



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo Y Validación De Un Método
Analítico Para La Cuantificación De
Ácido Fólico En Verduras**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ANNE ISABEL GUZMÁN STRUILLLOU



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ
VOCAL: Profesor: FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS
SECRETARIO: Profesor: LUZ SANDRA SÁNCHEZ DEL ANGEL
1er. SUPLENTE: Profesor: JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS
2° SUPLENTE: Profesor: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: ANEXO LABORATORIO 3D,
Facultad de Química, UNAM**

ASESOR DEL TEMA: PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

SUSTENTANTE: ANNE ISABEL GUZMÁN STRUILLOU

A mis papas por apoyarme desde el principio en este sueño que en algún momento pareció muy difícil de alcanzar.

A ma 'tite maman merci d'être toujours à mes côtés même si la distance parfois a paru un peu trop longue et surtout pour m'avoir donné la vie, j'espère que cette joie que tu me racontes que tu as sentie quand je suis née ne s'éteigne jamais. Il n'y a pas de meilleure maman que toi.

A mi papá gracias por acompañarme éste tiempo y soportar mi malhumor cuando era época de entregas, exámenes o acompañarme a comprar material de último momento. Por leer y leer esta tesis para darme tus correcciones. Gracias por haber estado aquí conmigo durante estos tres años que no siempre fueron fáciles y por estar ahí siempre.

A mis hermanos, gracias por estar ahí para molestarme, por pelear conmigo y por estar al pendiente de mi. Aun recuerdo cuando jugábamos de pequeños, se acuerdan cuando nos llenamos de espuma y que luego nos regañaron... Gracias por darme consejos cuando los necesite.

Xavier gracias por ser el hermano mayor en toda la extensión de la palabra, por estar ahí cuando te he necesitado y por algunos regaños así como muy buenos consejos.

Gonza (copitas) por hacerme reír con tus ocurrencias, hacerme enojar y luego reírnos juntos de esa rabieta. Gracias por ser mi confidente number one. Has hecho bien tu trabajo de hermano menor.

A mis abuelitos, por consentirme, darme consejos, platicarme historias que no todos tenemos la oportunidad de escuchar.

Abuelita Cata gracias por recibirme siempre en su casa con los brazos abiertos y tenerme siempre tortillas. Gracias por todas sus palabras. Siempre es un gusto hablar con usted y estar con usted.

Mami gracias por contarme tantos relatos de tu vida, por todo lo que me has dado y todas las enseñanzas de vida. Y por tenerme siempre presente.

Papi (q.e.p.d) merci pour avoir été mon grand père je n'ais que de bons souvenirs de toi, j'aurais aimé que tu puisses lire ce mémoire. Ce n'est pas sur la littérature comme la tienne mais de la chimie.

A todos mis Tíos y Tías, gracias a todos por brindarme apoyo palabras de aliento. Gracias porque todos desde que este proyecto de vida empezó estuvieron al tanto de mi, de mis avances.

Tío Alfredo gracias por tus carnitas y el apoyo que me diste cuando empecé ese proyecto y aun cuando no lo acabe me sirvió mucho porque aprendí más sobre mi cultura y sobre Zacapu. También gracias por estar al tanto de mi.

Tía Ana, te agradezco tus consejos, regaños, platicas interminables y buenos momentos que hemos pasado juntas.

Tía Madrina Teresita muchas gracias por ser mi madrina y brindarme apoyo, estar pendiente de mi.

Tío Padrino Juan gracias por tu apoyo cuando lo he necesitado, por las platicas que hemos tenido y por las risas que me has sacado.

Marilou merci d'être ma marraine et d'être toujours au courant de moi et surtout de me faire sentir très spéciale lorsque tu m'embrasse. Je me sens toujours très aimée dans tes bras, et les sorties de shopping que l'on fait une fois par an.

Yannick Tío merci de demander ce que je fais, et des très bons repas que l'on prend lorsque je vais en France. Surtout merci des histoires de fougounette et bistouquette, je n'oublierai jamais.

Mister Zouze je veux te remercier tes conseils, les questions que tu me poses sur ma vie et pour ce fabuleux stage.

A mis amigos y amigas, por ser personas tan especiales en mi vida, por compartir momentos de estudio, relajo, tristeza, alegría conmigo. Por el apoyo que me han brindado en todos estos años de conocerlos. Gracias por cuidar de mi, y no está de más decirles que son parte de mi familia.

Marcia, hermana son más de diez años de amistad que sigue intacta. Gracias por haber estado conmigo todo este tiempo, por brindarme apoyo, por reírnos, por experimentar muchísimas cosas juntas por primera vez. Por contestar mis llamadas a deshoras.

Noëllie, hermana, nosotras nos conocemos desde hace mucho más tiempo. Eres mi amiga que ha estado conmigo por más tiempo. Gracias por seguir siendo mi amiga a pesar de ya más de cinco años que te fuiste, eso no ha impedido que me apoyes, que me des consejos y que compartamos muchísimos momentos distintos, alegrías, tristezas. Recuerda que siempre hay simplelandia para nosotras.

Dedicatorias

Magaly quien pensaría que por no hacer la tarea iba a nacer una amistad tan grande y tan maravillosa. Nena gracias por tus abrazos cuando los he necesitado, por tus consejos, palabras. Gracias por estar ahí.

Cristina, eres una niña maravillosa y muchísimas gracias por alegrarte siempre con mis tonterías, logros por todo. Gracias por ser una niña tan especial y por estar ahí cuando lo he necesitado.

Aurea, tantas cosas hemos compartido jamás se me olvidaran las miles de platicas que tuvimos en tu carro. Hasta una película se nos ocurrió, de hecho sigo esperando para protagonizarla. Pero no hay mejor historia que la amistad que tenemos, de apoyo, comprensión, alegría. Todo esto último tú me lo has dado.

Karla, nena gracias por las pláticas que hemos tenido, por tus consejos, apoyo, palabras de aliento cuando las he necesitado. Y tantos momentos que compartimos.

Jonas, pequeño eres tan especial para mí, eres como una luz en este mundo que siempre me trae alegría, tu siempre con palabras adecuadas.

Eric, gracias por estar conmigo todo éste camino que no siempre fue fácil. Gracias por apoyarme, soportarme, hacerme reír, por tanto que hemos compartido juntos y espero que siga así.

Pedro gracias por hacerme parte de tu laboratorio que es tan especial y por darme siempre tu apoyo, buenos consejos y alentarme a continuar con este sueño.

Agradezco a las Maestras Luz Sandra y Fanny por haberse tomado el tiempo de leer éste trabajo.

Finalmente, quiero que ésta tesis tenga una dedicatoria especial:

Para un ángel que siempre me recuerda que la vida sigue y que hay que sonreírle y reírse a pesar de las adversidades. A ti Lupita.

°C: grados Celcius

µg: microgramo

Abs: Absorbencia

cm: centímetro

DFE: Dietary Folate Equivalents, Equivalente de folato dietético

FDA: Food and Drug Administration, Administración de Alimentos y Drogas

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía Líquida de alta eficiencia

L: litros

mg: miligramo

mL: mililitros

NaOH: hidróxido de sodio

nm: nanómetro

Número CAS : Chemical Abstract Service

Número CE (EINECS): Número Comunidad Europea del Inventario europeo de sustancias comerciales existentes

USDA: United State Department of Agriculture, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América por sus siglas en inglés

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

| Capítulo | Página |
|---|---------------|
| Capítulo I: Introducción | ...1 |
| I) Introducción | ...2 |
| II) Objetivos | ...4 |
| III) Hipótesis | ...5 |
| Capítulo II: Marco Teórico | ...6 |
| I) Nomenclatura y propiedades del ácido fólico | ...7 |
| 1) Propiedades químicas y físicas del ácido fólico | ...7 |
| 2) Estabilidad y reactividad del ácido fólico | ...8 |
| II) Generalidades del ácido fólico | ...8 |
| III) Técnicas para la cuantificación de ácido fólico | ...13 |
| a) Cromatografía de alta resolución | ...13 |
| b) Radioinmunoensayo enzimático | ...14 |
| c) Titulación Potenciométrica | ...15 |
| IV) El ácido fólico y las verduras | ...15 |
| 1) Propiedades físicas y químicas, de cultivo y uso culinario de las verduras | ...16 |
| a) Aguacate | ...16 |
| b) Betabel | ...17 |
| c) Brócoli | ...17 |
| d) Elote | ...18 |
| e) Espárrago | ...19 |
| f) Espinaca | ...19 |
| g) Jitomate | ...20 |
| h) Papa | ...21 |
| i) Pepino | ...21 |
| j) Zanahoria | ...22 |
| 2) Producción en México | ...22 |
| a) Producción nacional | ...22 |
| b) Distribución de la producción estatal por grupo de verdura | ...26 |
| V) Espectrofotometría UV | ...27 |
| 1) Generalidades espectrofotometría | ...27 |
| 2) Ley de Beer-Lambert | ...28 |
| VI) Validación de métodos analíticos | ...28 |
| Capítulo III: Metodología | ...31 |
| I) Formación del folato | ...32 |
| II) Fundamento de metodología | ...32 |
| III) Muestras | ...33 |

| | |
|---|--------------|
| IV) Reactivo de importancia | ...33 |
| V) Equipo de importancia | ...33 |
| VI) Desarrollo experimental | ...34 |
| 1) Determinación de las características espectrofotométricas del ion folato | ...34 |
| a) Espectro de absorción | ...35 |
| b) Gráfico de calibración del ion folato | ...35 |
| c) Linealidad del sistema | ...35 |
| d) Precisión del método | ...37 |
| 2) Preparación de la muestra | ...38 |
| 3) Determinación de ácido fólico en verduras crudas y cocidas | ...39 |
| | |
| Capítulo IV: Resultados y Discusión | ...42 |
| I) Análisis previos de estabilidad del ácido fólico | ...43 |
| II) Caracterización del ácido fólico | ...44 |
| III) Determinación de ácido fólico en verduras | ...48 |
| 1) Aguacate | ...48 |
| 2) Betabel | ...50 |
| 3) Brócoli | ...51 |
| 4) Elote | ...52 |
| 5) Espárrago | ...53 |
| 6) Espinaca | ...54 |
| 7) Jitomate | ...55 |
| 8) Papa | ...57 |
| 9) Pepino | ...58 |
| 10) Zanahoria | ...59 |
| 11) Análisis conjunto de las diez verduras | ...60 |
| | |
| Capítulo V: Conclusiones | ...70 |
| | |
| Capítulo VI: Bibliografía | ...74 |
| | |
| Apéndice 1: Glosario de enfermedades ligadas al ácido fólico | |
| Apéndice 2: Tablas de contenido de ácido fólico USDA | |
| Apéndice 3: Equipo y Material | |
| Apéndice 4: Fórmulas Matemáticas | |
| Apéndice 5: Datos de las diez verduras | |
| Apéndice 6: Espectro de absorción de las verduras | |

| Número de Figura | Página |
|--|---------------|
| Figura No. 1: Molécula del ácido fólico y sus sub-unidades | ...7 |
| Figura No. 2: Metabolismo del ácido fólico | ...9 |
| Figura No. 3: Formación de la sal de ácido fólico | ...32 |
| Figura No. 4: Caracterización analítica del ácido fólico | ...34 |
| Figura No. 5: Acondicionamiento de las verduras | ...38 |
| Figura No. 6: Determinación de ácido fólico en verduras | ...39 |

| Número de Gráfico | Página |
|---|---------------|
| Gráfico No.1: Producción 2007 de verduras en la República Mexicana. SIAP SAGARPA 2007 | ...23 |
| Gráfico No. 2: Valor de la producción 2007 de verduras en la República Mexicana SIAP SAGARPA 2007 | ...24 |
| Gráfico No.3: Precio por tonelada de verdura del 2007 en la República Mexicana. | ...25 |
| Gráfico No.4: Gráfico Estándar del ácido fólico en agua | ...43 |
| Gráfico No.5: Espectro de absorción del ion folato | ...44 |
| Gráfico No.6: Gráfico Estándar del folato | ...45 |
| Gráfico No.7: Curvas de linealidad del sistema | ...46 |
| Gráfico No.8: Comparación del contenido de ácido fólico en las verduras | ...61 |
| Gráfico No.9: Disminución del contenido de ácido fólico en las verduras | ...62 |

| Número de tabla | Página |
|--|---------------|
| Tabla No.1: Ingesta diaria recomendada de ácido fólico en las etapas de vida | ...12 |
| Tabla No.2: Estados de la República de mayor producción de verdura | ...26 |
| Tabla No.3: Rangos de aceptación de los parámetros de evaluación para la validación de un método | ...29 |
| Tabla No. 4: Datos para la elaboración de los niveles de concentración | ...36 |
| Tabla No.5: Ecuaciones de recta de linealidad | ...47 |
| Tabla No.6: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en aguacate | ...49 |
| Tabla No.7: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en betabel | ...51 |
| Tabla No.8: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en brócoli | ...52 |
| Tabla No.9: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en elote | ...53 |
| Tabla No.10: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en espárrago | ...54 |
| Tabla No.11: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en espinaca | ...55 |
| Tabla No.12: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en jitomate | ...56 |
| Tabla No.13: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en papa | ...57 |
| Tabla No.14: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en pepino | ...59 |
| Tabla No.15: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en zanahoria | ...60 |
| Tabla No.16: Tabla comparativa de los contenidos de ácido fólico experimentales y del Departamento De Agricultura De Estados Unidos De América | ...67 |

Capítulo I

Introducción

I- INTRODUCCIÓN

La buena salud en las mujeres es primordial para la procreación, al inicio del embarazo, el ácido fólico o vitamina B₉ es uno de los nutrientes más importantes para el buen desarrollo del feto, previene defectos en el cerebro y la médula espinal, denominados también defectos del tubo neural, de ahí su importancia en desarrollo fetal y los primeros años de vida.

El ácido fólico es un componente químico que además ayuda en la prevención de ciertas enfermedades (anemia macrocítica y megaloblástica)^{1,2}. Se encuentra por naturaleza en las verduras, por lo que su ingesta diaria recomendada está garantizada en una dieta balanceada.

Los métodos reportados para la cuantificación de ácido fólico son muy complejos o caros, como lo puede ser un procedimiento usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)³, este método es el de referencia para la cuantificación de ácido fólico según la FDA, o bien su cuantificación por radioinmunoensayo enzimático comercial de folato de alta afinidad^{4,5} (método que usa una proteína proveniente de la leche para la captación del ácido fólico), o mediante una titulación potenciométrica⁶. Al realizar y validar una metodología basada en la espectrofotometría se estará asegurando un método sencillo, rápido, económico y preciso. El desarrollo de la metodología basada en espectrofotometría facilitará la cuantificación del ácido fólico en distintas áreas de la química de los alimentos, debido a que las empresas por lo general tienen a su disposición espectrofotómetro.

Al tener los datos del contenido de ácido fólico en las verduras se podrá llevar a cabo una comparación con los datos reportados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA por sus siglas en ingles)⁷, datos desarrollados en base a una metodología por HPLC. La comparación entre ambos datos podrá llevar a verificar si las verduras producidas en nuestro país, tienen una buena calidad en cuanto al contenido de este componente.

II- OBJETIVOS

1) Objetivo general

Usar la espectrofotometría para desarrollar y validar una metodología para la determinación de ácido fólico en diez verduras distintas con finalidad de promover la ingesta de ácido fólico mediante el consumo de verduras, y subsecuente la ingesta de las verduras por su contenido de ácido fólico.

2) Objetivos particulares

- a) Establecer un procedimiento permitiendo la cuantificación de ácido fólico en verduras de manera rápida, sencilla y económica.
- b) Validar el procedimiento desarrollado para la determinación de ácido fólico en verduras.
- c) Determinar si la cocción de las verduras afecta el contenido de ácido fólico.
- d) Comparar el contenido de ácido fólico en las verduras analizadas con los datos reportados por la USDA para ver una tendencia de contenido en ambos países.

III- HIPÓTESIS

Los métodos desarrollados en base a una técnica espectrofotométrica son en general métodos sencillos, rápidos, precisos y económicos, se espera que la metodología desarrollada cumpla con éstas características para la cuantificación de ácido fólico para proponerlo como método alternativo para la cuantificación de ácido fólico.

Se sabe que las verduras con mayor contenido de ácido fólico son las “verduras verdes” se esperara que en las verduras analizadas, las verduras verdes superen en contenido de ácido fólico a las que no presentan estas características.

Al cocer las verduras el contenido de ácido fólico se verá disminuido debido a que el ácido fólico es una vitamina termolábil, por lo tanto sensible a la cocción.

Capítulo **II**

Marco Teórico

I- NOMENCLATURA Y PROPIEDADES DEL ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico adquiere su nombre del latín “folium” que significa hoja, ya que fue aislado de las verduras de hoja verde⁸.

1) Propiedades químicas y físicas del ácido fólico

El ácido fólico está constituido por tres componentes principales: ácido glutámico, ácido p-aminobenzoico y un derivado de la p-teridina, compuesto heterocíclico de anillos condensados¹ (Figura No.1).

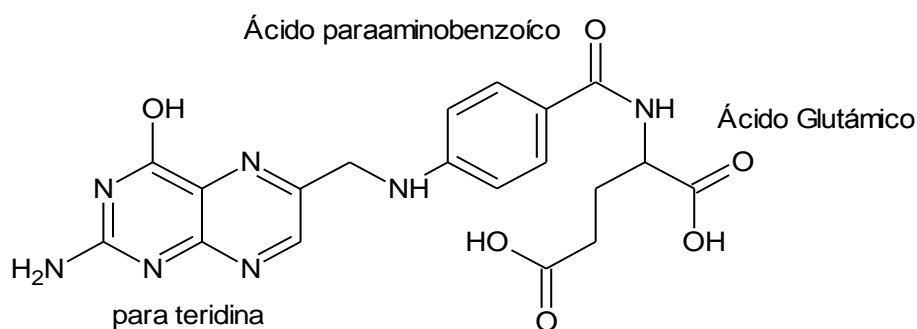


Figura No.1: Molécula del ácido fólico y sus sub-unidades

Su fórmula condensada es C₁₉H₁₉N₇O₆ y su peso molecular es de 441.40 gramos por mol. El ácido fólico se puede identificar por los números:

- CAS [59-30-3]
- Número CE (EINECS): 200-419-0

El ácido fólico usado en la industria química es un sólido de color amarillo, inodoro, cuyo punto de fusión es de 250°C⁹. No es enteramente soluble en agua, aunque la acidifica hasta alcanzar pH cercano a 3. Sin embargo, en soluciones alcalinas muestra una disolución progresiva a partir de pH 5.5 aproximadamente, dependiendo de su concentración original.

2) Estabilidad y reactividad del ácido fólico

Una exposición a la luz solar directa lleva a cabo la descomposición de la molécula de ácido fólico en óxido de nitrógeno, monóxido de carbono y dióxido de carbono. Durante la manipulación del ácido fólico se tiene que evitar el contacto con agentes oxidantes fuertes⁹.

II- GENERALIDADES DEL ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico (ácido p-teroilglutámico), es una vitamina hidrosoluble del complejo B (vitamina B₉)⁹. La enzima L-folato reductasa, reduce el ácido fólico para formar ácido dihidrofólico (H₂F), a su vez éste compuesto es reducido por la enzima dihidrofólico reductasa para formar ácido tetrahidrofólico (H₄F). El agente reductor en ambas reacciones es el NADPH. La vitamina C aumenta la utilización del ácido fólico, potenciando la conversión del ácido fólico en ácido tetrahidrofólico¹.

El ácido fólico en los alimentos se encuentra principalmente en forma de folipoliglutamato y debe perder sus residuos glutámicos¹⁰, esto último con la ayuda de las enzimas específicas a folato de monoglutamilo, permitiendo así, la degradación de los derivados del ácido fólico para poder ser absorbidos en el intestino delgado y los excedentes de éste, desechados por el organismo. Del ácido fólico absorbido, una parte es transportada por la bilis al intestino y de allí pasa a la circulación, la que mantiene las reservas del ácido fólico y facilita su regulación ya que el folato es muy sensible a los trastornos de la producción de la bilis. El ácido fólico de la dieta se elimina en las heces y el suministrado por vía intravenosa se desecha vía urinaria. La mayor parte de éste, se reduce

a tetrahidrofolato en el intestino por la enzima hidrofolato reductasa, que usa NADPH como donador de equivalentes reductores. El metabolismo del ácido fólico antes descrito se muestra en la figura No. 2.

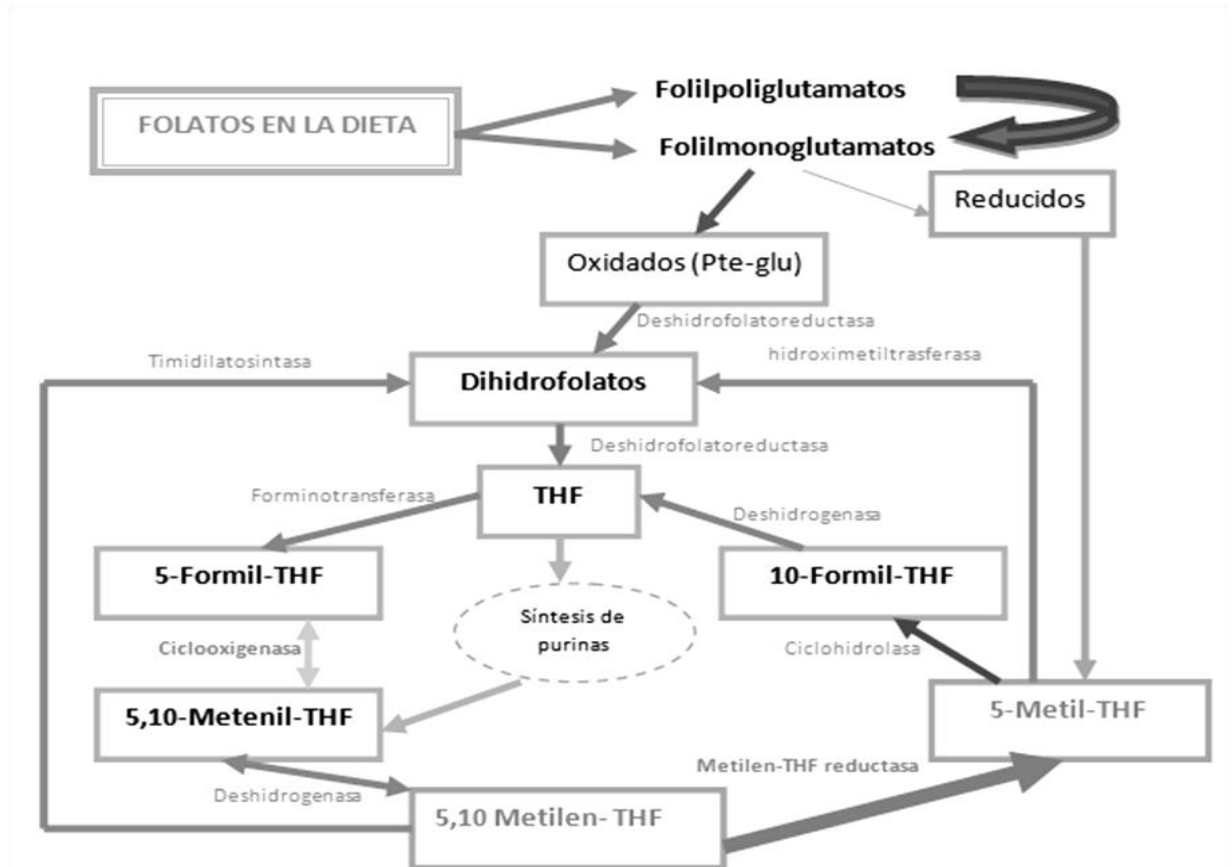


Figura No.2: Metabolismo del ácido fólico¹¹

Los folatos ayudan a fijar el hierro en la hemoglobina, son imprescindibles para la síntesis de ácido nucleicos como lo son el ácido desoxirribonucleico y el ribonucleico, por lo tanto se requieren para la formación y crecimiento de las células¹.

El ácido fólico es un nutriente esencial para la vida celular, por lo que la deficiencia de éste es causada por una baja ingesta, mala absorción, alcoholismo o interacción con fármacos.

Cualquiera de las situaciones a las que pueda enfrentarse una madre gestante con deficiencia de ácido fólico, puede tener como consecuencia alguna o algunas de las malformaciones congénitas (Apéndice 1), que se enlistan a continuación⁸:

- Malformaciones del tubo neural (espinas bífidas, anencefalia, encefalocele).
- Malformaciones cardíacas congénitas (fundamentalmente de septo ventricular, enfermedad vascular y tetralogía de Fallot).
- Malformaciones congénitas renales y urinarias obstructivas.
- Malformaciones de los miembros.
- Estenosis hipertrófica congénita del píloro.
- Retardo de crecimiento intrauterino y productos prematuros.
- Síndrome de Down.
- Malformaciones orofaciales.

Se hará énfasis en la malformación del tubo neural debido a que es la enfermedad más común por deficiencia de ácido fólico durante el embarazo. Durante las cuatro primeras semanas de gestación del feto, se lleva a cabo la formación del tubo neural o neurulación, que finaliza en el momento que se produce el cierre del neuroporo caudal¹². Esto constituye la mayor parte de las anomalías congénitas del sistema nervioso central y derivan de la falla en el cierre del mismo.

Aunque la causa precisa de los defectos del tubo neural sigue siendo desconocida, hay evidencia de que muchos factores pueden afectar de forma

adversa al desarrollo del sistema nervioso central desde el momento de la concepción¹³, de ahí la importancia del consumo de ácido fólico durante la gestación y sobre todo durante las cuatro primeras semanas de la misma.

Las dos formas más comunes de defectos del tubo neural son, la espina bífida y la anencefalia, ambas malformaciones pueden evitarse con la ingesta recomendada diaria de ácido fólico durante el embarazo¹⁴.

Es importante destacar que el consumo de ácido fólico reduce principalmente el riesgo de malformaciones de la médula espinal en los niños¹⁵, así como de padecer una anemia macrocítica y megaloblástica². En estudios recientes se ha mencionado que el ácido fólico parece prevenir los ataques cardíacos, al reducir el nivel de homocisteína, agente químico que ataca las arterias y se acumula en la sangre de las personas que consumen mucha carne. El ácido fólico también protege contra el cáncer de pulmón, colon y de cuello del útero¹⁶.

El ácido fólico prácticamente no tiene efectos secundarios aunque se ingiera en cantidades altas; sin embargo, las personas que toman 15 mg diarios de esta vitamina, pueden presentar náuseas, edema, problemas para conciliar el sueño e irritabilidad.

Una dosis diaria superior a 400 µg podrá enmascarar los síntomas de la anemia perniciosa, una enfermedad potencialmente mortal producida por la carencia de la vitamina B₁₂. En términos generales, el consumo óptimo de ácido fólico se sitúa en torno a 400 µg diarios, cantidad que es posible obtener de la dieta, esto último es confirmado por el departamento de nutrición del

Instituto de Medicina de Estados Unidos de América, el cual recomienda ingesta diaria de ácido fólico según la etapa de la vida en que uno se encuentre^{16,17} (Tabla No.1).

| Edad | Hombres/Mujeres |
|----------------------|------------------------|
| µg/día | |
| 1 a 3 años | 150 |
| 4 a 8 años | 200 |
| 9 a 13 años | 300 |
| 14 a 18 años | 400 |
| 19 años o más | 400 |
| Embarazo | 600 |
| Lactancia | 500 |

Tabla No. 1: Ingesta diaria recomendada de ácido fólico en las etapas de vida¹⁷

El ácido fólico en los alimentos se encuentra en distintas formas pero solo una ellas es absorbida por el organismo (folipoliglutamato), a éste ácido fólico se le denomina equivalente de folato dietético o DFE por sus siglas en inglés.

Aunque el ácido fólico se encuentra en varios alimentos, se debe tener en cuenta que más del 50% de este nutriente puede ser destruido durante el proceso de manipulación, empaquetamiento o cocción. La mayor parte del ácido fólico de los alimentos es destruida por el calor o la luz¹⁶.

III- TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

a) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica.

Existen distintos tipos de HPLC como son la de fase normal la cual consiste en separar los analitos basándose en su polaridad, cromatografía de fase inversa que es la más común, consiste en usar una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar. La cromatografía de intercambio iónico está basada en la atracción entre iones del soluto y la carga complementaria de la fase estacionaria. Si los iones del soluto y la fase estacionaria tienen la misma carga, son excluidos. Por último existe la cromatografía de bioafinidad, la cual se basa en las propiedades de sustancias bio-activas para formar complejos estables, específicos y reversibles.

El equipo de HPLC consiste en bombas que tienen la función de proveer un flujo continuo del eluyente, los inyectores que permiten introducir las muestras, la columna que es la que contiene las fases, los tubos conectores, los cuales son lo que transportan las sustancias de columna a columna, los detectores de distintos tipos que permiten hacer un análisis de la muestra, termostato y medidor de presión que permiten mantener la temperatura y la presión de la columna¹⁸.

La cromatografía líquida de alta resolución es el método de referencia propuesto por la Administración de Alimentos y Drogas por sus siglas en inglés

(FDA) de Estados Unidos de América, para cuantificar el ácido fólico. Esta metodología consiste en utilizar una fase invertida a una temperatura de 18°C, con una fase móvil de acetonitrilo y un detector UV con arreglo de diodos. La metodología se calibra con un estándar de ácido fólico a las mismas condiciones antes mencionadas. El problema encontrado en este método es que el patrón de ácido fólico solo se mantiene estable por 30 días en solución tampón fosfato (pH 6.5) a temperatura de refrigeración (4°C) llevando así a tener errores posteriores, además de ser un método caro, y poco disponible en los laboratorios comunes³.

b) Radioinmunoensayo enzimático comercial de alta afinidad

El radioinmunoensayo se basa en la competencia que se establece, para unirse a una enzima específica entre la sustancia a cuantificar (ácido fólico) y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo radioactivo. Al establecerse esta competición resulta que a mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad de sustancia radiactiva que se une a la enzima y viceversa⁴.

Los resultados se obtienen al medir la radiactividad del ácido fólico marcado unido a la proteína de leche y del ácido fólico marcado libre mediante un contador de centelleo. Al centrifugar, el ácido fólico libre queda en solución y el ácido fólico unido a la proteína de leche forma agregados fácilmente precipitables. Una vez medida la radiactividad se construye una curva con los resultados obtenidos con cantidades conocidas de proteína de leche sin marcar y marcada. Esta técnica posee algunos inconvenientes que derivan de la necesidad de utilizar isótopos. Además de su peligrosidad y la obligatoriedad

de disponer de instalaciones adecuadas para su utilización, existen isótopos que tienen el inconveniente de su pronta caducidad⁵.

c) Titulación potenciométrica

Como su nombre lo indica esta técnica está basada en realizar una titulación monitoreada por un potenciómetro. En esta titulación se aprovechan las variaciones de una fuerza electromotriz inducida entre un electrodo indicador y uno de referencia, hasta detectar a diferentes intervalos durante el proceso de una valoración qué cantidades químicamente equivalentes de las dos han reaccionado (punto de equivalencia). En el caso específico del ácido fólico consiste en realizar una titulación con amoníaco, e ir monitoreando los cambios de potencial de la celda electroquímica cada vez que se agrega el amoníaco. Este método es de bajo costo, sencillo y de fácil automatización pero menos preciso y exacto que los dos anteriores debido a que no se presentan interferencias de otros compuestos en la titulación o en la cromatografía.⁶

IV- EL ÁCIDO FÓLICO Y LAS VERDURAS

Por lo general todas las verduras tienen un contenido específico de ácido fólico, además se sabe que las verduras con una pigmentación verde son las que tienen un contenido mayor de ácido fólico. De acuerdo a los datos reportados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de America⁷, las verduras que tienen un contenido mayor de ácido fólico son: espárrago, espinaca, brócoli, aguacate y elote, mientras que el betabel, zanahoria, jitomate, pepino y papa tienen un contenido menor. En los siguientes apartados se observará que el contenido de ácido fólico reportado

depende del tipo de tratamiento que tuvo la verdura, solo en dos ocasiones se pudo tener el dato en la verdura cruda.

A continuación se dará una breve monografía de las diez verduras que se analizarán.

1) Propiedades físicas-químicas, de cultivo y usos culinarios de las verduras

a) Aguacate

El aguacate (*Persea gratissima*) es la baya de una semilla, oval, de superficie lisa o rugosa, es de color verdoso y piel fina o gruesa; cuando está maduro, la pulpa tiene una consistencia como de mantequilla dura. Esta verdura es rica en proteínas y en grasas, con un contenido en aceite del 10 al 20%. El aguacate se obtiene del árbol de su mismo nombre, el cual es frondoso y de hoja perenne, tiene una floración muy generosa cuajando en un porcentaje muy alto de fruto. El árbol del aguacate es sensible al frío y a la humedad ambiental, por lo que se aconseja su establecimiento en regiones libres de heladas y de vientos calurosos y secos.

El aguacate es usado como complemento de todo tipo de comidas debido a su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales. De su rica materia grasa puede extraerse aceites que una vez procesados son utilizados en la Industria Cosmética y Farmacéutica¹⁹.

El contenido de ácido fólico de esta verdura según la USDA⁷ es de 88.19 microgramos por 100 gramos de aguacate de California y para el caso del

aguacate de Florida son 35.27 microgramos por 100 gramos de aguacate (Apéndice 2).

b) Betabel

El Betabel (*Beta vulgaris var conditiva*) está considerado como una hortaliza de raíz, aunque en realidad se trata de un "tallo engrosado bulboso", y constituye un órgano de almacenamiento, principalmente de azúcares y almidones.

El betabel es una planta de clima frío por lo cual tolera bien las heladas. Es sensible a suelos ácidos, aunque se desarrolla mejor en suelos neutros y alcalinos, prefiriendo un pH de 6.5 a 7.5, es altamente tolerante a la salinidad. En cuanto a textura, se desarrolla mejor en suelos ligeros (arenosos) ya que en suelos arcillosos se deforman "los bulbos"²⁰.

El consumo del betabel se hace de forma hervida para ensalada y de manera cruda en jugos principalmente.

El betabel en lata tiene 30 microgramos por 100 gramos de esta verdura según el USDA⁷(Apéndice 2).

c) Brócoli

El brócoli (*Brassica oleracea var itálica*) es una la planta recta, tiene de 60 a 90 cm de altura y termina en una masa de flores de color verde que puede alcanzar un diámetro hasta de 35 cm.

Es una hortaliza propia de climas fríos y frescos, puede tolerar heladas. Las temperaturas adecuadas para la germinación son de 5 a 28°C, llegando a

emerger a los 8 días. La temperatura óptima ambiental para su desarrollo es de 17°C, se desarrolla bien en cualquier tipo de suelo, prefiriendo los franco-arenosos, con buen contenido de materia orgánica; se clasifica como ligeramente tolerante a la acidez, siendo su rango de pH de 6 a 6.8 y medianamente tolerante a la salinidad.

El uso que se le da a esta verdura es sobre todo en ensaladas, como complemento de carnes, cocidos, sopas y ensaladas. Se comen las ramas tiernas, cocidas o semicocidas, tiene un sabor muy definido y es de textura suave²¹.

El brócoli tiene un contenido de ácido fólico de 62.5 microgramos por 100 gramos (Apéndice 2) de esta verdura⁷.

d) Elote

El elote o maíz (*Zea mays*) proviene de la planta que lleva el mismo nombre que es de porte robusto, de fácil desarrollo y producción anual.

El maíz requiere una temperatura de 25 a 30°C, así como bastante incidencia de luz solar, además es un cultivo exigente de agua en el orden de unos 5 mm al día. Se adapta muy bien a todos tipos de suelo, sin embargo en suelos con pH de 6 a 7, profundos y ricos en materia orgánica tiene un desarrollo mejor. El maíz “Grano Blanco” forma parte de la comida básica del mexicano, se utiliza principalmente para la elaboración de las tradicionales tortillas y tamales, así como para la obtención de aceite comestible. En la industria se utiliza

actualmente en la fabricación de barnices, pinturas, cauchos artificiales y jabones²².

El elote blanco cocido tiene un contenido de ácido fólico de 6.49 microgramos por 100 gramos de elote blanco⁷ (Apéndice 2).

e) Espárrago verde

El espárrago (*Asparagus officinalis*) es una planta herbácea perenne, está formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea constituida por raíces y yemas, lo que se denomina comúnmente “garra”.

Es una de las especies más sensibles a las oscilaciones térmicas, que se manifiesta por la inercia de sus movimientos vegetativos.

El espárrago es usado para elaborar ensaladas, sopas o como guarnición en comidas. Se pueden comer crudos, cocidos al vapor, hervidos, cocidos a la parrilla, asados o incorporados en comidas hechas en cazuelas o ensaladas. El tallo aéreo, grueso y carnoso es ideal para dietas que requieren baja presencia de sodio y alto contenido de vitaminas A, C y hierro. El espárrago es bajo en calorías y provee de una cantidad considerable de antioxidantes²³ como el ácido fólico el cual es de 95.83 microgramos por 100 gramos espárragos enlatados⁷ (Apéndice 2).

f) Espinaca

La espinaca (*Spinacia oleracea*) es una hortaliza de la familia de las *amarantáceas*, crece en el suelo con raíces pivotantes. Sus hojas son de color verde oscuro, con longitud variable²⁴.

La espinaca es una hortaliza que llega a soportar temperaturas bajas, es altamente perecedera y no mantiene su calidad por más de dos semanas.

Se consume de forma cruda o hervida, en sopas, ensaladas o como guarnición de platillos. Su riqueza en vitamina A, C y E y en antioxidantes como el ácido fólico le da un valor agregado a esta hortaliza²⁵. El contenido de ácido fólico es de 123.5 microgramos por 100 gramos de espinacas enlatadas⁷ (Apéndice 2).

g) Jitomate

El Jitomate o tomate rojo (*Lycopersicum esculentum*) es una fruta de forma generalmente redondeada y achatada a excepción de algunas variedades de fruto alargado, el tamaño es variable. El Jitomate, es de color verde al principio y rojo cuando madura, lo que se debe a una sustitución de clorofila en los cromoplastos de las células por carotenos.

Es una planta versátil que crece bien en casi todos los terrenos y climas. Su cultivo es preferible en terrenos neutros pH de 7, sueltos y bien drenados, con un contenido de caliza ideal para su desarrollo, la tierra rica en nutrientes y en especial el estiércol bien descompuesto favorece en engrosamiento de los frutos²⁶.

El contenido de ácido fólico en el jitomate es de 21.95 microgramos por 100 gramos de tomate (Apéndice 2)⁷.

El jitomate se usa principalmente en ensaladas, jugo fresco, y es utilizado versátilmente en la cocina típica mexicana. En la industria alimenticia se procesan los jitomates en infinidad de formas, desde jugos, purés, conservas y

en diversas salsas picantes o dulces, mermeladas, esencias para la elaboración de alimentos, saborizantes y otros productos²⁶.

h) Papa

La papa (*Solanum tuberosum*) es un tubérculo comestible que crece bajo el nivel de la tierra con raíces muy ramificadas. La papa es una especie cuya principal función fisiológica es almacenar o acumular gran cantidad de nutrientes en los tubérculos.

La planta de papa requiere de una humedad abundante, responde bien en temperaturas templadas y ambientes húmedos²⁷.

El contenido de ácido fólico es de 8.97 microgramos por 100 gramos de papa hervida (Apéndice 2)⁷.

Se utiliza generalmente en la gastronomía para la elaboración de guisos, ensaladas, purés, papas fritas y en la industria de frituras y para la elaboración de vodka, ya que para su elaboración requiere de grandes cantidades de almidón²⁷.

i) Pepino

El pepino (*Cucumis sativus*) es el fruto en baya, pertenece a la familia de las cucurbitáceas. Es una hortaliza de verano.

El pepino tiene un escaso valor calórico, que no llega a las 20 calorías por cada 100 gramos, debido a su composición de un 95% de agua, es rico en, vitamina E y aceites naturales, constituye uno de los mejores remedios para el cuidado

externo de la piel²⁸ además, su contenido de ácido fólico es de 6.98 microgramos por 100 gramos de pepino (Apéndice 2)⁷. Es usado para la elaboración de ensaladas se consume crudo.

j) Zanahoria

La zanahoria (*Daucus carota*) es una raíz vegetal, tradicionalmente naranja con una textura leñosa, presenta un tallo corto en el que se forman las flores, el sistema radicular tiene la función almacenadora, y también presenta numerosas raíces secundarias que sirven como órganos de absorción. Es una planta bastante rústica, aunque tiene preferencia por los climas templados²⁹. La zanahoria tiene 19.4 microgramos de ácido fólico por 100 gramos de zanahoria (Apéndice 2)⁷.

La zanahoria se consume fresca o hervida, se usa en la elaboración de ensaladas, jugos, guisos²⁹.

2) Producción en México

En nuestro país se producen las diez verduras que se analizaran en este trabajo, lo cual permite tener estadísticas de su producción a nivel estatal y a nivel nacional. Se observara que la verdura con mayor producción a nivel nacional es el jitomate el cual se produce en su mayoría en el estado de Sinaloa y la verdura con menor producción nacional es la espinaca en Puebla.

a) Producción nacional

La producción de verduras motivo de esta investigación, es variable de una verdura a otra, según las estadísticas del Servicio de Información

Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SIAP SAGARPA)³⁰. Como se muestra en la gráfica No.1. La verdura con mayor producción anual en el 2007 en México fue el jitomate (tomate rojo) con una producción de 2,425,402.77 toneladas y la que tuvo una producción menor fue la espinaca con una producción de 13,937.25 toneladas. Esto último se puede observar en la gráfica de producción informada o reportada a continuación.

Producción 2007 de verduras estudiadas dentro de la República Mexicana

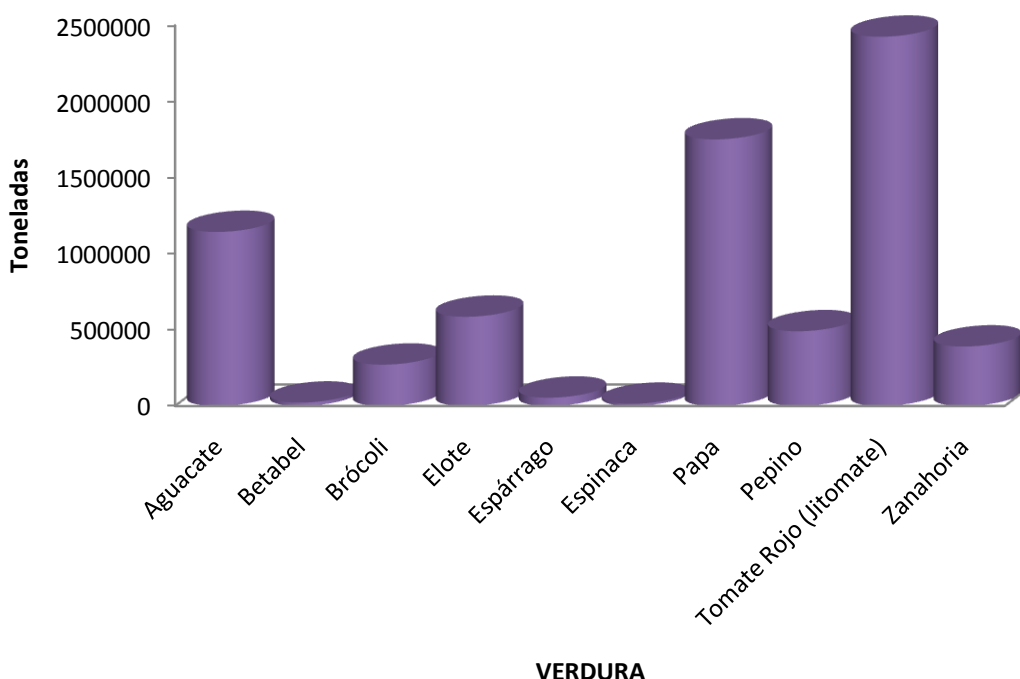


Gráfico No. 1: Producción 2007 de verduras en la República Mexicana. SIAP SAGARPA 2007³⁰

Es importante señalar que la producción del jitomate, aguacate y papa son elevadas en comparación con las otras verduras porque estas tres verduras

forman parte de la alimentación base del mexicano y por ello se requiere una producción mayor para cubrir las necesidades del país.

Uno de los factores importantes en la producción de las verduras es el costo que tienen en el mercado, de acuerdo con los datos de la *SIAP SAGARPA* el valor de la producción 2007 de verduras en la República Mexicana, representado en miles de pesos en la gráfica No. 2, muestra también que el jitomate, la papa y el aguacate son las verduras por las que los agricultores obtuvieron un mejor ingreso.

Valor de producción 2007 de verduras estudiadas en la República Mexicana

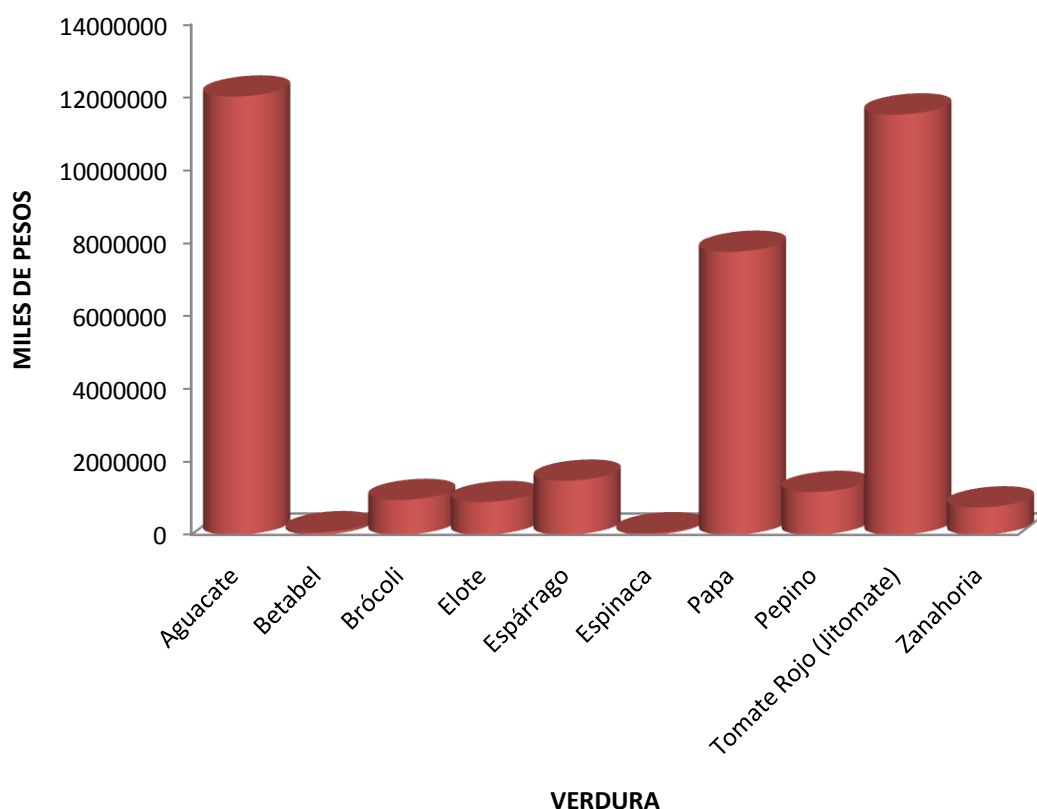


Gráfico No. 2: Valor la Producción 2007 de verduras en la República Mexicana. *SIAP SAGARPA 2007*³⁰

Precio por tonelada de verdura del 2007 en la República Mexicana.

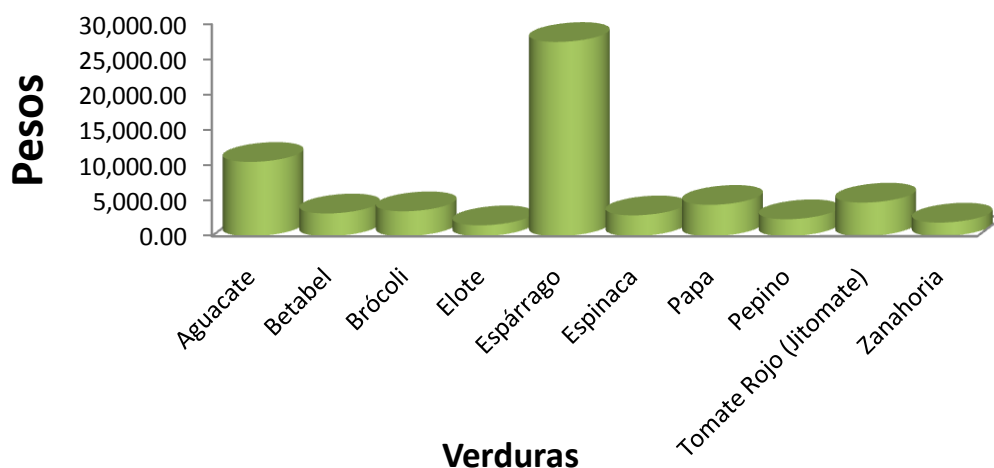


Gráfico No. 3: Precio por tonelada de verdura del 2007 en la República Mexicana. SIAP SAGARPA 2007³⁰

Las diferencias que se dan entre el valor de producción y la producción están estrechamente relacionadas con el precio de venta porque aún cuando el aguacate tiene una producción menor que la del jitomate, aporta mayor dinero puesto que tiene un valor más elevado. El costo por tonelada en el caso del aguacate es de 10,516.63 pesos mientras que el jitomate tiene un costo de 4,752.89 pesos³⁰ (Gráfico 3). El espárrago es la verdura que aporta la mayor cantidad de dinero por tonelada (27, 501.49 pesos), pero también es una verdura que tiene una producción muy baja, pero por su alto precio por tonelada es elevado de ahí la importancia del precio por tonelada de cada una de las verduras. El resto de las verduras tienen una aportación mínima a comparación de estas tres verduras.

b) Distribución de la Producción Estatal del Grupo de Verduras.

La variedad de tipo de suelos y climas son determinantes en la producción de estas diez verduras, en la República Mexicana, cada estado se especializa en el cultivo de algunas de estas verduras o bien su producción es mayor para alguna de ellas.

Estas producciones son distribuidas al interior del país e incluso exportadas. En la tabla 1 se muestran los estados que tiene la mayor producción a nivel nacional de cada una de las verduras representadas por la cantidad de toneladas distribuidas. Los datos mostrados hacen referencia al año 2007, debido que son las últimas estadísticas que proporcionadas por la SIAP SAGARPA³⁰.

| Verdura | Estado con mayor producción | Toneladas producidas |
|------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Aguacate | Michoacán | 1,006,059.00 |
| Betabel | Puebla | 7,510.05 |
| Brócoli | Guanajuato | 155,148.90 |
| Elote | Puebla | 135,506.50 |
| Espárrago | Guanajuato | 14,745.65 |
| Espinaca | Puebla | 3,745.00 |
| Papa | Sinaloa | 358,989.70 |
| Pepino | Sinaloa | 212,895.00 |
| Tomate Rojo (Jitomate) | Sinaloa | 827,010.94 |
| Zanahoria | Zacatecas | 102,828.00 |

Tabla No. 2: Estados de la República de mayor producción de verdura³⁰

Como se muestra en la tabla No. 2, los estados de Sinaloa, Puebla y Guanajuato son los que tienen la mayor producción de dos o tres verduras. En el caso del aguacate, el estado de Michoacán tiene una producción considerable de esta verdura, puesto que es el único que supera el millón de toneladas de producción.

V- ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA

1) Generalidades de espectroscopía

El principio de la espectroscopia ultravioleta es la absorción de radiación ultravioleta por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, llevando la liberación del exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) de la región comprende entre 190 y 400 nm.

La luz ultravioleta es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas absorbiendo energía, en la región del visible así como en el ultravioleta, como es el caso del β -caroteno^{29,30}.

Las ventajas de la espectrofotometría ultravioleta sobre otros métodos analíticos de laboratorio son: rapidez, precisión, versatilidad, fácil de usar y eficiente en costo³².

2) Ley de Beer-Lambert

La absorbencia se define como la proporción de luz incidente³³, está última es directamente proporcional a la longitud de la trayectoria a través de un medio (paso óptico) y la concentración de la especie absorbente. Esta relación se representa con la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación No. 1: } A = \varepsilon l C$$

Donde:

ε : absorptividad molar en $\text{moles}^{-1}\text{L cm}^{-1}$

l : paso óptico en cm

c : concentración de la especie absorbente moles/L ³³

En esta ley se basaran todos los cálculos para la cuantificación de ácido fólico en las verduras, debido a que existe una relación estrecha entre la absorbencia (variable que se estará midiendo en el espectrofotómetro) y la concentración (variable que se busca).

VI- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS

La validación de un método es un proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

En el caso de la metodología a desarrollar su parámetro de desempeño es el contenido y la valoración del ácido fólico, los datos necesarios para poder llevar a cabo la validación del método son:

- Precisión del sistema: parámetro en el cual se establece que el sistema, en este caso ácido fólico estándar y espectrofotómetro, permiten obtener un mismo resultado en distintas mediciones realizadas.

- Linealidad del sistema: habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemáticamente definida son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado.
- Exactitud y repetibilidad del método: habilidad que permite medir un valor cercano al valor de la magnitud real y que este dato sea repetido en distintas ocasiones.
- Precisión del método: parámetro en el cual se establece que el método, en este caso ácido fólico en verduras y el espectrofotómetro, permiten obtener un mismo resultado en distintas mediciones realizadas.³⁴.

Al tener todos los datos anteriores dentro del intervalo establecido en la Guía de Validación de métodos analíticos³⁴ (Tabla No. 3) se dará por validada la metodología implementada.

| Dato para validación | Intervalo de aceptación |
|---|--------------------------------|
| Precisión del sistema | CV≤3% |
| Linealidad del Sistema | r ² ≥98% |
| Exactitud y Repetibilidad del método | %recobro: 97-103% |
| Precisión del método | CV≤3% |

Tabla No. 3: Intervalos de aceptación de los parámetros de evaluación para la validación de un método³⁴

Los criterios de aceptación mostrados en la tabla anterior se han elegido debido a que en estudios anteriores se ha visto que en estos intervalos de aceptación no se encuentran grandes variaciones para la determinación de compuestos en general.

Capítulo **III**

Metodología

I- FORMACIÓN DEL FOLATO

La cuantificación del ácido fólico se hará de manera indirecta debido a la sensibilidad del compuesto y así poder evitar problemas. El ácido fólico se pondrá en presencia de hidróxido de sodio para llevar a cabo la formación del folato, como se muestra a continuación:

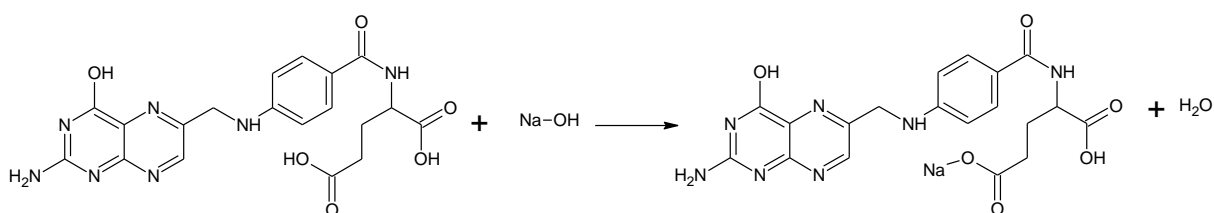


Figura No. 3: Formación de la sal del ácido fólico

La formación de la sal del ácido fólico es fundamental debido a que el ácido fólico en agua es inestable y poco soluble mientras que al formar la sal se está estabilizando el compuesto, haciéndolo soluble y no sensible a la luz.

II- FUNDAMENTO DE LA METODOLOGÍA

El fundamento del método, consiste en la formación del folato a partir del ácido fólico nativo de la verdura, con hidróxido de sodio. El folato así como el ácido fólico presentan un máximo de absorción en la zona del ultravioleta, lo que hace posible su determinación espectrofotométrica. La formación del folato es de suma importancia debido a la inestabilidad del ácido fólico, dificultando así su determinación espectrofotométrica.

III- MUESTRAS

Las muestras fueron compradas en el mercado sobre ruedas de los días sábados de la colonia Prados del Rosario. A continuación se indica la verdura, su variedad en caso de haber distintas.

- Aguacate Hass
- Betabel Rojo
- Brócoli Italiano
- Elote Blanco de grano chico
- Espárrago Verde
- Espinaca de Hoja Lisa
- Jitomate Saladet
- Papa Blanca Alpha
- Pepino Largo tipo Holandés
- Zanahoria Ardentia Parade

IV- REACTIVO DE IMPORTANCIA

Ácido fólico para fines bioquímicos MERK®

- 98% de pureza
- Índice de azufre: 0.1%

V- EQUIPO DE IMPORTANCIA

Espectrofotómetro UV-Visible. SPECTROPHOTOMETER 2800 UV/Visible. Cole Parmer® con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico

La descripción del material y del resto del equipo se encuentra en el apéndice 3.

VI- DESARROLLO EXPERIMENTAL

La determinación de ácido fólico en las verduras se llevó dos etapas:

- la determinación de las características espectrofotométricas del folato así como del método a desarrollar y
- la determinación de ácido fólico en las verduras. Antes de llevar a cabo la determinación se acondicionaron las verduras.

Estas dos etapas así como los pasos que las constituyen se muestran en los siguientes diagramas de bloques de la figura No. 4, 5 y 6.

1) Determinación de las características espectrofotométricas del ion folato

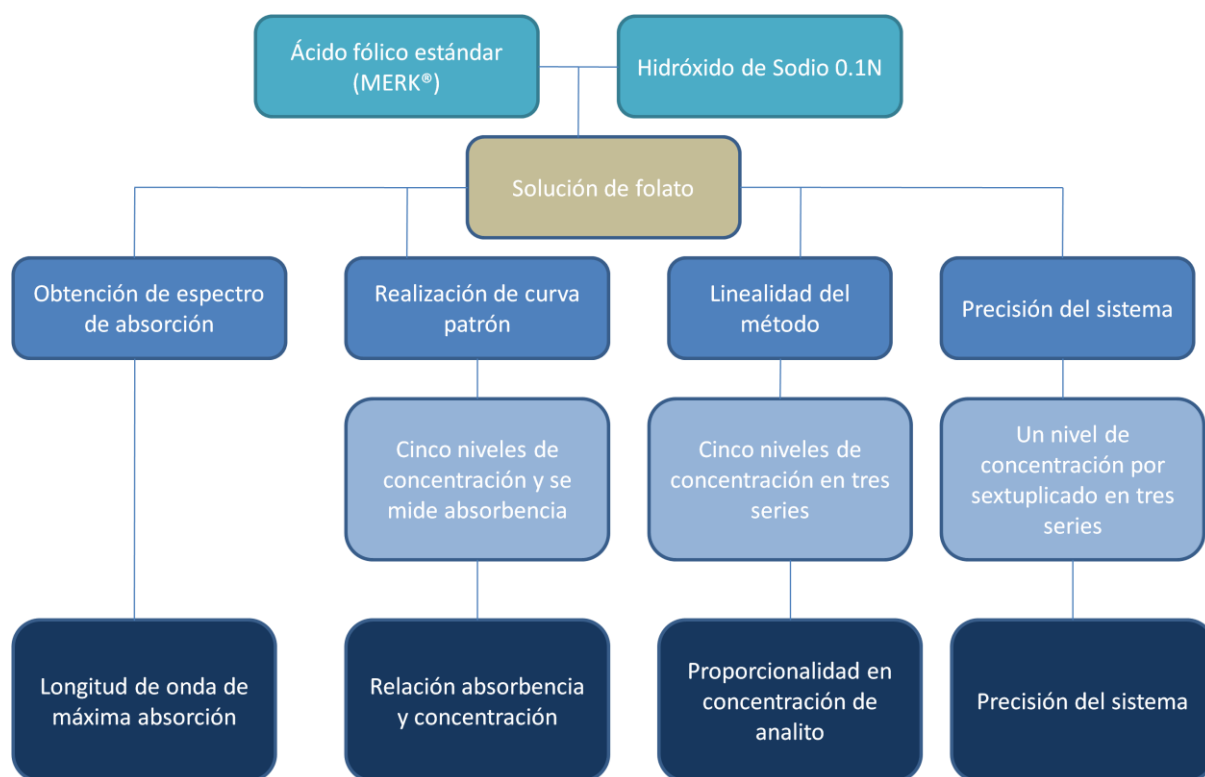


Figura No. 4: Caracterización analítica del ácido fólico

La determinación de las características espectrofotométricas del ion folato, se dividió en cuatro etapas, como ya se observó en el diagrama de bloques (Figura No. 4).

a) Espectro de absorción

En la primera etapa se obtuvo un espectro de absorción del folato, con la finalidad de conocer la longitud de onda en la que se absorbe el compuesto. Para llevar a cabo esta parte experimental se pesaron 0.003 gramos de ácido fólico y se aforaron con hidróxido de sodio 0.1M a 10 mL. Posteriormente se corrió el espectro del ion folato formado en el espectrofotómetro, se capturaron los datos en el software Excel® y se estableció la longitud de onda de máxima absorción.

b) Gráfico de calibración del ion folato

El gráfico de calibración del ion folato se hizo tomando cinco niveles de concentración cada nivel correspondiente a una absorbancia definida (1, 0.8, 0.6, 0.4, y 0.2).

Para realizar cada nivel de concentración se hizo la dilución correspondiente partiendo de una solución de concentración de $6.8 \times 10^{-5}M$, posteriormente se leyó en el espectrofotómetro y se graficó en Excel®.

c) Linealidad del sistema

Como penúltima etapa de esta sección se procedió a determinar la linealidad, ésta es una habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemáticamente definida son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado de absorbencias³⁴. En otras palabras permite saber si el método utilizado es el adecuado para la

cuantificación del compuesto en cuanto a repetibilidad de datos (absorbencia y concentración).

Para establecer la linealidad del método se prepararon tres series de 5 muestras con distintas concentraciones (17.64, 23.52, 29.40, 35.28 y 41.16 $\mu\text{g/mL}$) y así se determinaron las absorbencias. Los distintos niveles de concentración se prepararon a partir de una disolución madre de folato cuya concentración fue 98 $\mu\text{g/mL}$. Esta última disolución se preparó pesando 0.005 gramos de ácido fólico estándar y se aforo a 50 mL. Los distintos niveles de concentración se prepararon tomando una alícuota de la disolución madre con propipeta y aforando a 5mL. La tabla 3 muestra las concentraciones de ácido fólico por mililitro de hidróxido de sodio y la alícuota necesaria de disolución madre para la preparación del nivel de concentración correspondiente:

| Nivel de concentración | Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Alícuota de solución madre (mL) |
|-------------------------------|--|--|
| 1 | 17.64 | 0.9 |
| 2 | 23.52 | 1.2 |
| 3 | 29.40 | 1.5 |
| 4 | 35.28 | 1.8 |
| 5 | 41.16 | 2.1 |

Tabla 4: Datos para la elaboración de los niveles de concentración

Cada una de las concentraciones mostradas en la tabla 4, se calcularon considerando la pureza del ácido fólico estándar. (Apéndice 4)

Una vez listas las tres series se midió la absorbencia de cada nivel de concentración en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 295 nm y se capturaron los datos en Excel®.

d) Precisión del sistema

En la última etapa se realizó el estudio de precisión del sistema, para la realización de esta etapa se prepararon tres series, cada una compuesta por cinco muestras de la misma concentración se consideró, el nivel de concentración 3, correspondiente a 29.40 µg/mL. La preparación de las disoluciones se hizo de la misma manera que en el apartado de linealidad, es decir tomando una alícuota de 1.5 mL de una disolución madre de 98 µg/mL y aforando a un volumen de 5 mL. Se midieron las absorbencias de las tres series a 295 nm.

Los datos que se obtuvieron, permitieron determinar si el método que se estaba realizando era preciso para la cuantificación del ácido fólico. Con esta prueba se finalizó el estudio en cuanto a las características del folato y del método para poder llevar a cabo las determinaciones en las muestras de alimentos, en este caso las diez verduras seleccionadas.

2) Preparación de las muestras

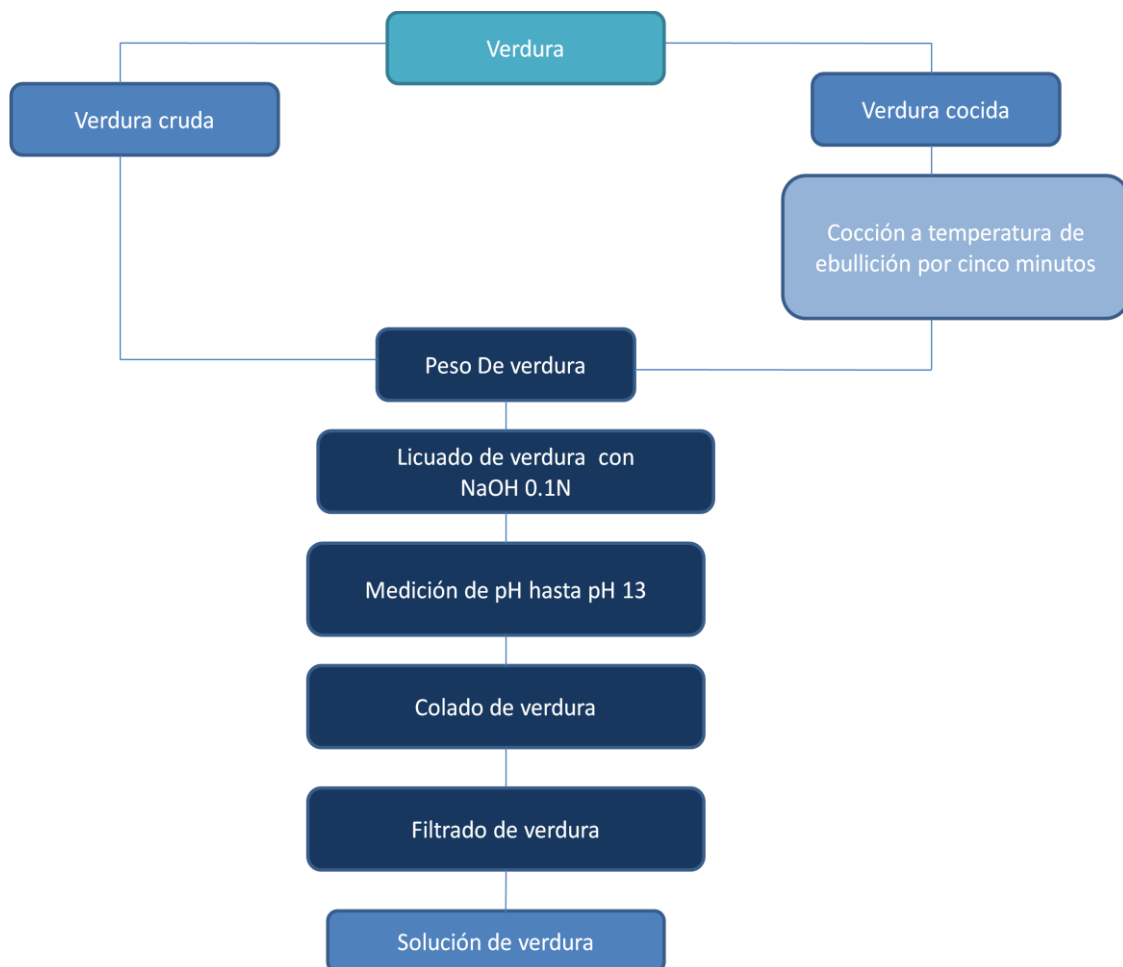


Figura No. 5: Acondicionamiento de las verduras

Las diez verduras analizadas se compraron en el mercado sobre ruedas del Rosario en el Distrito Federal. Las verduras se compraban el sábado correspondiente a la semana de trabajo de la verdura. Se conservaron en un recipiente cubierto de aluminio en refrigeración hasta el momento de su análisis.

En el caso de las verduras que se analizaron cocidas, se introdujeron en agua hirviendo durante cinco minutos, considerando que la temperatura de ebullición es una temperatura constante y se evitarían variaciones en la cocción.

La preparación de la muestra fue la misma en los diez casos de verduras. Se tomó una porción de verdura considerable, con excepción de la zanahoria, que se tomó entera debido a la complejidad de ésta. En todos los casos, se pesó la porción de verdura y se licuó con hidróxido de sodio. Posteriormente se llevó la mezcla a un pH de 13, debido a que a este pH se puede garantizar la presencia del ácido fólico en forma de folato, así como el control para que no se den cambios en el contenido del elemento a analizar. Se midió el volumen final de solución de verdura.

Posteriormente se coló y filtró la disolución de la muestra para evitar la interferencia de partículas grandes de verdura en la medición en el espectrofotómetro. Finalmente se realizó la determinación del folato en las verduras.

3) Determinación de ácido fólico en verduras crudas y cocidas



Figura No.6: Determinación de ácido fólico en verduras

La determinación de folato en verduras se hizo por triplicado, en dos etapas; la primera consistió en correr muestras de verduras para obtener un contenido aproximado de ácido fólico. Realizando tres series con cinco muestras cada una.

La preparación de la disolución se hizo tomando una alícuota de la solución de verdura y posteriormente aforándola a 10 mL. La alícuota de solución de verdura varió de una verdura a otra puesto que el contenido de ácido fólico es distinto entre las verduras. Posteriormente se midió la absorbencia de las muestras a 295 nm.

La segunda etapa, consistió realizar la exactitud y repetibilidad, buscando obtener un porcentaje de recobro incluido entre 97 y 103%, para poder establecer la cantidad de ácido fólico en las verduras. En este estado de la experimentación se consideró el nivel de concentración 4 de ácido fólico, correspondiente a 29.40 $\mu\text{g/mL}$, nivel equivalente a un 100% de ácido fólico referente a la concentración inicial de $6.8 \times 10^{-5}\text{M}$. Se prepararon tres series cada una compuesta por seis disoluciones. Para llevar a cabo la preparación de las disoluciones se tomó la cantidad de disolución de verdura correspondiente a 14.7 μg de ácido fólico y 14.7 μg de ácido fólico estándar y se aforó a 5 mL. En el caso de las verduras en las cuales se superaron los 5 mL de disolución de verdura se hizo un ajuste en el volumen de aforo y por lo tanto de la cantidad de ácido fólico estándar. Se midió la absorbencia a 295nm en el espectrofotómetro.

En esta etapa se buscaba obtener una absorbencia similar a la obtenida en linealidad y en consecuencia un porcentaje de recobro entre el 97 y 103% para poder validar el método espectrofotométrico para cuantificación de ácido fólico en verduras. Las formulas utilizadas para realizar los cálculos en cada una de las etapas se muestran en el Apéndice 4.

La precisión del método se realizó de la misma manera que en la determinación de las características del ion folato en el apartado de precisión del sistema.

Capítulo **IV**

Resultados

Y

Discusión

I- ANALISIS PREVIOS DE ESTABILIDAD DEL ÁCIDO FÓLICO

En una primera instancia se deseó trabajar el ácido fólico disuelto en agua pero se encontró que su solubilidad era mínima además de tener variaciones en las determinaciones debidas a la solubilidad y la sensibilidad del compuesto a la luz y al calor. Las variaciones encontradas al usar agua como disolvente se vieron al querer realizar una curva patrón (Gráfico 4).

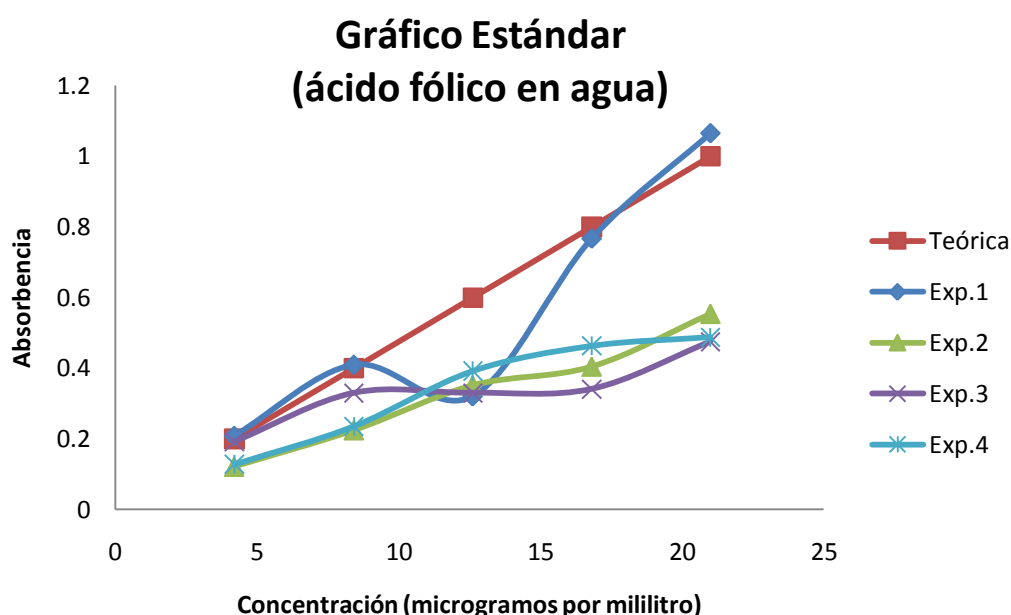


Gráfico No. 4: Gráfico Estándar del ácido fólico en agua

En el gráfico 4 se observa claramente la existencia de variaciones entre una curva y otra, mostrando la inestabilidad del compuesto en agua. El ácido fólico al encontrarse en agua presenta una solubilidad mínima y además al ser un compuesto sensible a la luz, la solución al ser usada en distintas ocasiones provoco que el ácido fólico como tal perdiera su estructura. En cuanto a la temperatura, la solución se mantuvo a temperatura de refrigeración, para así evitar al cambio en el ácido fólico debido a su característica de sensibilidad a la

temperatura. Al tener variaciones importantes en cuanto a la estabilidad del compuesto se decidió cambiar de disolvente a hidróxido de sodio. Al usar hidróxido de sodio se está permitiendo la formación de la sal del ácido fólico, el folato, siendo éste estable para las determinaciones necesarias.

II- CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO FÓLICO

En la primera etapa de la caracterización del ácido fólico se obtuvo un espectro de absorción para así conocer su máximo de absorción. En el espectro de absorción, gráfica No. 5, se observa claramente que el máximo de absorción se encuentra a una longitud de onda de 295 nm, esta longitud de onda es confirmada en la literatura¹⁰. La longitud de onda de máxima absorción permitió realizar las cuantificaciones posteriores, linealidad, precisión así como las determinaciones del ácido fólico en todas las verduras, debido a que ésta, es la longitud de onda específica para el ion folato.

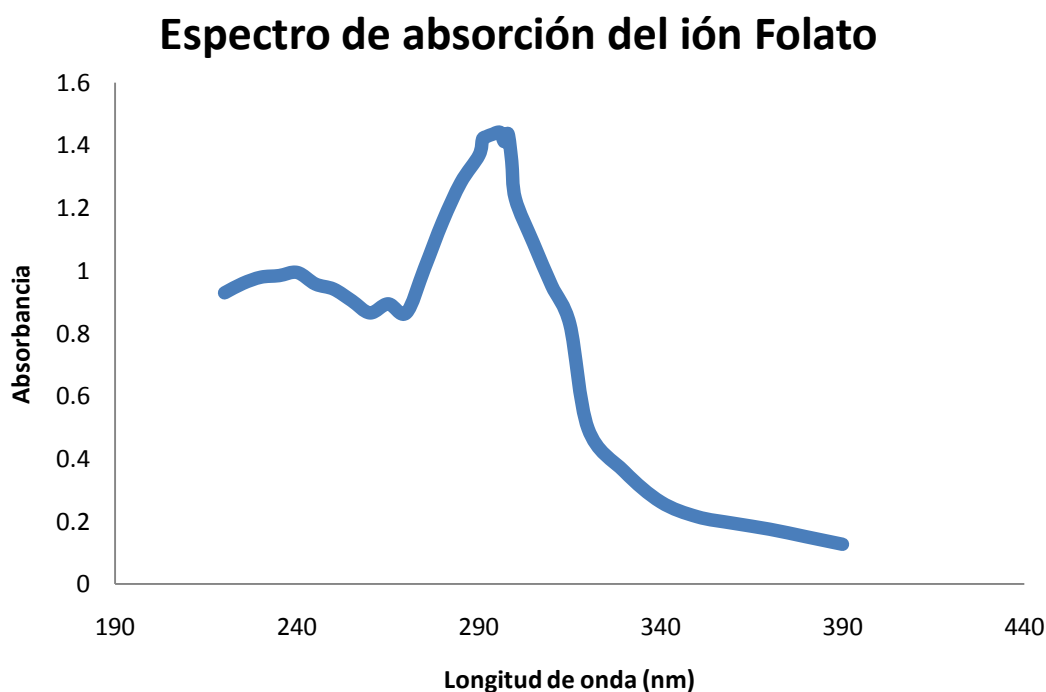


Gráfico No. 5: Espectro de absorción del ion folato

Una vez determinada la longitud de onda para la cuantificación del ácido fólico se realizó un gráfico de calibración, para tener así una relación entre concentraciones de ácido fólico y absorbencias. De la curva de calibración (Gráfico No.6) se obtuvo una ecuación de recta, dando así la relación de ácido fólico con absorbencia con un porcentaje de coeficiente de correlación de 99.87% indicando que los datos son lineales y que la relación entre concentración y absorbencia se puede aplicar.

Gráfico Estándar

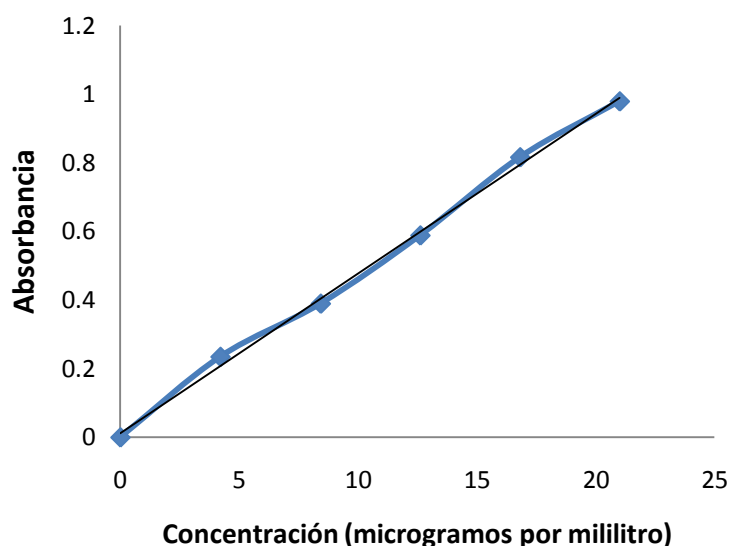


Gráfico No. 6: Gráfico Estándar del folato

La ecuación de recta que se obtuvo fue:

$$\text{Ecuación No. 2: } \textit{Absorbencia} = 0.04654 \textit{ concentración} + 0.01244$$

Despejando en la ecuación No. 2, la concentración tenemos:

$$\textit{Concentración} = \frac{\textit{Absorbencia} - 0.01244}{0.04654}$$

El siguiente paso fue la determinación de linealidad del método, se obtuvieron cuatro rectas en las cuales se relacionan los distintos niveles de concentración (23.52, 29.40, 35.28 y 41.16 $\mu\text{g/mL}$) y las absorbencias obtenidas (Gráfico 7).

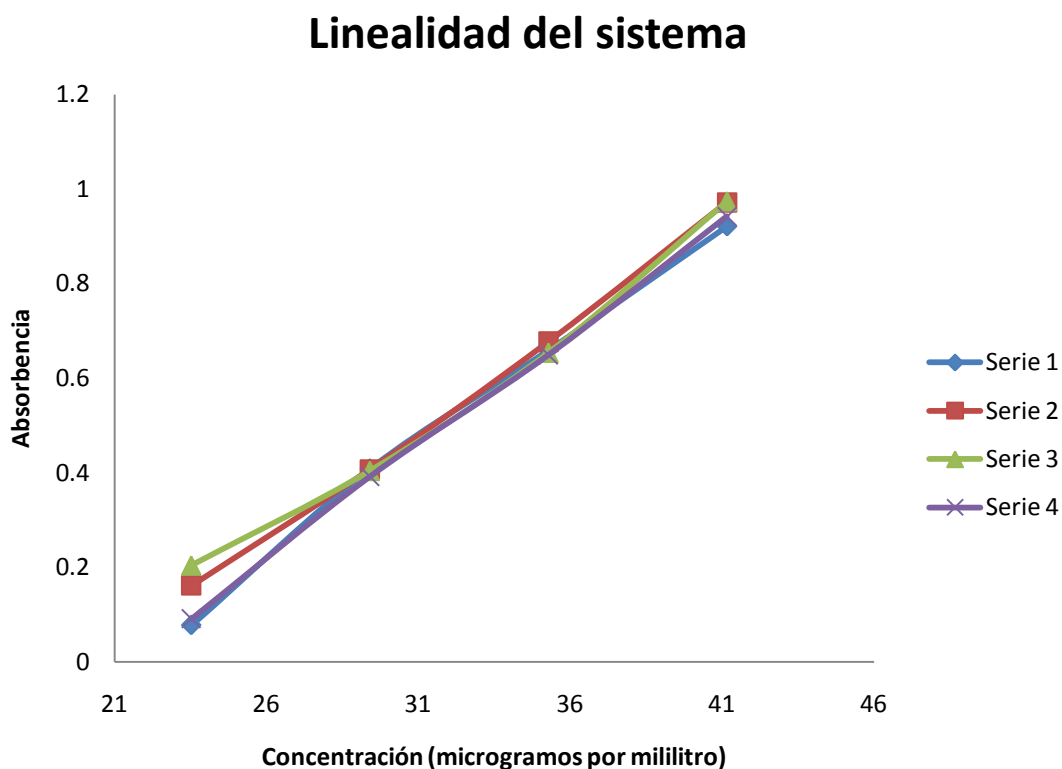


Gráfico No. 7: Curvas de linealidad del sistema

De las rectas del gráfico No. 7, se obtuvieron las ecuaciones de éstas las cuales son relacionadas con la ley de Beer-Lambert, permitiendo tener una relación estrecha entre la absorbencia medida por el espectro de absorción y la concentración de ácido fólico en la muestra. En la tabla No. 5 se muestran las ecuaciones de rectas obtenidas en cada determinación de linealidad (Gráfico No. 7):

| Serie | Pendiente | Ordenada al origen | Coefficiente de correlación |
|----------|-----------|--------------------|-----------------------------|
| 1 | 0.04733 | -1.0144 | 0.9979 |
| 2 | 0.04597 | -0.9324 | 0.9992 |
| 3 | 0.04354 | -0.849 | 0.9945 |
| 4 | 0.04779 | -1.027 | 0.9997 |
| Promedio | 0.04616 | -0.9550 | 0.9978 |

Tabla No. 5: Ecuaciones de recta de linealidad

De las cuatro rectas que se obtuvieron se obtuvo un promedio en el cual el coeficiente de correlación es de 99.78%, siendo el intervalo de aceptación superior al 98%, esto último indicando que los datos son reproducibles, lo cual se buscaba mediante el análisis de la linealidad del sistema. Al tener un coeficiente de correlación superior al intervalo establecido nos permite asegurar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración de ácido fólico.

Correlacionando la ley de Beer-Lambert con los datos anteriores se tiene que:

$$\text{Ecuación No. 3: } \textit{Absorbencia} = \textit{Concentración} \cdot \epsilon \cdot l$$

Como l es igual a 1 y, entonces ϵ corresponde a la pendiente de la ecuación, y en la ecuación de Beer-Lambert. Por lo cual se tiene la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación No. 4: } \textit{Absorbencia} = 0.04616 \textit{ Concentración} - 0.9550$$

La ecuación No. 4, va a servir en la determinación del contenido de ácido fólico en las verduras, debido a que se tiene ya una relación directa de absorbencia (variable que se midió en cada verdura) y concentración (variable desconocida) ahí, la importancia de la linealidad en el desarrollo de este método.

De la linealidad se tomó el dato representativo de la concentración de 29.40 µg/mL de concentración, nivel de concentración equivalente a un 100% en base a una concentración de 6.5×10^{-5} M, corresponde a una absorbencia de 1.422. Con los datos anteriores se hizo el estudio de precisión del sistema, en el cual se obtuvo un porcentaje reproducibilidad de 98.73% de la absorbencia antes mencionada y tiene un coeficiente de variación del 2.8%, estos porcentajes indican que el método es repetible, ya que se considera un intervalo de 97 a 103% de reproducibilidad para métodos espectrofotométricos y un coeficiente de variación inferior al 3% (Tabla No.3)³⁴.

II- DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN VERDURAS

1) Aguacate

En la cuantificación del ácido fólico en el aguacate crudo se obtuvo una concentración promedio de las tres series realizadas de 233.766 microgramos en 100 gramos de muestra con una desviación estándar de 0.247 y un coeficiente de variación de 0.1056%. En el caso del aguacate cocido, se coció esta verdura para evaluar la tendencia del contenido de ácido fólico al cocer la verdura, se obtuvo una concentración promedio de las tres series realizadas, de 21.1334 microgramos en 100 gramos de muestra con una desviación estándar de 0.627 y un coeficiente de variación de 2.97%. Se puede observar que hay una disminución considerable en la cantidad de ácido fólico cuando el aguacate es cocido. Al cocer el aguacate hay una pérdida de 90.96 % del contenido de ácido fólico, indicando que la cocción afecta el contenido de ácido fólico, debido a que el ácido fólico es una vitamina termolábil, es decir sensible a las temperaturas altas y llevando así a tener hidrólisis de la vitamina. Al

considerar los dos resultados en cuanto al coeficiente de variación estos entran dentro del intervalo establecido para métodos espectrofotométricos que debe de ser inferior al 3%, indicando que no existe una dispersión importante entre los datos obtenidos y la media aritmética de los datos.

En la precisión del método se obtuvo un coeficiente de variación de 0.15093%, el cual es inferior al 3% establecido. En la exactitud y repetibilidad se obtuvo un porcentaje de recobro para el aguacate de 97.64% lo cual es totalmente aceptable puesto que se encuentra en el intervalo permitido que es de 97 al 103% para métodos espectrofotométricos.

La metodología basada en una técnica espectrofotométrica desarrollada fue validada al tener todos los parámetros (linealidad, precisión y porcentaje de recobro) dentro de los intervalos establecidos³¹.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 233.5 | 1.3295 | 93.50 |
| | 2 | 234.032 | 1.3295 | 93.50 |
| | 3 | 233.776 | 1.3305 | 93.57 |
| Cocida | 1 | 21.1952 | | |
| | 2 | 21.7583 | | |
| | 3 | 20.4472 | | |

Tabla No 6: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en aguacate

2) Betabel

El betabel tiene 372.63 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de betabel, con una desviación estándar de 0.357 y un coeficiente de variación de 0.09% esto cuando la verdura no ha sido procesada. Cuando el betabel ha sido cocido tiene una concentración de ácido fólico de 70.678% con una desviación estándar de 1.612. y un coeficiente de variación de 2.28%. Al cocer el betabel hay una pérdida del 81.03% de ácido fólico.

En los dos casos, en el betabel cocido y en el betabel crudo los coeficientes de variación entran dentro del intervalo aceptable que debe de ser inferior de 3%, indicando que entre los datos la variación no afecta los datos obtenidos.

En cuanto a la precisión del método se obtuvo un coeficiente de variación de 0.2283%, el cual es inferior al 3% establecido. El porcentaje de recobro obtenido en la evaluación de la exactitud y la repetibilidad del método fue de 98.11%. El porcentaje de recobro entra perfectamente en el intervalo establecido en el caso anterior por lo cual se puede decir que el método espectrofotométrico fue validado para la cuantificación de ácido fólico en betabel.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (μg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 373.06 | 1.394 | 98.02 |
| | 2 | 372.53 | 1.395 | 98.11 |
| | 3 | 372.374 | 1.397 | 98.21 |
| Cocida | 1 | 70.203 | | |
| | 2 | 69.165 | | |
| | 3 | 72.339 | | |

Tabla No 7: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en betabel

3) Brócoli

El brócoli tiene 157.48 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de brócoli, con una desviación estándar de 0.550 y un coeficiente de variación de 0.349%. Al cocer el brócoli este presenta una disminución de un 83.29% en el contenido de ácido fólico representando que tiene 26.317 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de brócoli cocido. En esta determinación se tuvo una desviación estándar de 0.529 y un coeficiente de variación de 2.01%.

Los coeficientes de variación obtenidos en los dos casos para el brócoli son inferiores al 3% indicando que la diferencia entre la media aritmética y los datos es casi nula, y entra dentro del intervalo aceptable para la validación del método.

El porcentaje de recobro obtenido en la evaluación de la exactitud y repetibilidad del método fue de 98.31. El porcentaje de recobro es adecuado

además el coeficiente de variación para el análisis de precisión fue de 0.06308%, dato que es inferior al 3% establecido por la guía de validación de métodos analíticos³⁴. Una vez más el método espectrofotométrico fue validado para la cuantificación de ácido fólico en brócoli.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 158.1 | 1.3981 | 98.32 |
| | 2 | 157.26 | 1.3980 | 98.31 |
| | 3 | 157.067 | 1.3978 | 98.30 |
| Cocida | 1 | 26.617 | | |
| | 2 | 26.621 | | |
| | 3 | 25.713 | | |

Tabla No 8: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en brócoli

4) Elote

De la determinación de ácido fólico se obtuvo que el elote tiene 214.7563 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de éste con una desviación estándar de 0.316 y un coeficiente de variación de 0.147%. En el elote cocido se tuvo un contenido de 93.725 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de elote cocido con una desviación estándar de 0.566 y un coeficiente de variación de 0.604%. La disminución de ácido fólico en el elote al ser cocido representa un 56.36%.

Los coeficientes de variación en los dos casos estudiados para el elote son inferiores al 3% establecido para métodos espectrofotométricos para poder validar el método y se considere como un método reproducible.

El porcentaje de recobro obtenido en la evaluación de la exactitud y repetibilidad del método fue de 97.99%, y en el estudio de precisión el coeficiente de variación fue de 0.14%. Estos últimos datos permitiendo validar el método espectrofotométrico para la cuantificación de ácido fólico en dicha verdura.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 214.389 | 1.391 | 97.84 |
| | 2 | 214.927 | 1.395 | 98.08 |
| | 3 | 214.953 | 1.394 | 98.05 |
| Cocida | 1 | 94.307 | | |
| | 2 | 93.691 | | |
| | 3 | 93.177 | | |

Tabla No 9: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en elote

5) Espárrago

En este caso se obtuvo un contenido de ácido fólico de 96.4076 microgramos en 100 gramos de espárrago crudo con 0.4874 de desviación estándar y un coeficiente de variación de 0.5056% .En el caso del espárrago cocido este tuvo un contenido de ácido fólico de 50.934 microgramos en 100 gramos de

espárrago con una desviación estándar de 0.818 y un coeficiente de variación de 1.606%. La disminución de ácido fólico en la verdura cruda representa un 47.17%.

Los coeficientes de variación obtenidos son inferiores al 3% indicando que la diferencia entre los datos y el promedio obtenido para cada caso es aceptable.

Se tuvo un porcentaje de recobro 98.61% en el estudio de repetibilidad y exactitud y un coeficiente de variación en el estudio de precisión de 0.1047%.

Como en los casos anteriores el método desarrollado permite la cuantificación de ácido fólico en espárrago.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 95.8936 | 1.387 | 97.54 |
| | 2 | 96.8632 | 1.388 | 97.61 |
| | 3 | 96.46614 | 1.389 | 97.68 |
| Cocida | 1 | 50.092 | | |
| | 2 | 50.986 | | |
| | 3 | 51.724 | | |

Tabla No 10: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en espárrago

6) Espinaca

El contenido de ácido fólico en la espinaca es de 216.9224 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de verdura cuya desviación estándar fue de 0.3074, cuyo coeficiente de variación fue de 0.1417%. Al hervir las espinacas estas

tienen una disminución de 79.14% en su contenido de ácido fólico, por lo cual la espinaca cocida tiene un contenido de 45.249 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de verdura cocida. En la determinación de ácido fólico en la espinaca cocida la desviación estándar fue de 0.939 y el coeficiente de variación fue de 2.07%.

En cuanto a los coeficientes de variación para la espinaca cocida y la espinaca cruda fueron inferiores al 3% siendo aceptables.

El coeficiente de variación obtenido en la evaluación de la precisión del método fue de 0.0694%, y el porcentaje de recobro obtenido fue de 98.25% permitiendo validar el método para la cuantificación de ácido fólico en espinaca.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 216.9448 | 1.3975 | 98.28 |
| | 2 | 216.6044 | 1.3967 | 98.22 |
| | 3 | 217.218 | 1.3970 | 98.24 |
| Cocida | 1 | 43.583 | | |
| | 2 | 45.434 | | |
| | 3 | 44.73 | | |

Tabla No 11: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en espinaca

7) Jitomate

El jitomate mostró un contenido de 37.2881 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de jitomate cuya desviación estándar fue de 0.1165 y con un

coeficiente de variación de 0.312%. Al cocer el jitomate este tuvo una concentración de ácido fólico del 29.50% con una desviación estándar de 0.497 y 1.69% de coeficiente de variación. La concentración de ácido fólico al cocer el jitomate indica que hay un descenso en la concentración de la vitamina del 20.89%.

En ambos casos en el jitomate el coeficiente de variación fue inferior a 3% indicando que los datos están cercanos a la media aritmética, permitiendo decir que los datos obtenidos son correctos y que se puede repetir la metodología aplicada para esta verdura.

En la cuantificación del jitomate se tuvo un porcentaje de recobro de 97.95% y un coeficiente de variación en el estudio de precisión de 0.1305%, este permite validar el método desarrollado.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 37.215 | 1.3773 | 96.86 |
| | 2 | 37.227 | 1.3788 | 96.96 |
| | 3 | 37.422 | 1.3798 | 97.03 |
| Cocida | 1 | 29.561 | | |
| | 2 | 29.985 | | |
| | 3 | 28.992 | | |

Tabla No 12: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en jitomate

8) Papa

La papa tiene 38.0722 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de verdura con una desviación estándar de 0.03565 y un coeficiente de variación de 0.936%. Al hervir la papa esta tuvo un descenso en su concentración de ácido fólico de 7.12%, indicando que se tiene una concentración de ácido fólico en la papa cocida de 34.973 microgramos en 100 gramos de papa, en el estudio se tuvo una desviación estándar de 1.06 y un coeficiente de variación de 3.03.

Los coeficientes de variaciones son aceptables puesto que entran dentro del intervalo que es de inferior o igual al 3%.

El porcentaje de recobro fue del 99.90% en el estudio de exactitud y repetibilidad y el coeficiente de variación en el estudio de precisión fue de 0.0636%, validando así el método espectrofotométrico de ácido fólico en esta verdura.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 38.04767 | 1.398 | 99.85 |
| | 2 | 38.11308 | 1.399 | 99.93 |
| | 3 | 38.05578 | 1.399 | 99.93 |
| Cocida | 1 | 35.361 | | |
| | 2 | 33.77 | | |
| | 3 | 35.788 | | |

Tabla No 13: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en papa

9) Pepino

El pepino tiene 47.23 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de pepino en el estudio se tuvo una desviación estándar de 0.1539 y un coeficiente de variación de 3.25%. Al cocer el pepino se tuvo una concentración de ácido fólico de 14.198 microgramos en 100 gramos de pepino cocido, con una desviación estándar de 1.7 y un coeficiente de variación de 1.19%. En el caso del pepino se tuvo una disminución en la concentración de ácido fólico del 69.98%.

En el caso del coeficiente de variación para el pepino crudo este supera por 0.25% el intervalo aceptable que debe de ser inferior o igual al 3%, esta diferencia no es mucha por lo cual se consideró el dato obtenido. Este dato se pudo deber a la composición del pepino que tiene una gran cantidad de agua en la cual parte de sus componentes se pierden y podría ser el caso de ácido fólico. Para el caso del pepino cocido el coeficiente de variación entro dentro del intervalo aceptable. Aunque se haya tenido un coeficiente de variación superior al 3% en el pepino crudo se puede considerar que el método utilizado puede ser aplicable.

En el estudio de precisión se obtuvo un coeficiente de variación de 0.396%. El porcentaje de recobro de 97.64%, ambos elementos fueron suficientes para validar el método para la cuantificación de ácido fólico en pepino.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (μg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 47.40696 | 1.3843 | 97.35 |
| | 2 | 47.15542 | 1.3952 | 97.44 |
| | 3 | 47.12756 | 1.3857 | 98.11 |
| Cocida | 1 | 15.273 | | |
| | 2 | 15.082 | | |
| | 3 | 12.238 | | |

Tabla n°14: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en pepino

10) Zanahoria

La Zanahoria con 37.9677 microgramos de ácido fólico en 100 gramos en las determinaciones del ácido fólico se tuvo una desviación estándar de 0.1336 y un coeficiente de variación de 0.3519%. Al cocer la zanahoria esta tuvo una concentración de ácido fólico de 31.484 microgramos de ácido fólico en 100 gramos de zanahoria, esta cantidad de ácido fólico indico que hay una disminución de ácido fólico en la verdura al ser cocida de 17.08%. En la determinación del ácido fólico en la zanahoria cocida se tuvo una desviación estándar de 0.5055 y un coeficiente de variación de 2.96%.

Considerando los coeficientes de variación el método puede ser aplicado en otras determinaciones de ácido fólico en zanahoria.

Se tuvo un porcentaje de recobro de 98.20%, el cual es aceptable en la validación del método. En la precisión del método se obtuvo un coeficiente de variación de 0.1217 suficiente para validar el método.

| Tipo de verdura | Serie | Promedios de concentración de las tres series (µg ac. fólico/100g verdura) | Promedios de Precisión del método por serie | Promedios de Porcentaje de recobro por serie (%) |
|-----------------|-------|--|---|--|
| Cruda | 1 | 37.82974 | 1.3963 | 98.20 |
| | 2 | 38.09646 | 1.3958 | 98.16 |
| | 3 | 37.97698 | 1.3972 | 98.25 |
| Cocida | 1 | 31.131 | | |
| | 2 | 32.065 | | |
| | 3 | 31.256 | | |

Tabla No 15: Resultados de las cuantificaciones de ácido fólico en verduras crudas y cocidas en zanahoria

11) Análisis conjunto de las diez verduras

En los incisos anteriores se hizo un análisis detallado de cada verdura y de los resultados obtenidos en cada uno de los casos analizados.

En la gráfica No. 8, se busca recapitular los contenidos de ácido fólico en cada una de las muestras, para poder hacer un estudio comparativo.

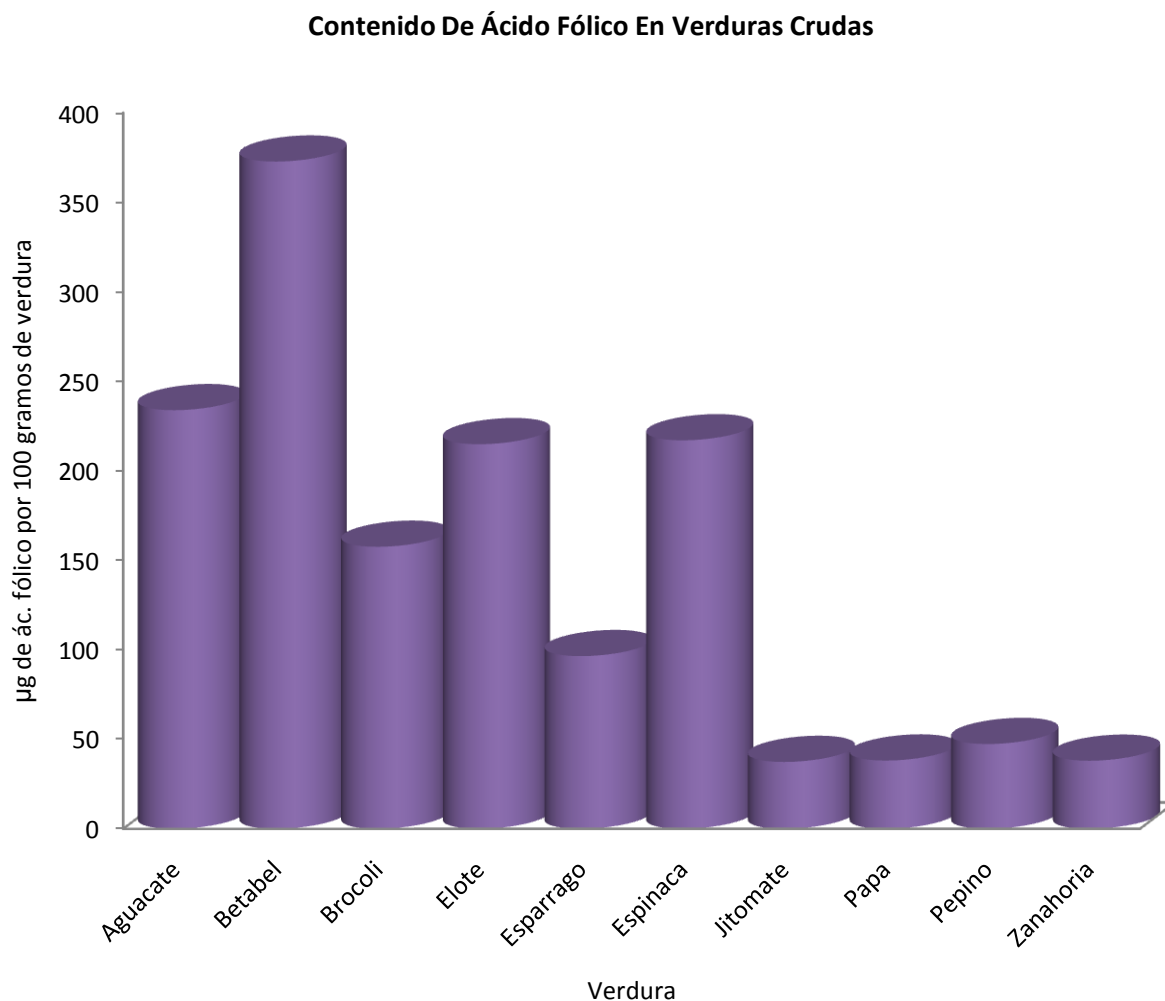


Gráfico No. 8: Comparación del contenido de ácido fólico en las verduras.

En el gráfico No. 8 se observa que el betabel es la verdura que tiene mayor contenido de ácido fólico y la que tiene un contenido menor es el jitomate. También se puede observar que las verduras con un color verde, el aguacate, brócoli, espárrago y espinaca, forman parte de las que tienen mayor contenido de ácido fólico. Esto último en las verduras crudas.

Al cocer las verduras todas presentaron una disminución importante en el contenido de ácido fólico la verdura que tiene una disminución considerable es el aguacate y la que tiene una menor disminución es la papa. El aguacate

cocido se hizo para ver el comportamiento por lo tanto la verdura que tuvo un descenso importante en su concentración de ácido fólico fue el brócoli con un porcentaje de pérdida del 83.29%. Es importante destacar que al cocer la papa por 5 minutos en agua hirviendo, ésta no se cuece completamente impidiendo que el ácido fólico se hidrolice. En cuanto al aguacate en las mismas condiciones de cocción este se deshace de ahí que el ácido fólico se hidrolice casi por completo o bien en el caso del brócoli, al tener una estructura más sencilla y más frágil que la papa, la hidrolisis del ácido fólico es más factible. Los parámetros de cocción se establecieron 5 minutos a temperatura de ebullición para que las condiciones de cocción no fueran factor de diferencia en los resultados obtenidos, se sabe que estos parámetros de cocción no son aplicados al momento de cocer las verduras en casa. En el grafico No. 9, se muestra la relación entre el contenido de ácido fólico en cada una de las verduras crudas y cocidas.

Disminución de ácido fólico por cocción de las verduras

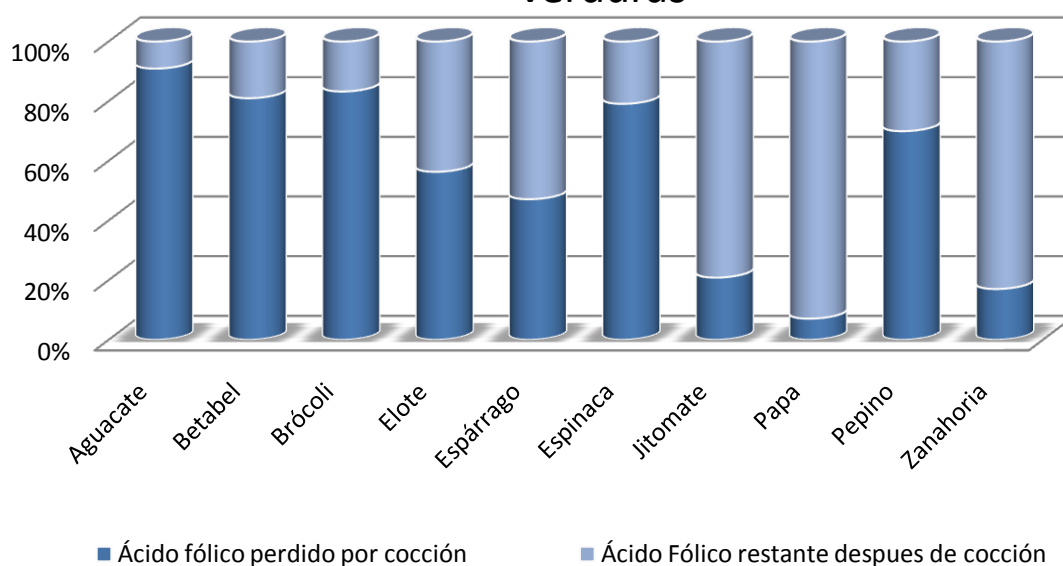


Gráfico No.9: Disminución del contenido de ácido fólico en las verduras

En muchas ocasiones las verduras analizadas no tienen un proceso de cocción idéntico al manejado en el experimento presente, ya sea porque no se consumen cocidas como el caso del aguacate y pepino, mientras que otras verduras no se consumen crudas como es el caso del brócoli y el elote. A continuación se mostrarán algunas razones por las cuales la cocción puede favorecer o afectar a las verduras. El aguacate es procesado para realizar distintos productos alimentarios, para esto se pasteuriza y mediante este proceso se pierden varios de sus compuestos incluido el ácido fólico, además de que su consumo más usual es crudo. En el caso del betabel se obtiene la betaína utilizando calor, llevando así a perder el ácido fólico presente en el betabel. De esta verdura también se logra la obtención de dos colorantes la betacianina y la betaxantina los cuales también se ven afectados por la temperatura ya que se pierden en el agua de cocción y además la luz también afecta su estabilidad^{35,36}. En el caso del brócoli la presencia de glucosinolatos impide que su ingesta sea cruda. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas que al ser ingeridos provocan la síntesis de glucosa, ácido sulfúrico y compuestos volátiles como son los itiocianatos (irritan las mucosas), oxazolidin-2-tionas (tiene efectos antitiroideos y provoca el bocio), nitrilos (inhiben el crecimiento y provocan lesiones en hígado y riñón) y finalmente tiocianatos (tienen efectos antitiroideos). Al llevar a cabo la cocción del brócoli los glucosinolatos son inhibidos e impidiendo la formación de los compuestos tóxicos antes mencionados. De aquí la importancia de conocer la pérdida de ácido fólico por cocción en esta verdura³⁷. Actualmente el aguacate es procesado para realizar distintos productos alimentarios, para esto se pasteuriza y mediante este proceso se pierden varios de sus compuestos

incluido el ácido fólico. El elote es una verdura con muchos usos distintos, es la base de la comida mexicana con la tortilla, para su elaboración se hace un proceso de nixtamalización, es decir la harina de maíz se pone con un álcali fuerte llevando así a que la biodisponibilidad del ácido fólico disminuya y posteriormente por su cocción. Del jitomate, del esparrago, de la espinaca y de la zanahoria se obtienen carotenoides, compuestos coloridos. En el caso del jitomate se obtiene el licopeno, pigmento responsable de darle el color rojo al jitomate. El licopeno es insoluble en agua, por lo que la cocción no lo afecta.

El betacaroteno es el responsable de la coloración naranja de la zanahoria pero también le da parte de su coloración al esparrago y a la espinaca, este caroteno también es insoluble en agua³⁸, por lo que no hay pérdida de estos compuestos en la cocción, y no pueden ser un vehículo para el ácido fólico. El Pepino tiene una gran cantidad de agua, alrededor del 95%. Al tener una gran cantidad de agua en su composición la mayoría de los compuestos son solubles en ésta, al cocer el pepino se observó que la matriz se deshizo, provocando que todos los componentes se perdieran en el agua de cocción. La papa tiene un gran porcentaje de almidón, formando así su estructura firme. El almidón es insoluble en agua por lo que las pérdidas de este en el agua de cocción son mínimas, de ahí que el ácido fólico este protegido por el almidón y no haya gran pérdida.

Para validar el método fue necesario calcular en el parámetro de exactitud y reproducible el porcentaje de recobro de cada una de las verduras; la verdura de la cual se obtuvo un mayor porcentaje de recobro fue la papa (99.90%) y la de menor porcentaje de recobro fue el aguacate (97.64%). La diferencia en los

porcentajes de recobro se pudo deber a que, en el caso del aguacate éste es una verdura muy delicada, es decir que sufre un proceso de oxidación muy rápido al ser partido y al trabajar la verdura además de tener una matriz blanda, produciendo seguramente cambios en el contenido de ácido fólico. En cuanto a la papa, esta verdura es la que tiene una matriz más fuerte de todas las verduras permitiendo tal vez que el ácido fólico se encuentre resguardado de cambios indeseables de ahí que los porcentajes de recobro sean distintos de una verdura a otra.

Al cuantificar el ácido fólico en las verduras cocidas, se observó que en todas las verduras hubo una disminución considerable. La verdura que tuvo una disminución importante fue el aguacate con una disminución en su contenido de ácido fólico de 90.96%, es importante decir que en el caso del aguacate y el pepino, se hizo la cuantificación para ver la tendencia en cuanto a disminución del contenido de ácido fólico aunque estas verduras no se consuman de manera cocida. Considerando esto último se podría decir que la verdura que tuvo una disminución importante a considerar en cuanto a su contenido de ácido fólico es el brócoli con 83.29%. Finalmente la verdura que tuvo una menor disminución en su contenido de ácido fólico fue la papa con 7.12%.

En los diez casos se validó el método desarrollado. Es importante destacar que el porcentaje de recobro permite afirmar que el compuesto analizado está presente en las muestras así como establecer el contenido de ácido fólico en la muestra analizada.

Al realizar un espectro de absorción de las verduras, espectro A, (Apéndice 5) se observa que en las verduras hay ácido fólico pero aún en ese estado del experimento existe la duda de que en realidad sea ácido fólico, esto último debido a que existe un sinnúmero de compuestos que absorben a 295 nm. En este estado del desarrollo del experimento se considera positiva la presencia de ácido fólico y se cuantifica el contenido de éste. Es importante decir que el contenido arrojado en esta etapa era aproximado y sirvió de base para validar el método. Para validarlo se basó en una concentración de 29.40 µg/mL, la cual se preparó agregando la mitad de este contenido, con ácido fólico estándar y la otra mitad del contenido del extracto de verdura. Al tener el resultado esperado (absorbencia obtenida en linealidad) se pudo confirmar que el compuesto cuantificado era efectivamente ácido fólico. En el espectro B (Apéndice 5) que es añadiendo ácido fólico al extracto de verdura se observa el aumento en la absorbencia a 295 nm debido al agregado de ácido fólico al extracto de verdura.

En los espectros de absorción de las verduras (Apéndice 5) se pudo notar que la longitud de onda de máxima absorción para las diez verduras oscila entre 216 y 220 nm, indicándonos que las 10 verduras tienen un compuesto común en una gran proporción. Este compuesto común podría ser un compuesto aromático debido a su posición en el espectro de absorción, pero al solo tener un espectro de absorción en ultravioleta es insuficiente para poder determinar el compuesto.

Es importante mencionar que la comparación de los valores de contenido de ácido fólico en las verduras obtenidos con los indicados en la literatura³ no se

puede realizar directamente, debido a que el ácido fólico en las verduras reportado en las tablas (Apéndice 2) está expresado como ácido fólico equivalente de folato dietético (DFE). Esto último indica la parte biodisponible del compuesto en la verdura, y lo cuantificado experimentalmente es el ácido fólico total de la verdura. Considerando que el ácido fólico digerible en todas las verduras es idéntico se puede realizar una comparación del contenido, así mismo se observa que en las verduras mexicanas se tiene un contenido mayor del compuesto que en Estados Unidos de América, estas diferencias se pueden deber al método utilizado ya que en Estado Unidos de América utilizan un método más preciso (HPLC) que el usado en este trabajo.

| Verdura | Dato Experimental En verdura cruda (µg / 100 g) | Dato Experimental En verdura cocida (µg / 100 g) | Dato de USDA ⁷ En verdura cruda (µg / 100 g) | Dato de USDA ⁷ En verdura cocida (µg /100 g) |
|-------------------|--|---|--|---|
| Aguacate | 233.7666 | 21.1334 | 35.27-88.19 | ---- |
| Betabel | 372.63 | 70.678 | ---- | 30 |
| Brócoli | 157.4766 | 26.317 | 62.5 | 56 |
| Elote | 214.7563 | 93.725 | ---- | 6.46 |
| Espárrago | 96.4076 | 50.934 | ---- | 95.83 |
| Espinaca | 216.9224 | 45.249 | 193.3 | 123.5 |
| Jitomate | 37.2981 | 29.5073 | 21.95 | 5.09 |
| Papa | 38.0722 | 35.361 | ---- | 8.97 |
| Pepino | 47.3 | 14.198 | 6.98 | ---- |
| Zanahorita | 37.9677 | 31.484 | 19.4 | 14.10 |

Tabla No 16: Tabla comparativa de los contenidos de ácido fólico experimentales y del Departamento De Agricultura De Estados Unidos De América⁷.

En el caso del aguacate y del pepino crudos los datos obtenidos experimentalmente son diez veces superiores a los presentados por USDA⁷, el mismo comportamiento se observa en el caso de betabel, elote, jitomate, papa cocidos, esto último muestra una diferencia entre los métodos utilizados en ambos lugares (espectrofotometría y HPLC).

En todas las verduras se sigue la tendencia de disminución del contenido de ácido fólico al cocer las verduras tanto en los datos experimentales como en los datos proporcionados por la USDA⁷.

Realizando la comparación de las verduras cocidas y las verduras crudas que tienen un mayor contenido de ácido fólico (números en verde) y que tienen un menor contenido de ácido fólico (números en azul), considerando si están o no cocidas, no hay concordancia entre los dos métodos. En cambio si no se considera la manera en que son procesadas las verduras, el jitomate y el pepino concuerdan al ser las verduras que tienen un menor contenido de ácido fólico.

En el caso de la zanahoria el orden de disminución entre verdura cruda y cocida en ambos parámetros de comparación se mantiene, el mismo comportamiento se observa en el jitomate. En cuanto a la espinaca no hay una relación directa entre los dos parámetros de comparación, incluso esta verdura es la que se considera con un contenido mayor en ácido fólico en la USDA⁷.

Estas comparaciones fueron hechas tomando en cuenta las tendencias en cuanto al contenido de ácido fólico, a sabiendas que no se cuantifico el mismo ácido fólico en los dos métodos. En el método espectrofotométrico se cuantifico ácido fólico total mientras que en el método de HPLC se cuantifico solo la porción digerible de ácido fólico (DFE), de ahí se puede interpretar la diferencia

de diez veces superior entre los datos experimentales y los datos reportados por USDA⁷. Se sabe que la biodisponibilidad del ácido fólico en alimentos es del 20%, es decir que al momento de la digestión se pierde el 80% del ácido fólico³⁹.

Sería importante comparar experimentalmente el contenido de ácido fólico de verduras producidas en México como en Estados Unidos de América para poder afirmar de manera válida que las verduras producidas en el país son de mejor calidad que las producidas en Estados Unidos de América en cuanto a ésta vitamina.

Capítulo V

Conclusiones

La metodología basada en una técnica espectrofotométrica desarrollada en la presente tesis es muy sencilla pero quizá sea un poco laboriosa en cuanto a las repeticiones necesarias. A través de éste método espectrofotométrico se pudo cuantificar de forma precisa, exacta y repetible el contenido de ácido fólico en las verduras seleccionadas. Sería interesante realizar un estudio de exactitud más avanzado del método mediante comparación de datos obtenidos en HPLC (método de referencia para la cuantificación de ácido fólico) con datos obtenidos con espectrofotometría además de un estudio de reproducibilidad donde se usa la misma metodología pero hecha por otro analítico, así como límites de detección.

En la cuantificación del ácido fólico en cada una de las verduras se obtuvieron desviaciones estándar aceptables mostrando que no hay una gran dispersión entre los valores obtenidos en cada determinación por verdura.

En el caso de las diez verduras analizadas se obtuvieron coeficientes de variación dentro del intervalo establecido que es inferior o igual a 3%³⁴ a la excepción del pepino crudo en el cual se superó este rango por 0.25%, lo cual no es un valor superior de gran relevancia.

Al obtener coeficientes de variación dentro del intervalo establecido (inferior al 3%)³⁴ permite decir que la metodología establecida para la determinación de ácido fólico en las diez verduras analizadas puede ser aplicada para determinaciones de ácido fólico futuras.

Los porcentajes de recobro de cada verdura entraron dentro del rango establecido para la cuantificación y validación de métodos analíticos espectrofotométricos que es de 97 al 103%³⁴. La verdura que tuvo un menor

porcentaje de recobro fue el aguacate y la que tuvo un mayor porcentaje de recobro fue la papa.

En el análisis recapitulativo se estableció que la verdura con mayor contenido de ácido fólico fue el betabel, y la que tuvo un menor contenido fue el jitomate, también se observó que las “verduras verdes” forman parte de las verduras con mayor contenido de ácido fólico llevando así a confirmar la hipótesis. Esto último en cuanto a las verduras crudas.

Al cuantificar el ácido fólico en las verduras cocidas, se observó que en todas las verduras hubo una disminución considerable de la vitamina. La verdura que tuvo una disminución importante fue el aguacate con una disminución en su contenido de ácido fólico de 90.96% y la verdura que tuvo una menor disminución en su contenido de ácido fólico fue la papa con 7.12%.

Como se mencionó en el capítulo anterior todas las verduras presentan un máximo de absorción a una longitud de onda entre 216 y 220, esto último se interpreto como un compuesto con un aromático en su estructura, pero sería necesario elucidar por completo este compuesto, para esto se tendría usar un método de separación y de purificación, posteriormente deducir su estructura mediante resonancia magnética nuclear o por medio de espectrometría de masas.

La metodología desarrollada permite la cuantificación de ácido fólico, se podría proponer como alternativa para el HPLC, debido a que es más sencilla y sobre todo económica.

Conociendo ya el contenido total de ácido fólico en las verduras tanto crudas como cocidas sería importante determinar la fracción digerible (DFE) de éste compuesto en las verduras analizadas. Considerando que el contenido de ácido fólico en las diez verduras analizadas es suficientemente elevado, se puede decir que el requerimiento de ácido fólico puede cumplirse con el consumo de verduras siempre y cuando se tenga una alimentación balanceada, esto último para el caso de todas las personas a la excepción de mujeres embarazadas. En el caso de las mujeres encintas se recomienda que complementen su requerimiento de ácido fólico con medicamentos para asegurar el aporte de ácido fólico requerido durante esta etapa y así evitar las enfermedades mencionadas.

Capítulo VI

Bibliografía

- 1) Ruiz Virginia M., Tapia Óscar C., **Bioquímica de los procesos metabólicos**, Capitulo: Metabolismo de las vitaminas, (México: Reverté, 2007), 338-339.
- 2) Hernández Manuel, **Tratado de nutrición**, (Madrid: Ediciones Díaz Santos, 1999), 47-49.
- 3) Romero Vega C., Camargo J. Ramón, **Determinación por cromatografía líquida (HPLC) el contenido de ácido fólico y hierro en una bebida láctea fermentada tipo yogurt enriquecida a partir de materias primas naturales**, (Revista Bistua Vol. 5 No.2, Julio-Diciembre 2007, Pamplona España) 42-48
- 4) Suárez Teresa, Torrealba Mónica et all., **Deficiencias de hierro, ácido fólico y vitamina B12 en relación a anemia, en adolescentes de una zona con alta incidencia de malformaciones congénitas en Venezuela**, (ALAN: Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Vol. 55 No.2, Venezuela 2005; en línea disponible en http://www.alanrevista.org/ediciones/2005-2/deficiencias_hierro_acido_folico_vitamina_b12.asp, consultado el 14 de septiembre del 2009)
- 5) González R., Tarazona R., Galiani M.D., Espinosa M.P., y Peña J., **Métodos Basados en la unión Ag-Ac**, (Universidad de Córdoba España, 2008) Capítulo 17
- 6) De Asmudis Cecilia, Sarno María del Carmen, Delfino Mario R, **Titulación potenciométrica de ácido fólico en comprimidos**, (disponible en internet en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-035.pdf>, consultado el 14 de septiembre del 2009)

-
-
- 7) United States Department Of Agriculture, Food and Nutrition, **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21** (en línea disponible en http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/s.7.0.A/7.0.1OB?navtype=SU&navid=FOOD_NUTRITION: internet; consultado el 10 de diciembre del 2008)
- 8) Quintana J., **Ácido fólico en la prevención de malformaciones congénitas**, (Archivos de ginecología y obstetricia, España, 2001) 113-121
- 9) Fleeger Carolyn A., United States Pharmacopeial Convention, United States Adopted Names Council, **USP dictionary of USAN and international drug names**, (Michigan USA: Editorial United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2007) 312
- 10) Rodríguez Gómez María José, **Estudio, identificación y separación de algunos compuestos antineoplásicos metabolitos y compuestos co-administrados.**, (Tesis doctoral Universidad de Extremadura, España, 28 mayo 2004) 106-136.
- 11) Martínez Villarreal Rebeca T., Rojas Martínez Augusto, Sánchez Hernández José G., Hernández Torres Ulises, Delgado Enciso Ivan y Ortiz López Rocío, **Evaluación clínica, bioquímica y molecular de una familia con recurrencia de defectos del tubo neural**, (Revista Salud Pública y Nutrición Vol.2 N°4 Octubre-Diciembre 2004).

-
-
- 12) Stoppard Miriam, Durrell Nancy, ***Nuevo libro del embarazo y nacimiento: Guía práctica y completa para todos los futuros padres***, (Madrid: Editorial Norma 2002), 35.
- 13) Prevention Magazine Health Book Staff, ***Vitaminas y minerales para la salud total: La guía de los mejores suplementos naturales para prevenir y tratar enfermedades***, (Ed. Rodale, 1999) 18-19.
- 14) Institute of Medicine of the National Academies, (en línea disponible en <http://www.iom.edu/>; internet; consultado el 03 de diciembre del 2008)
- 15) Moore Keith L., Persaud T. V. N., Martínez Concepción, ***Embriología clínica***,(Ed.7, Ed. Elsevier: España, 2004) 67-69
- 16) Behrman Richard E., Kliegman Robert M, Jenson Hal B., ***Nelson Tratado de Pediatría***, (Ed.17, Ed Elsevier España, 2004) 1983-1985
- 17) Kumar Vinay, Cotran Ramzi S., Robbins Stanley L., ***Patología Humana***, (Ed. 7 Elsevier España, 2003) 821-823
- 18) Skoog Douglas A., ***Principles of instrumental Analysis***, sexta edición, (Inglaterra, Cengage Learning, 2008). 157-159,691,692 ,867-875
- 19) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, ***Monografía del Aguacate***, (en línea disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=176&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Aguacate.html> : internet consultado 30 de mayo del 2009)

-
-
- 20) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Monografía del Betabel**, (en línea disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanal.php?url=http://w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/agricola.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)
- 21) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Monografía del Brócoli**, (en línea disponible en : <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanalM.php?idCat=166&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Brocoli%20.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)
- 22) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Monografía del Maíz**, (en línea disponible en : <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanalM.php?idCat=198&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/MaizGran.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)
- 23) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Monografía del Espárrago**, (en línea disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanalM.php?idCat=183&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Esparrago.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)

-
-
- 24) Postharvest technology, Research and information Center, University of California Davis, **Espinaca**, (en línea disponible en: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Espinaca.shtml>: internet acedado el 30 de mayo del 2009)
- 25) Información agricultura, **Espinaca**, (en línea disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/espinaca.htm>: internet consultado el 30 de mayo 2009)
- 26) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Monografía del Jitomate**, (en línea disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=207&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/TomataR.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)
- 27) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Monografía de la Papa**, (en línea disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=200&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Papa.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)
- 28) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Monografía de la Pepino**, (en línea disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=201&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Pepino.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)
- 29) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación,

-
- Monografía de la Zanahoria**, (en línea disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=210&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Zanahoria.html>: internet consultado 30 de mayo del 2009)
- 30)** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera dependencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Producción Agrícola: Ciclo: Cíclicos y Perenes, Modalidad: riego+ temporal** (en línea disponible en <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1042&tipo=1>: internet consultado el 29 de abril del 2009)
- 31)** Harris Daniel, **Análisis químico cuantitativo**, segunda edición, (Barcelona, Reverte, 2001), 499-520, 561-562
- 32)** Le Run Eric, Etchegoin Pablo, **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmon Effects**, (Inglaterra, Illustrated Elsevier, 2008) 59-61
- 33)** Gamazo Carlos, López-Goñi Ignacio, Díaz Ramón, **Manual práctico de Microbiología**, tercera edición, (España, Elsevier, 2005), 39.
- 34)** García Ma. Araceli, **Guía de Validación de métodos analíticos**, Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C, (México)
- 35)** Flor De María Peña Rivera, Narciso Gómez Villanes, **Detección y Aislamiento de Betalaínas de la betarraga (*beta vulgaris l.*)**, (en línea disponible en:

<http://200.60.61.136/agronomia/investigacion/2007/009.pdf> internet consultado el 2 de noviembre del 2009)

36) Mario José Moreno Álvarez, Douglas R. Belén Camacho, Alfredo Vilorio Matos, **Degradación de betalaínas en remolacha (Beta Vulgaris L.) estudio cinético**, Científica vol.12 número 002, abril 2002 (IPN).

37) Glucosinolatos (tioglicósidos), Universidad de Cornell (en línea disponible en: <http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar33c6.htm> internet consultado el 2 de noviembre del 2009)

38) Alejandro Martínez Martínez, **CAROTENOIDES**, (Medellín, Febrero de 2003), Universidad de Antioquia

39) Irene Galán Trigo, **Biodisponibilidad del ácido fólico en productos cárnicos cocidos**, RCCV Vol.1 (España 2007), Universidad Complutense,

*A*péndices

Apéndice 1 Glosario de enfermedades ligadas al ácido fólico

Anencefalia: consiste en la falta de una parte del cerebro, con o sin falta de la cavidad del cráneo. (Francois Joseph Moreau, Tratado práctico de los partos, página 744, Madrid 1967)

Encefalocele: Protrusión (crecimiento anormal) de una porción del hemisferio cerebral y de las meninges de un defecto craneal. (Henry M. Seidel, Beryl J. Rosenstein, Ambadas Pathak, Atención primaria del recién nacido, Serie de Manuales Prácticos Series Manuales prácticos, Elsevier España 1998, página 85)

Enfermedad vascular: consiste en un daño u obstrucción en los vasos sanguíneos ya estén alejado o no del corazón (mediante las venas y arterias). (Texas Heart Institute, Enfermedad vascular, disponible en internet http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/pvd_sp.cfm, fecha de consulta 17/08/09)

Estenosis hipertrófica congénita del píloro: Es el engrosamiento y/o hiperplasia de las fibras circulares de la capa muscular de la pared gástrica. (Craig A Canby, Anatomía basada en la resolución de problemas, Elsevier, España 2007, página 87)

Espina Bífida: malformación debida a la falta de cierre del tubo neural durante las primeras 4 a 6 semanas del desarrollo fetal. No hay un desarrollo adecuado del arco posterior de una o más vertebras dejando una abertura en la columna vertebral. (Micki Cuppett, Katie M Walsh, Medicina general aplicada al deporte, Elsevier España, 2007 página 402)

Malformación congénita renal: corresponde a las alteraciones del riñón e incluye alteraciones en la maduración y en la posición del órgano. (Guillermo Palomero, Lecciones de embriología, Universidad de Oviedo 2000, página 344)

Apéndice 1 Glosario de enfermedades ligadas al ácido fólico

Malformaciones de los miembros: cualquier defecto en los miembros de un recién nacido.

Malformaciones orofaciales: son aquellos defectos de la cara y/o boca en los niños, tales como el labio leporino y fisura palatina. (Isabel Chaure López, María Inarejos García, Enfermería pediátrica, Manuales de enfermería, Elsevier, España 2003, página 52)

Malformación del Septo ventricular: anomalía localizada en el corazón, más específicamente en el septum ventricular. (Frank H. Netter, Corazón, Elsevier España 1993, página 155)

Malformación urinaria obstructiva: anomalía intrínseca del aparato urinario provocando una obstrucción en el tracto urinario. (Manuel Hernández Rodríguez. Pediatría, Diaz de Santos, España 1994, página 843)

Síndrome de Down: un trastorno genético que implica una combinación de defectos congénitos, entre los que se incluyen cierto grado de retardo mental, rasgos faciales característicos y, a menudo, defectos cardíacos, deficiencia visual y auditiva y otros problemas de salud. (Universidad de Virginia Sistema de salud, Trisomía 21, disponible en línea en: http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/peds_genetics_sp/downs.cfm, fecha de consulta, 17/08/09)

Tetralogía de Fallot: consiste en una obstrucción a la salida del ventrículo derecho, comunicación interventricular, cabalgamiento de la aorta sobre el tabique ventricular e hipertrofia del ventrículo derecho. (John Cloherty, Manual de cuidados neonatales, Elsevier España, 2005, página 501)

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18
Folate, DFE (µg) Content of Selected Foods per Common Measure, sorted alphabetically

| NDB_No | Description | Weight (g) | Common Measure | Content per Measure |
|--------|--|------------|-----------------|---------------------|
| 11015 | Asparagus canned, drained solids | 72 | 4 spears | 69 |
| 11012 | Asparagus, cooked, boiled, drained | 60 | 4 spears | 89 |
| 11019 | Asparagus, frozen, cooked, boiled, drained, without salt | 60 | 4 spears | 81 |
| 11019 | Asparagus, frozen, cooked, boiled, drained, without salt | 180 | 1 cup | 243 |
| 09038 | Avocados, raw, California | 28.35 | 1 oz | 25 |
| 09039 | Avocados, raw, Florida | 28.35 | 1 oz | 10 |
| 11087 | Beet greens, cooked, boiled, drained, without salt | 144 | 1 cup | 20 |
| 11084 | Beets, canned, drained solids | 170 | 1 cup | 51 |
| 11084 | Beets, canned, drained solids | 24 | 1 beet | 7 |
| 11081 | Beets, cooked, boiled, drained | 170 | 1 cup | 136 |
| 11081 | Beets, cooked, boiled, drained | 50 | 1 beet | 40 |
| 11091 | Broccoli, cooked, boiled, drained, without salt | 156 | 1 cup | 168 |
| 11091 | Broccoli, cooked, boiled, drained, without salt | 37 | 1 spear | 40 |
| 11740 | Broccoli, flower clusters, raw | 11 | 1 floweret | 8 |
| 11093 | Broccoli, frozen, chopped, cooked, boiled, drained, without salt | 184 | 1 cup | 103 |
| 11090 | Broccoli, raw | 88 | 1 cup | 55 |
| 11090 | Broccoli, raw | 31 | 1 spear | 20 |
| 11655 | Carrot juice, canned | 236 | 1 cup | 9 |
| 11960 | Carrots, baby, raw | 10 | 1 medium | 3 |
| 11128 | Carrots, canned, regular pack, drained solids | 146 | 1 cup | 13 |
| 11125 | Carrots, cooked, boiled, drained, without salt | 156 | 1 cup | 22 |
| 11131 | Carrots, frozen, cooked, boiled, drained, without salt | 146 | 1 cup | 16 |
| 11124 | Carrots, raw | 72 | 1 carrot | 14 |
| 11124 | Carrots, raw | 110 | 1 cup | 21 |
| 11901 | Corn, sweet, white, cooked, boiled, drained, without salt | 77 | 1 ear | 35 |
| 11174 | Corn, sweet, yellow, canned, cream style, regular pack | 256 | 1 cup | 115 |
| 11176 | Corn, sweet, yellow, canned, vacuum pack, regular pack | 210 | 1 cup | 103 |
| 11168 | Corn, sweet, yellow, cooked, boiled, drained, without salt | 77 | 1 ear | 35 |
| 11179 | Corn, sweet, yellow, frozen, kernels cut off cob, boiled, drained, without salt | 164 | 1 cup | 57 |
| 11181 | Corn, sweet, yellow, frozen, kernels on cob, cooked, boiled, drained, without salt | 63 | 1 ear | 20 |
| 11206 | Cucumber, peeled, raw | 280 | 1 large | 39 |
| 11206 | Cucumber, peeled, raw | 119 | 1 cup | 17 |
| 11205 | Cucumber, with peel, raw | 301 | 1 large | 21 |
| 11205 | Cucumber, with peel, raw | 104 | 1 cup | 7 |
| 11363 | Potatoes, baked, flesh, without salt | 156 | 1 potato | 14 |
| 11364 | Potatoes, baked, skin, without salt | 58 | 1 skin | 13 |
| 11365 | Potatoes, boiled, cooked in skin, flesh, without salt | 136 | 1 potato | 14 |
| 11367 | Potatoes, boiled, cooked without skin, flesh, without salt | 135 | 1 potato | 12 |
| 11367 | Potatoes, boiled, cooked without skin, flesh, without salt | 156 | 1 cup | 14 |
| 11461 | Spinach, canned, drained solids | 214 | 1 cup | 210 |
| 11458 | Spinach, cooked, boiled, drained, without salt | 180 | 1 cup | 263 |
| 11464 | Spinach, frozen, chopped or leaf, cooked, boiled, drained, without salt | 190 | 1 cup | 230 |
| 11457 | Spinach, raw | 10 | 1 leaf | 19 |
| 11457 | Spinach, raw | 30 | 1 cup | 58 |
| 11529 | Tomatoes, red, ripe, raw, year round average | 17 | 1 cherry tomato | 3 |
| 11529 | Tomatoes, red, ripe, raw, year round average | 123 | 1 tomato | 18 |
| 11529 | Tomatoes, red, ripe, raw, year round average | 180 | 1 cup | 27 |
| 11529 | Tomatoes, red, ripe, raw, year round average | 20 | 1 slice | 3 |
| 11955 | Tomatoes, sun-dried | 2 | 1 piece | 1 |
| 11956 | Tomatoes, sun-dried, packed in oil, drained | 3 | 1 piece | 1 |

Equipo y Material usados en la experimentación

Equipo

- ◆ Balanza analítica. SARTORIUS® BP2105. Max 210g, d =0.1mg
- ◆ Espectrofotómetro UV-Visible. SPECTROPHOTOMETER 2800
UV/Visible. Cole Parmer® con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
- ◆ Potenciómetro. CONDUCTRONIC® pH120 con electrodos de
plata/cloruro de plata calomel como electrodos de medición y referencia
- ◆ Propipeta. TRANSFERPETTE® 100-1000µL. Brand® con puntas
- ◆ Licuadora Proctor Silex ®7 Speeds

Material

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| ◆ Matraz aforado de 1 L | ◆ Vasos de precipitados de 250 mL |
| ◆ Matraces aforados de 500 mL | ◆ Embudos de talle largo de vidrio |
| ◆ Matraces aforados de 50 mL | ◆ Bureta de 25 mL |
| ◆ Matraces aforados de 25 mL | ◆ Naves para pesar |
| ◆ Matraces aforados de 10 mL | ◆ Pizeta |
| ◆ Matraces aforados de 5 mL | ◆ Espátula |
| ◆ Matraces Erlenmeyer de 500 mL | ◆ Papel filtro |
| ◆ Matraces Erlenmeyer de 250 mL | ◆ Coladera |
| ◆ Vasos de precipitados de 150 mL | ◆ Cuchillo |

Fórmulas Matemáticas (por orden alfabético)

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \times \sigma_Y}$$

Donde:

r : es el coeficiente de correlación

σ_{XY} : es la covarianza de X y Y

σ_X : es la desviación de X

σ_Y : es la desviación de Y

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE}{\mu} \times 100$$

Donde:

DE: es la desviación estándar de la serie de datos

μ : media aritmética

Desviación estándar

$$DE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \mu)^2}{N}}$$

Donde:

DE: desviación estándar

μ : media aritmética

N: número de datos

X_i : datos

Media aritmética

$$x = \frac{a_1 + \dots + a_n}{n}$$

Donde:

x: es la media aritmética

a_1 : primer número a promediar

a_n : último número a promediar

n: números a promediar

Nivel de Concentración

$$\text{Nivel de concentración} = (\text{Conc. estandar}) \times \left(\frac{\text{aliquota}}{\text{volumen de aforo}} \right) \times (\text{pureza de estándar})$$

Porcentaje de recobro

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{\text{Absorbencia} \times 100}{\text{Absorbencia de linealidad}}$$

Relación Absorbencia y Concentración

$$\frac{A1}{C1} = \frac{A2}{C2}$$

Relación Concentración y Volumen

$$C1V1 = C2V2$$

Varianza:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \mu)^2}{N}$$

Donde:

σ^2 : es la varianza

μ : media aritmética

N: número de datos

X_i : datos

Espectro A: Espectro de Absorción de Verduras Crudas

