folate Status, Dietary Folate Intake, and Dietary Folate Sources among Adult Non-Supplement Users in the United States*. J Am Coll Nutr, 2005. **24**(4): p. 266-274.
55. Kalmbach, R.D., et al., *Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification*. American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **88**(3): p. 763-768.
56. Bailey, R.L., et al., *Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged >=60 y in the United States*. Am J Clin Nutr, 2010: p. ajcn.2010.29499.

57. Bailey, R.L., et al., *Total folate and folic acid intakes from foods and dietary supplements of US children aged 1-13 y.* Am J Clin Nutr, 2010: p. ajcn.2010.29652.
58. FSANZ, *Mandatory Fortification with folic acid in Australia.* Disponible en: http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/Standard_2_1_1_Cereals_v114.pdf (Último acceso: febrero 2011). 2009.
59. Finglas, P.M., et al., *Research goals for folate and related B vitamin in Europe.* Eur J Clin Nutr, 2006. **60**(2): p. 287-294.
60. *Reglamento (CE) 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. DOUE num 404/26 de 30 de diciembre de 2006.*
61. EFSA, *Folic acid: an update on scientific developments. Meeting summary report*, 2009, European Food Safety Authority: Uppsala.
62. Verkaik-Kloosterman, J., *Evaluation of the Dutch legislation on food fortification with folic acid and vitamin D; focus on young children*, 2009, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM).
63. David, L. J., *Fortificación de harina de trigo en América Latina y región del Caribe.* Revista chilena de nutrición, 2004. **31**: p. 336-347.
64. FSAI, *Food Safety Authority of Ireland. Report of the National Committee on folic acid food fortification.* Disponible en http://www.fsai.ie/uploadedFiles/folic_acid.pdf. (Último acceso: julio 2010), 2006.
65. Tedstone, A., et al., *Fortification of selected foodstuffs with folic acid in the UK: consumer research carried out to inform policy recommendations.* J Public Health, 2008. **30**(1): p. 23-29.
66. Wills, L., *Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia" with special reference to yeast extract as a curative agent.* Nutrition, 1931. **7**(5)(5): p. 323-327.
67. Jukes, T. and E. Stockstad, *Pteroylglutamic acid and related compounds.* Physiol. Rev., 1948. **28**: p. 51-106.
68. Campbell, C., R. Brown, and A. Emmett, *Influence of crystalline Bc on hematopoiesis in the chick.* journal of Biological Chemistry, 1944. **152**: p. 483-484.
69. Stockstad, E., *Early work with folic acid.* Fed. Proc., 1979. **38**(2696-2698).
70. Vilter, R.W., et al., *Studies on the relationships of vitamin B12, folic acid, thymine, uracil, and methyl group donors in persons with pernicious anaemia and related megaloblastic anaemias.* Blood, 1950. **5**: p. 695 - 717.
71. McCully, K.S., *Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention.* Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1563S-1568.
72. Jacques, P.F., et al., *The Effect of Folic Acid Fortification on Plasma Folate and Total Homocysteine Concentrations.* N Engl J Med, 1999. **340**(19): p. 1449-1454.

73. Morris, M.S., et al., *Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification*. American Journal of Clinical Nutrition, 2007. **85**(1): p. 193-200.
74. Gregory III, J., *Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, method of analysis, stability, and bioavailability of dietary folates*. Advances in Food Nutrition Research, 1989. **33**: p. 1-101.
75. Blakley, R., *The biochemistry of folic acid and related pteridines* 1969, Amsterdam: North-Holland Publishing.
76. Varela-Moreiras, G., E. Seyoum, and J. Selhub, *Combined affinity and ion pair liquid chromatographies for the analysis of folate distribution in tissues*. J Nutr Biochem, 1991. **2**: p. 44-53.
77. Kariluoto, M.S., *Folates in rye: Determination and enhancement by food processing*, in *Department of Applied Chemistry and Microbiology* 2008, University of Helsinki: Helsinki.
78. EC, *European Commission, Health & Consumer protection Directorate. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Folate*. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80e_en.pdf . (Último acceso: junio 2009). 2000.
79. Arcot, J. and A. Shrestha, *Folate: methods of analysis*. Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(6-7): p. 253-266.
80. Halsted, C., *Intestinal absorption of dietary folates*, in *Folic acid metabolism in health and disease*, M. Picciano, Stockstad, ELR, Gregory III J F, Editor 1990, Willey-Liss: New York. p. 23-45.
81. Wright, A.J.A., J.R. Dainty, and P.M. Finglas, *Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK*. British Journal of Nutrition, 2007. **98**: p. 667-675.
82. Bailey, L.B. and J.F. Gregory III, *Folate Metabolism and Requirements*. Journal of Nutrition, 1999. **129**: p. 779-782.
83. Bailey, S.W. and J.E. Ayling, *The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009: p. -.
84. *U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2009. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22. Nutrient Data Laboratory Home Page, disponible en <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. (Último acceso: julio 2010).*
85. Quinlivan, E.P. and J.F. Gregory, III, *Reassessing folic acid consumption patterns in the United States (1999-2004): potential effect on neural tube defects and overexposure to folate*. American Journal of Clinical Nutrition, 2007. **86**(6): p. 1773-1779.
86. Wright, A.J.A., et al., *Comparison of (6S)-5-methyltetrahydrofolic acid v. folic acid as the reference folate in longer-term human dietary intervention studies assessing the relative bioavailability of natural food folates: comparative changes in folate status*

- following a 16-week placebo-controlled study in healthy adults.* British Journal of Nutrition, 2010. **103**: p. 724-729.
87. Ohrvik, V.E., et al., *Folate bioavailability from breads and a meal assessed with a human stable-isotope area under the curve and ileostomy model.* Am J Clin Nutr, 2010: p. ajcn.2009.29031.
 88. Bouckaert, K., et al., *Critical evaluation of folate data in European and international databases: Recommendations for standardization in international nutritional studies.* Mol Nutr Food Res, 2010. **55**: p. 166-180.
 89. AESAN/BEDCA, *Base de Datos Española de Composición de Alimentos v1.0. 2010.* Disponible en: <http://www.bedca.net/bdpub/index.php> (Último acceso: enero 2011).
 90. United States Department of Agriculture, A.R.S., *USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19: Composition of foods, raw, processed, prepared. Nutrient Data Laboratory Home Page,* disponible en: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. (Último acceso: Noviembre de 2006).
 91. Moreiras, O., et al., *Tablas de Composición de Alimentos 12.ª ed2008,* Madrid: Pirámide.
 92. Hjortmo, S., et al., *Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process.* International Journal of Food Microbiology, 2008. **127**(1-2): p. 32-36.
 93. Greenfield, H. and D.A.T. Southgate, *Food composition data. Production, management and use.* Second ed2003: FAO publishing management service.
 94. Harris, R.S. and E. Karmas, *Nutritional evaluation of food processing.* 2nd ed1975, Wesport: AVI Publishers.
 95. Priestley, R.J., *Vitamins,* in *Effects of heating on foodstuffs*1979, Applied Science publishers: London. p. 121-156.
 96. McKillop, D.J., et al., *The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet.* British Journal of Nutrition, 2002. **88**: p. 681-688.
 97. Hawkes, J.G. and R. Villota, *Folates in Foods - Reactivity, Stability During Processing, and Nutritional Implications.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1989. **28**(6): p. 439-538.
 98. Gregory III, J.F., *Do available food composition data for folate meet current research needs?*, in *22nd National Nutrient Data Bank Conference Proceedings*1998: San Francisco, USA.
 99. Konings, E.J.M., et al., *Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods.* Am J Clin Nutr, 2001. **73**(4): p. 765-776.
 100. O'Broin, S. and B. Kelleher, *Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells.* Journal of Clinical Pathology, 1992. **45**: p. 344-347.

101. Póo-Prieto, R., et al., *Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products*. Journal of Nutrition, 2006. **136**(12): p. 3079-3083.
102. Perez Prieto, S., et al., *Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages*. Food Control, 2006. **17**(11): p. 900-904.
103. Olivares, A.B., et al., *Quality of data on folic acid content in vegetables included in several Spanish food composition tables and new data on their folate content*. Nutricion Hospitalaria, 2006. **21**(1): p. 97-108.
104. Martin, J.I., et al., *Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods*. Journal of the Association of Analytical Chemists, 1990. **73**(5): p. 805-808.
105. Johnston, K.E., D.B. Dirienzo, and T. Tamura, *Folate Content of Dairy Products Measured by Microbiological Assay with Trienzyme Treatment*. Journal of Food Science, 2002. **67**(2): p. 817-820.
106. Hefni, M., et al., *Folate content in foods commonly consumed in Egypt*. Food Chemistry, 2010. **In Press, Corrected Proof**.
107. Alaburda, J., et al., *Determination of folic acid in fortified wheat flours*. Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **21**(4): p. 336-342.
108. Samaniego-Vaesken, M.L., E. Alonso-Apperte, and G. Varela-Moreiras, *Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market*. Journal of Food Composition and analysis, 2010. **23**(5): p. 419-423.
109. Arcot, J., A.K. Shrestha, and U. Gusanov, *Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions*. Food Control, 2002. **13**(4-5): p. 245-252.
110. Iniesta, M.D., et al., *Folate Content in Tomato (Lycopersicon esculentum). Influence of Cultivar, Ripeness, Year of Harvest, and Pasteurization and Storage Temperatures*. J Agric Food Chem, 2009.
111. Patring, J., et al., *Folate content of Norwegian and Swedish flours and bread analysed by use of liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Food Composition and Analysis, 2009. **22**(7-8): p. 649-656.
112. Reynolds, E., *Vitamin B12, folic acid, and the nervous system*. The Lancet Neurology, 2006. **5**(11): p. 949-960.
113. Ganji, V. and M.R. Kafai, *Hemoglobin and hematocrit values are higher and prevalence of anemia is lower in the post-folic acid fortification period than in the pre-folic acid fortification period in US adults*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(1): p. 363-371.
114. Tamura, T. and M.F. Picciano, *Folate and human reproduction*. American Journal Of Clinical Nutrition, 2006. **83**(5): p. 993-1016.
115. Daly, L.E., et al., *Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention*. JAMA, 1995. **274**(21): p. 1698-1702.

116. European Commission, Health & Consumer protection Directorate C. *Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Folate*. October 2000 http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html. Accedido: 22 de enero de 2007. [cited 2007].
117. WHO, *The Global Burden of Disease: 2004 update*. Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf (Último acceso: junio de 2010), 2004.
118. Selhub, J., et al., *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population*. JAMA, 1993. **270**(22): p. 2693-2698.
119. Rader, J.I., *Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine*. Journal of Nutrition, 2002. **132**(8): p. 2466S-2470.
120. Morrison, H.I., et al., *Serum folate and risk of fatal coronary heart disease*. JAMA, 1996. **275**(24): p. 1893-1896.
121. Selhub, J., *The Many Facets of Hyperhomocysteinemia: Studies from the Framingham Cohorts*. J. Nutr., 2006. **136**(6): p. 1726S-1730.
122. *Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials*. Homocysteine Lowering Trialists's Collaboration. BMJ, 1998. **316**(7135): p. 894-898.
123. Bazzano, L.A., et al., *Effect of Folic Acid Supplementation on Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials*. JAMA, 2006. **296**(22): p. 2720-2726.
124. Miller Iii, E.R., et al., *Meta-Analysis of Folic Acid Supplementation Trials on Risk of Cardiovascular Disease and Risk Interaction With Baseline Homocysteine Levels*. The American Journal of Cardiology, 2010. **106**(4): p. 517-527.
125. Bailey, L.B., *Do low doses of folic acid result in maximum lowering of homocysteine?* Am J Clin Nutr, 2005. **82**(4): p. 717-718.
126. Kim, Y.I., *Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention?* Gut, 2006. **55**(10): p. 1387-1389.
127. Bills, N.D., et al., *Delayed Tumor Onset in Transgenic Mice Fed a Low-Folate Diet*. Journal of the National Cancer Institute, 1992. **84**(5): p. 332-337.
128. Smith, A.D., Y.-I. Kim, and H. Refsum, *Is folic acid good for everyone?* American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **87**(3): p. 517-533.
129. Alonso-Aperte, E., et al., *Folate status and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in colorectal adenocarcinoma in humans*. Eur J Clin Nutr, 2007. **62**(2): p. 295-298.
130. Kim, Y.I., *Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review*. Molecular Nutrition & Food Research, 2007. **51**(3): p. 267-292.

131. Varela-Moreiras, G., M.P. González, and E. Alonso-Aperte, *Impaired methionine and folate metabolism in colorectal carcinogenesis*. Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(6-7): p. 282-288.
132. SACN, *Summary of Report to Chief Medical Officer on folic acid and colorectal cancer risk*, 2009, Scientific Advisory Committee on Nutrition.
133. *World Cancer Report. 2008*. Disponible en: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf. (Último acceso: enero 2011), World Health Organization. International Agency for Research on Cancer
134. Bazzano, L.A., *Folic Acid Supplementation and Cardiovascular Disease: The State of the Art*. The American Journal of the Medical Sciences, 2009. **338**(1): p. 48-49.
135. Reynolds, E.H., *Folic acid, ageing, depression, and dementia*. BMJ, 2002. **324**(7352): p. 1512-1515.
136. Kim, J.-M., et al., *Predictive value of folate, vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression*. The British Journal of Psychiatry, 2008. **192**(4): p. 268-274.
137. *Food and Nutrition Board, IOM., National Academies, National Academy of Sciences. Washington DC, EE.UU, 2004.*
138. Moreiras, O., et al., *Ingestas Recomendadas de energía y nutrientes para la población española (revisadas y ampliadas 2011)*. Departamento de Nutrición. Universidad Complutense de Madrid., in *Tablas de Composición de los Alimentos 2011*, Pirámide. p. 228-229.
139. EFSA, *Scientific Opinion on principles for deriving and applying Dietary Reference Values* EFSA Journal, 2010. **8**(3): p. 1458-1488.
140. Pijls, L., M. Ashwell, and J. Lambert, *EURRECA - A Network of Excellence to align European micronutrient recommendations*. Food Chemistry, 2009. **113**(3): p. 748-753.
141. Cavelaars, A.E.J.M., et al., *Nutri-RecQuest: a web-based search engine on current micronutrient recommendations*. Eur J Clin Nutr, 2010. **64**(S2): p. S43-S47.
142. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-428.
143. Kim, Y.-I., *Folate and DNA Methylation: A Mechanistic Link between Folate Deficiency and Colorectal Cancer?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(4): p. 511-519.
144. Stevens, V.L., et al., *High Levels of Folate, from Supplements and Fortification, Are Not Associated with Increased Risk of Colorectal Cancer*. Gastroenterology, 2011.
145. Mason, J.B., et al., *A Temporal Association between Folic Acid Fortification and an Increase in Colorectal Cancer Rates May Be Illuminating Important Biological Principles: A Hypothesis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(7): p. 1325-1329.
146. Morris, M.S., et al., *Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors*. Am J Clin Nutr, 2010: p. ajcn.2009.28671.

147. Sweeney, M., et al., *Persistent circulating unmetabolised folic acid in a setting of liberal voluntary folic acid fortification. Implications for further mandatory fortification?* BMC Public Health, 2009. **9**(295): p. 1-7.
148. Troen, A.M., et al., *Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women.* Journal of Nutrition, 2006. **136**(1): p. 189-194.
149. Nijhout, H.F., et al., *A Mathematical Model of the Folate Cycle.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(53): p. 55008-55016.
150. Butterworth, C.E., Jr. and T. Tamura, *Folic acid safety and toxicity: a brief review.* American Journal of Clinical Nutrition, 1989. **50**(2): p. 353-8.
151. Hagner, N. and M. Joerger, *Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis.* Cancer Manag Res, 2010. **2**: p. 293-301.
152. Varela-Moreiras, G. and E. Alonso Aperte, *Folatos*, in *Vitaminas hidrosolubles. Deulofeu, R.Vilaseca, A.Cruz Pastor, M. Eds*2005, Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular: Barcelona. p. 125-147.
153. Achon, M., et al., *High Dietary Folate Supplementation Affects Gestational Development and Dietary Protein Utilization in Rats.* J. Nutr., 1999. **129**(6): p. 1204-1208.
154. Czeizel, A.E., et al., *Possible association of folic acid supplementation during pregnancy with reduction of preterm birth: a population-based study.* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2009. **In Press, Corrected Proof.**
155. Van Guelpen, B., et al., *Low folate levels may protect against colorectal cancer.* Gut, 2006. **55**(10): p. 1461-1466.
156. Eussen, S.J.P.M., et al., *Plasma Folate, Related Genetic Variants, and Colorectal Cancer Risk in EPIC.* Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2010. **19**(5): p. 1328-1340.
157. Mills, J.L., et al., *Low vitamin B-12 concentrations in patients without anemia: the effect of folic acid fortification of grain.* American Journal of Clinical Nutrition, 2003. **77**(6): p. 1474-1477.
158. Cole, B.F., et al., *Folic Acid for the Prevention of Colorectal Adenomas: A Randomized Clinical Trial.* JAMA, 2007. **297**(21): p. 2351-2359.
159. Kotsopoulos, J., et al., *Effects of dietary folate on the development and progression of mammary tumors in rats.* Carcinogenesis, 2005. **26**(9): p. 1603-1612.
160. De Henauw, S., et al., *Nutritional status and lifestyles of adolescents from a public health perspective. The HELENA Project—Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence.* Journal of Public Health, 2007. **15**(3): p. 187-197.
161. Ortiz-Andrellucchi, A., et al., *Calidad nutricional de la dieta en gestantes sanas de Canarias.* Medicina Clínica, 2009. **In Press, Corrected Proof.**
162. Serra-Majem, L., et al., *Food patterns of Spanish schoolchildren and adolescents: The enKid Study.* Public Health Nutrition, 2001. **4**: p. 1433-1438

163. Serra-Majem, L., et al., *Risk of inadequate intakes of vitamins A, B1, B6, C, E, Folate, Iron and Calcium in the Spanish population aged 4 to 18*. *Int J Vitam Nutr Res*, 2001. **71**(6): p. 325-331.
164. del Pozo, S., C. Cuadrado, and O. Moreiras, *Cambios con la edad en la ingesta dietética de personas de edad avanzada: Estudio Euronut-SENECA*. *Nutricion Hospitalaria*, 2003. **18**: p. 348-352.
165. Margetts, B.M., *Nutrient intake and patterns in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohorts from 10 European countries*. *Eur J Clin Nutr*, 2009. **63**(S4): p. S1-S2.
166. Sánchez-Villegas, A., et al., *Association between folate, vitamin B6 and vitamin B12 intake and depression in the SUN cohort study*. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2009. **22**(2): p. 122-133.
167. Martínez Burgos, M.A., et al., *Building a unified Spanish food database according to EuroFIR specifications*. *Food Chemistry*, 2009. **113**(3): p. 784-788.
168. ILSI, *Micronutrient Landscape of Europe: comparison of intakes and methodologies with particular regard to higher consumption*, in *ILSI Europe Report Series* 2008.
169. Møller, A. and J. Ireland, *LanguaL 2009 – The LanguaL thesaurus. EuroFIR Technical Report D1.8.43. Danish Food Information, 2009*, 2009.
170. *Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n o 1924/2006 y (CE) n o 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n o 608/2004 de la Comisión*. DOUE número 304 de 22/11/2011.
171. *Real Decreto 1669/2009, de 6 de noviembre, por el que se modifica la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 930/1992, de 17 de julio*. BOE num. 269 de 7 de noviembre de 2009.
172. *Real Decreto 930/1992, de 17 de julio, por el que se aprueba la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios*. BOE num. 187 de 5 de agosto de 1992.
173. *Real Decreto 1430/1997, de 15 de septiembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los productos alimenticios destinados a ser utilizados en dietas de bajo valor energético para reducción de peso*. BOE num 229 de miércoles 24 de septiembre de 1997
174. *Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación*. BOE num 131 de 30 de mayo de 2008.

175. *Real Decreto 480/2004, de 26 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.* BOE num 80 de viernes 2 de abril de 2004.
176. *Real Decreto 1091/2000, de 9 de junio, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria específica de los alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales.* BOE num 139 de 10 de junio de 2000.
177. *Reglamento (UE) N 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.* DOUE número L136 del 25/5/2012.
178. *European Commission. Health and Consumers Directorate-General. Working document on the setting of Nutrient Profiles. Preliminary draft. Legal proposal.* 2009.
179. Gry, J., et al., *EuroFIR-BASIS - a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods.* Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(8): p. 434-444.
180. Møller, A., et al., *The EuroFIR Thesauri 2008 EuroFIR Technical Report D1.8.22.* Disponible en: <http://www.eurofir.net/?q=node/209> (Último acceso: junio 2009). 2008.
181. Westenbrink, S., et al., *Food composition databases: The EuroFIR approach to develop tools to assure the quality of the data compilation process.* Food Chemistry, 2009. **113**(3): p. 759-767.
182. Oseredczuk, M. and S. Salvini, *EuroFIR Workpackage 1.3, Task Group 4. Guidelines for Quality Index attribution to original data from scientific literature or reports for Eurofir data interchange.* 30 June, 2008, revised 12th October 2009.
183. *Estudio de Mercado. Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria. Informe Anual. Resultados 2007,* Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
184. *Estudio de Mercado. Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria. Informe Anual. Resultados hasta febrero de 2010,* Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
185. *TNS Worldpanel. TNS Distribución 2008. La distribución distribución española y su comprador.* 2008.
186. *Directiva 90/496/CEE del Consejo, de 24 de Septiembre, relativa al etiquetado de propiedades nutritivas de los productos alimenticios.* DOCE num. L 276, de 6 de Octubre.
187. Bagley, P.J. and J. Selhub, *Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrochemical detection.* Clinical Chemistry, 2000. **46**(3): p. 404-411.
188. Horne, D.W., C.L. Krumdieck, and C. Wagner, *Properties of folic acid gamma-glutamyl hydrolase (conjugase) in rat bile and plasma.* J Nutr, 1981. **111**(3): p. 442-9.

189. Rader, J.I., C.M. Weaver, and G. Angyal, *Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification*. Food Chemistry, 2000. **70**(3): p. 275-289.
190. Doherty, R.F. and G.R. Beecher, *A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(2): p. 354-361.
191. Hyun, T.H. and T. Tamura, *Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review*. Experimental Biology and Medicine, 2005. **230**: p. 444-454.
192. Póo-Prieto, R., *Nuevos métodos cromatográficos para la determinación de ácido fólico y folatos en la era de la fortificación. Aplicación en alimentos y estimación de la ingesta.*, in *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos 2007*, Universidad San Pablo CEU. Facultad de Farmacia: Madrid.
193. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 2002. **74**(5): p. 835 - 855.
194. Sharpless, K., et al., *Certification of nutrients in standard reference material 1846: infant formula*. Journal of AOAC International, 1997. **80**: p. 611-621.
195. National Institute of Standards and Technology, E., *Certificate of analysis. Standard Reference Material 1846. Infant Formula*, 2006.
196. Tamura, T., et al., *Lactobacillus casei response to pteroylpolyglutamates*. Anal Biochem, 1972. **49**: p. 517-521.
197. AOAC, Association of Official Analytical Chemists. *Vitamin assays, microbiological methods*, in *Official methods of analysis 2000*: Gaithersburg, MD, EEUU. p. Sec 960.46, Cáp. 45.2.01.
198. *AOAC official Method 2004.05. Total Folates in Cereals and Cereal Foods. Microbiological Assay-Trienzyme Procedure. First Action 2004*. 2004.
199. Millbank, L., et al., *Automation of the assay of folate in serum and whole blood*. J Clin Pathol, 1970. **23**(1): p. 54-59.
200. Wilson, S.D. and D.W. Horne, *Use of glycerol-crioprotected Lactobacillus casei for microbiological assay of folic acid*. Clinical Chemistry, 1982. **28**(5): p. 1198-1200.
201. Phillips, D.R. and A.J.A. Wright, *Studies on the response of Lactobacillus casei to different folate monoglutamates*. British Journal of Nutrition, 1982. **47**(183-189).
202. *WHO International Standard Vitamin B12 And Serum Folate NIBSC code: 03/178 Instructions for use (Version 2.0, Dated 04/04/2008)* 2008.
203. Thorpe, S.J., et al., *International Standard for serum vitamin B12 and serum folate: international collaborative study to evaluate a batch of lyophilised serum for B12 and folate content*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2007. **45**(3): p. 380-386.
204. Fisher, R.A., *On the probable error of a coefficient of correlation deduced from a small sample*. Metron, 1921. **1**: p. 3-32.

205. Bravo, G. and L. Potvin, *Estimating the reliability of continuous measures with cronbach's alpha or the intraclass correlation coefficient: Toward the integration of two traditions*. Journal of Clinical Epidemiology, 1991. **44**(4-5): p. 381-390.
206. Landis, J. and G. Koch, *The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data*. Biometrics, 1977. **33**(1): p. 159-174.
207. Bland, J.M. and D.G. Altman, *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. The Lancet, 1986. **327**(8476): p. 307-310.
208. Bland, J.M. and D.G. Altman, *Measuring agreement in method comparison studies*. Statistical Methods in Medical Research, 1999. **8**(2): p. 135-160.
209. Dapcich, V., et al., *Guía de la Alimentación Saludable. 2004. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Disponible en http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/come_seguro_y_saludable/guia_alimentacion2.pdf (Último acceso: junio 2010)*
210. Verkaik-Kloosterman, J., P. van 't Veer, and M.C. Ocke, *Simulation Model Accurately Estimates Total Dietary Iodine Intake*. J. Nutr., 2009. **139**(7): p. 1419-1425.
211. Kloosterman, J., et al., *Framework for intake simulation of functional ingredients*. Public Health Nutrition, 2007. **11**(03): p. 279-287.
212. Ortega, R.M., et al., *The relationship between the consumption of an inadequate breakfast and energy profile imbalance in preschool children*. Nutrition Research, 1998. **18**(4): p. 703-712.
213. Alcoriza, J., et al., *Raciones estándar de materias primas y recetas culinarias para uso de encuestas alimentarias*. Nutricion Clinica, 1990. **10**(2): p. 39-44.
214. Samaniego-Vaesken, M.L., E. Alonso-Aperte, and G. Varela-Moreiras, *Folic acid fortified foods available in Spain: type of products, level of fortification and target population groups*. Nutricion Hospitalaria, 2009. **24**(4): p. 459-466.
215. Møller, A., et al., *EuroFIR's food databank systems for nutrients and bioactives*. Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(8): p. 428-433.
216. *Directiva 2006/125/CE de la Comision de 5 de diciembre de 2006 relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. DOCE num. L 339/16 del 6 de diciembre de 2006.*
217. *EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to folate and blood formation (ID 79), homocysteine metabolism (ID 80), energy-yielding metabolism (ID 90), function of the immune system (ID 91), function of blood vessels (ID 94, 175, 192), cell division (ID 193), and maternal tissue growth during pregnancy (ID 2882) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 on request from the European Commission*. EFSA Journal, 2009. **7**(9): p. 1213-1235.
218. *EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to folate and contribution to normal psychological functions (ID 81, 85, 86, 88), maintenance of normal vision (ID 83, 87),*

- reduction of tiredness and fatigue (ID 84), cell division (ID 195, 2881) and contribution to normal amino acid synthesis (ID 195, 2881) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal, 2010. 8(10): p. 1760-1779.*
219. AOAC, *Peer Verified Methods Program. Manual on Procedures*. 1998.
 220. AESAN, *Registro General Sanitario de Alimentos: Empresas Alimentarias Inscritas (RGSA)*. Disponible en: http://www.aesa.msc.es/rqsa/formulario_principal_js.jsp (Último acceso: enero 2009).
 221. Carpenter, K.J., *A Short History of Nutritional Science: Part 4 (1945–1985)*. The Journal of Nutrition, 2003. **133**(11): p. 3331-3342.
 222. Lawrence, M., *Assessing the case for mandatory folate fortification: policy-making in the face of scientific uncertainties*, 2005, Blackwell Publishing Ltd. p. 328-330.
 223. Harris, J.L., et al., *Effects of Serving High-Sugar Cereals on Children's Breakfast-Eating Behavior*. Pediatrics, 2010. **127**(1): p. 71-76.
 224. Moreiras, O., et al., *Tablas de Composición de Alimentos 14.ª ed2010*, Madrid: Pirámide.
 225. Déleuze Isasi, P., *Legislación alimentaria. Código alimentario español y disposiciones complementarias*. Séptima ed2006: Tecnos.
 226. Ros, G., E. Martínez de Victoria, and A. Farran, *Spanish food composition database: A challenge for a consensus*. Food Chemistry, 2009. **113**(3): p. 789-794.
 227. *Estudio de Mercado. Observatorio del Consumo y la Distribución Alimentaria. Informe Histórico - Resultados Marzo 2011*. Disponible en: http://www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/OCDH_Historico_mz_2011_tcm7-170176.pdf, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
 228. *Alimentación en España 2010. Producción, industria, distribución y consumo*. Disponible en: http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion_2010/3_info_sectores.html (Último acceso: mayo de 2011). 10ª 2009/2010 ed2010: Mercasa.
 229. Selhub, J. and L. Paul, *Folic acid fortification: Why not vitamin B12 also?* BioFactors, 2011: p. n/a-n/a.
 230. MARM, *La Alimentación en España 2006. Panel de Consumo Alimentario*. Estudios sobre la comercialización Agroalimentaria en España, Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MARM).
 231. Achón, M., et al., *Plasma folate concentrations after a single dose ingestion of whole and skimmed folic acid fortified milks in healthy subjects*. European Journal of Nutrition, 2010.
 232. Siró, I., et al., *Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--A review*. Appetite, 2008. **51**(3): p. 456-467.

233. Nielsen, A., *Un estudio señala que el 13% de los españoles toma diariamente vitaminas y complementos dietéticos*. 2009.
234. *Estudio de prevalencia de Obesidad Infantil "ALADINO" (Alimentación, Actividad física, Desarrollo INfantil y Obesidad)*. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Disponible en: http://www.aesan.mspsi.gob.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/ALADINO_presentacion.pdf (Último acceso: junio 2011). 2011.
235. *Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios*. BOE num. 202 de 24 de agosto de 1999.
236. Sichert-Hellert, W. and M. Kersting, *Fortifying food with folic acid improves folate intake in german infants, children, and adolescents*. Journal of Nutrition, 2004. **134**(10): p. 2685-2690.
237. Cheftel, J.C., *Food and nutrition labelling in the European Union*. Food Chemistry, 2005. **93**(3): p. 531-550.
238. Kelly, B., et al., *Consumer testing of the acceptability and effectiveness of front-of-pack food labelling systems for the Australian grocery market*. Health Promotion International, 2009. **24**(2): p. 120-129.
239. Cowburn, G. and L. Stockley, *Consumer understanding and use of nutrition labelling: a systematic review*. Public Health Nutrition, 2005. **8**(01): p. 21-28.
240. Freisleben, A., P. Schieberle, and M. Rychlik, *Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2003. **315**(2): p. 247-255.
241. Finglas, P.M., et al., *Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food*. Food Chemistry, 1999. **64**(2): p. 245-255.
242. Dary, O., *Establishing safe and potentially efficacious fortification contents for folic acid and vitamin B12*. Food and Nutrition Bulletin, 2008. **19**(2): p. S214-S224.
243. Blakley, R., *The biochemistry of folic acid and related pteridines*. North-Holland Research Monographs Frontiers of Biology Vol. 13. 1969, Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
244. Shakur, Y.A., et al., *How much folate is in Canadian fortified products 10 years after mandated fortification?* 20092009.
245. Phillips, K.M., et al., *Folic Acid Content of Ready-to-Eat Cereals Determined by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Comparison to Product Label and to Values Determined by Microbiological Assay*. Cereal chemistry, 2010. **87**(1): p. 42-49.
246. Forssén, K.M., et al., *Folates and dairy products: A critical update*. Journal of the American College of Nutrition, 2000. **19**(2): p. 100S-110S.

247. Öhrvik, V. and C. Witthöft, *Orange juice is a good folate source in respect to folate content and stability during storage and simulated digestion*. European Journal of Nutrition, 2008. **47**(2): p. 92-98.
248. Shakur, Y.A., et al., *A Comparison of Micronutrient Inadequacy and Risk of High Micronutrient Intakes among Vitamin and Mineral Supplement Users and Nonusers in Canada*. The Journal of Nutrition, 2012. **142**(3): p. 534-540.
249. Konings, E.J.M., *A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour*. Journal of AOAC International, 1999. **82**(1): p. 119-127.
250. Shakur, Y.A., et al., *Folic acid fortification above mandated levels results in a low prevalence of folate inadequacy among Canadians*. Am J Clin Nutr, 2010: p. ajcn.2010.29696.
251. Pentieva, K., et al., *The Short-Term Bioavailabilities of [6S]-5-Methyltetrahydrofolate and Folic Acid Are Equivalent in Men*. J. Nutr., 2004. **134**(3): p. 580-585.
252. Perez-Rodrigo, C., et al., *Food preferences of Spanish children and young people: the enKid study*. Eur J Clin Nutr, 2003. **57**(S1): p. S45-S48.
253. Yeung, L.F., et al., *Contributions of enriched cereal-grain products, ready-to-eat cereals, and supplements to folic acid and vitamin B-12 usual intake and folate and vitamin B-12 status in US children: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2003-2006*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011. **93**(1): p. 172-185.
254. Kroes, R., et al., *Assessment of intake from the diet*. Food and Chemical Toxicology, 2002. **40**(2-3): p. 327-385.
255. *¿Qué desayunan los españoles? Observatorio del consumo y la distribución alimentaria*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2006. Disponible en: http://www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/desayuno_espanoles_tcm7-7939.pdf (Ultimo acceso: junio 2011).
256. Aranceta, J., et al., *Breakfast consumption in Spanish children and young people*. Public Health Nutrition, 2001. **4**(6a): p. 1439-1444.
257. Alexy, U., M. Wicher, and M. Kersting, *Breakfast trends in children and adolescents: frequency and quality*. Public Health Nutrition, 2010. **13**(11): p. 1795-1802.
258. Deshmukh-Taskar, P.R., et al., *Do Breakfast Skipping and Breakfast Type Affect Energy Intake, Nutrient Intake, Nutrient Adequacy, and Diet Quality in Young Adults? NHANES 1999-2002*. J Am Coll Nutr, 2010. **29**(4): p. 407-418.
259. MARM-FEN, *Valoración de la Dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario*, 2008, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
260. Rofail, D., et al., *Factors contributing to the success of folic acid public health campaigns*. Journal of Public Health, 2012. **34**(1): p. 90-99.
261. Navarrete-Muñoz, E.M., et al., *Ingesta dietética y de suplementos de ácido fólico en mujeres embarazadas de Valencia*. Medicina Clínica, 2010. **135**(14): p. 637-643.

262. Abellán García, A. and C. Esparza Catalán, *Un perfil de las personas mayores en España, 2011. Indicadores estadísticos básicos. Disponible en: <http://www.imsersomayores.csic.es/documentacion/biblioteca/registro.htm?id=58225> (Último acceso: enero 2012), 2011.*
263. Milà Villarroel, R., R. Abellana Sangrà, and A. Farran Codina, *Valoración nutricional de los menús en cinco residencias geriátricas y su adecuación a las ingestas recomendadas para la población anciana.* *Actividad Dietética*, 2009. **13**(2): p. 51-58.
264. Gonzalez-Gross, M., et al., *B-Vitamins and Homocysteine in Spanish Institutionalized Elderly.* *Int J Vitam Nutr Res*, 2007. **77**(1): p. 22-33.
265. Serra-Majem, L., et al., *Nutrient adequacy in Spanish children and adolescents.* *British Journal of Nutrition*, 2006. **96**(SupplementS1): p. S49-S57.
266. Serra-Majem, L., *Vitamin and mineral intakes in European children. Is food fortification needed?* *Public Health Nutrition*, 2001. **4**: p. 101-107.
267. Moreiras, O., et al., *Tablas de composición de alimentos.* 10ª ed2006, Madrid: Pirámide.
268. Winkels, R.M., et al., *Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid.* *Am J Clin Nutr*, 2007. **85**(2): p. 465-473.
269. Wright, A.J.A., et al., *Differential Kinetic Behavior and Distribution for Pteroylglutamic Acid and Reduced Folates: a Revised Hypothesis of the Primary Site of PteGlu Metabolism in Humans.* *J. Nutr.*, 2005. **135**(3): p. 619-623.
270. Serra-Majem, L., et al., *Fortified foods. Criteria for vitamin supplementation in Spain.* *Public Health Nutrition*, 2001. **4**: p. 1331-1334.
271. Wolf, A. and I. Elmadfa, *Chapter 11 - Fruit and Vegetable Intake of Mothers in Europe: Risks/Benefits*, in *Bioactive Foods in Promoting Health*, W. Ronald Ross and R.P. Victor, Editors. 2010, Academic Press: San Diego. p. 161-172.
272. Aranceta, J. and L.s. Serra-Majem, *Dietary guidelines for the Spanish population.* *Public Health Nutrition*, 2001. **4**(6a): p. 1403-1408.
273. Vliet, T.v., et al., *Effect of fortified spread on homocysteine concentration in apparently healthy volunteers.* *Eur J Clin Nutr*, 2007. **61**: p. 769-778.
274. Yang, Q., et al., *Folic acid source, usual intake, and folate and vitamin B-12 status in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2006.* *Am J Clin Nutr*, 2010. **91**(1): p. 64-72.
275. Cuskelly, G.J., K.M. Mooney, and I.S. Young, *Folate and vitamin B12: friendly or enemy nutrients for the elderly.* *Proceedings of the Nutrition Society*, 2007. **66**(04): p. 548-558.
276. Renwick, A.G., *Toxicology of Micronutrients: Adverse Effects and Uncertainty.* *J. Nutr.*, 2006. **136**(2): p. 493S-501.

277. Samaniego-Vaesken, M.d.L., E. Alonso-Apperte, and G. Varela-Moreiras, *Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market*. Journal of Food Composition and analysis, 2010. **23**(5): p. 419-423.