

# Cuantificación de los diferentes folatos presentes en tomatillo (*Physalis ixocarpa*) por cromatografía de líquidos de alta resolución

## Quantification of folates in *Physalis ixocarpa* by high pressure liquid chromatography

JOSÉ LUIS IBAVE GONZÁLEZ\* Y M. OCHOA



### Resumen

En este estudio se identificaron y determinaron las diferentes especies de folatos por medio de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, con detección de fluorescencia, aunado a un tratamiento trienzimático. La deconjugación de las cadenas de glutamatos en los folatos se realizó mediante una columna de afinidad a folatos. La cantidad promedio de folatos fue de 1.2  $\mu\text{M}/100$  gramos de peso fresco. La composición de las principales estructuras de folatos presentes en *Physalis* correspondió a 5-metil-tetrahydrofolato, tetrahydrofolato y 5-formil-tetrahydrofolato. La valoración de estos importantes metabolitos dentro de la dieta se ha soslayado debido a la dificultad implícita en su análisis. Es evidente que la falta de esta vitamina está implicada en el riesgo de defectos del tubo neural y anencefalia, principalmente en embarazos no deseados, donde no se consume una dieta adecuada de suplementos antes de la concepción. Este problema puede ser disminuido con la ingesta de fuentes de folatos en la dieta como *Physalis ixocarpa*.

**Palabras clave:** tomatillo, folatos, HPLC.

### Abstract

An efficient quantification method by HPLC was implemented for folates analysis in *Physalis ixocarpa* (husk tomato). A trienzymatic treatment was used for the initial extraction of folates followed by glutamate deconjugation by a folate affinity column. The average amount of folates was 1.2  $\mu\text{M}/100$  grams of fresh weight. The major folate structures present in *Physalis* were identified as 5-methyl-tetrahydrofolate, tetrahydrofolate and 5-formyl-tetrahydrofolate. The importance of the methodology stresses the fact that the difficulty implied in the analysis was overcome. Since this vitamin is involved in several new born disorders such as neural tube defects and anencephaly, it is of great importance to provide such elements in the diet and *Physalis ixocarpa* represents an excellent source of folates.

**Keywords:** green tomato (husk tomato), folates, HPLC.

\* Profesor-Investigador de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus 1. Chihuahua, Chihuahua, México, 31310. Tel. (614) 4391844 y 45. jibave@uach.mx

## Introducción

**E**l tomatillo (*Physalis ixocarpa*) es de amplio uso para la preparación de salsas y platillos en la cocina mexicana y es una fuente importante para el suministro de cantidades suficientes de folatos. Los folatos pertenecen a las vitaminas del grupo B y son de gran importancia nutricional para el ser humano. Están compuestos de tres partes fundamentales: la uterina, con diferentes estados de oxidación, que es una molécula de pABA, y finalmente de residuos de glutamato, los cuales imparten su estabilidad dentro de la célula. Estos compuestos son necesarios para prevenir enfermedades cardiovasculares, defectos del tubo neural, anencefalia (Berry *et al.*, 1999; Czeizel y Dudas, 1992) y cáncer (Giovannucci *et al.*, 1995) por medio de la donación de un grupo metilo (llamado el ciclo de C1), necesario para la fabricación de purinas y pirimidinas en la biosíntesis de metionina y homocisteína (Giovannucci *et al.*, 1995). Su consumo es vital para una adecuada división celular y mantener la homeostasis (Wagner, 1995).

Las diferentes coenzimas *in vivo* dependen de la cantidad y la biodisponibilidad al ingerir folatos y después de la pérdida por vía urinaria, fecal y rutas catabólicas (Mason, 1995; Boushey, 1995). Estudios recientes estipulan que el ácido fólico tiene la capacidad de prevenir defectos del tubo neural, particularmente al aumentar el sustrato disponible para la reductasa termolábil (5,10- methylenetetrahydrofolato), lo que resulta en un aumento en la conversión de los aminoácidos homocisteína y metionina, y por lo tanto elimina o reduce el riesgo de que no cierre el tubo neural (Fohr *et al.*, 2002). Los folatos están relacionados con la incidencia de anemia megaloblástica maternal, bajo peso del bebé (Saubertlich, 1995) y alumbramiento prematuro (School y Jonson, 2000). El consumo adecuado de alimentos ricos en folatos (aproximadamente 392 mg/día) está asociado con la disminución de un 22% de los niveles de homocisteína en el cuerpo (Van Oort *et al.*, 2003). La sensibilidad a la luz, calor y oxígeno de esta molécula la hacen susceptible a los métodos empleados en la preparación de los alimentos, ya que se pierde gran cantidad al lixiviarse en el agua de cocción, puesto que es una vitamina hidrosoluble. El mayor aporte de folatos en la dieta es por medio del consumo de verduras.

Lo anterior sustenta la determinación de la concentración de folatos presente en los alimentos, que es crítica para la división celular, principalmente en mujeres embarazadas durante las horas iniciales de la concepción y los primeros tres meses de formación del feto. Adecuados niveles de folatos previenen problemas de anencefalia y defectos del tubo neural. Es determinante asegurar una cantidad adecuada de estos compuestos en la ingesta de las mujeres en gestación para evitar riesgos al embrión, ya que los folatos son precursores de las bases nucleicas implicadas en la biosíntesis del ácido desoxirribonucleico.

El objetivo de esta investigación fue identificar y cuantificar los diferentes tipos de folatos biológicamente activos en los tejidos de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) mediante un método estandarizado y efectivo por cromatografía de líquidos de alta resolución.

## Materiales y métodos

En este estudio se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) de marca HP modelo 1050 Agilent Instruments modelo 1100, equipado con una bomba cuaternaria, automuestreador, arreglo de diodos (DAD) con degasificación por helio y un detector de fluorescencia (FLD), y con una columna Nucleosil

C-18 de 25 mm, 4.6, y 5mM. El HPLC es controlado por una PC con software HP ChemStation; además de una centrífuga Eppendorf con temperatura controlada, un espectrómetro UV/Vis Cary-Varian y un Shaker New Brunswick modelo CX, Thermolyne 1100.

Para el desarrollo del estudio fueron utilizados los siguientes materiales: 5-metil-tetrahydrofolato, tetrahydrofolato, ácido fólico, 5-formil-tetrahydrofolato, dihydrofolato (Sigma-Aldrich, St. Louis MO.), affi-gel 10 (bio-rad), ácido trifluoroacético, *folate binding protein* (FBP, Sigma-Aldrich), azida de sodio, acetonitrilo grado HPLC, ácido acético, DL-dithiotreitol (Sigma-Aldrich) fosfato de potasio monohidratado, fosfato de potasio dihidratado, agua grado HPLC, á-amilasa (*Aspergillus oryzae*, Sigma-Aldrich), proteasa (*Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich) y conjugasa pancreática de pollo tipo 1 (Sigma-Aldrich).

Todos los compuestos empleados fueron de la mas alta pureza y las soluciones fueron filtradas a través de un filtro de nylon 0.22  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich).

La preparación de la columna se realizó de acuerdo a Gregory y Toth (1988) y Selhub *et al.*, (1980), con algunas modificaciones. Se tomaron 9.3 ml de agarosa Biorad Affi-Gel 10, se colocaron en una cápsula de porcelana, se hizo lavado con 3 volúmenes de cama con agua a 4 °C, se pasaron a un matraz Erlenmeyer de

50 ml y se colocaron en un agitador a 4 °C y a 150 rpm. La proteína *folate binding protein* (FBP) se disolvió en un amortiguador de fosfatos pH 7 y después se añadió la agarosa, agitándose durante cuatro horas para formar una buena unión entre ellas. Luego se sacó y se lavó con buffer de KAc 0.05 M a pH 4.9 tres veces; posteriormente se empacó y se enjuagó con KAc 0.05 M en tres ocasiones, para un final con tres volúmenes de cama con buffer de fosfatos.

Para la preparación de análisis de los frutos de tomatillo, se adquirieron éstos en diferentes centros comerciales del estado de Chihuahua. La extracción de la muestra se llevó a cabo de acuerdo al método de Selhub *et al.*, (1980) y con las menores modificaciones propuestas por Gregory y Toth (1988), bajo luz amarilla de baja intensidad para impedir la fotodegradación de los compuestos a determinar. A cada frasco de extracto se le agregó el buffer de extracción pH 7 y se calentó a baño maría por 10 min a 100 °C, mientras se agitaba a 50 rpm durante 10 min. Posteriormente y de forma inmediata se puso en baño con hielo para bajar la temperatura y se aplicó una corriente de nitrógeno para desplazar el oxígeno y evitar la oxidación. Se centrifugó por 20 min a una fuerza relativa de 13000 x g a 4°C, separando el sobrenadante y redisolviéndose el residuo agitando de nuevo y centrifugándose por 10



Figura 1. Tomatillo (*Physalis ixocarpa*) en diferentes estadios fenológicos.

min a 13000 x g a 4 °C. Se juntaron los sobrenadantes y se aforó a 50 ml con buffer de extracción, lavándose nuevamente con nitrógeno. Se tomaron 5 ml del sobrenadante y se pasaron a través de la columna de FBP antes estabilizada con buffer de extracción de 10 ml y enjuagada con buffer de fosfatos 0.025M con 1M de NaCl a pH 7. Enseguida se lavó nuevamente con buffer de extracción a un flujo de 0.43 ml/min. por gravedad, fluyéndose 0.02M (TFA)-0.02M (DTT) y lavados consecutivos 0.025M de buffer de fosfatos, conteniendo 1M de NaCl y de nuevo con buffer de extracción. La columna de FBP se almacenó con azida de sodio 0.02 % en buffer de extracción.

El tratamiento trienzimático en los alimentos es necesario para determinar la cantidad de folatos total presente (Martín y Eintenmiller, 1990). No todos los alimentos se comportan igual en el tratamiento trienzimático, ya que no tienen un pH de actividad definida (Tamura *et al.*, 1997) y son usados para eliminar almidón y proteínas, que puedan causar interferencia en diferentes alimentos y por lo tanto incrementar la cantidad de folatos presentes (Cerna y Kas, 1983; Tamura, 1998). Es por esto que todas estas técnicas se realizan bajo luz amarilla para eliminar la fotodegradación. La preparación de la  $\alpha$ -amilasa fue a una concentración de 20 mg/ml, añadiéndose 2 ml a la muestra por 5 horas y 37 °C, mientras que la concentración de la proteasa fue de 10 mg/ml, añadiéndose 1 ml por 0.30 g de muestra liofilizada ó 5 g de muestra fresca, preparándose con 0.1M de buffer de fosfatos a 4.1, ajustando el pH con fosfato dibásico 0.1M y 57mM de ácido ascórbico por 6 horas a 37 °C. La conjugasa pancreática (5 mg/ml) se preparó de acuerdo a Rader *et al.*, (1998) y Gregory (1984), disolviéndose por 3 horas a 37 °C en 1.42% de buffer fosfatos, conteniendo 1% de ácido ascórbico a pH de 7.8. Después se calentó en baño maría por 5 min., con el objeto de desnaturalizar las enzimas y separar por filtración en un filtro de nylon 0.22  $\mu$ m.

Para la detección de folatos se utilizó un gradiente binario en sistema de cromatografía de alta resolución en fase reversa, columna C<sub>18</sub> nucleosil (150 x 4.6mm x 5  $\mu$ m) y dos detectores UV y fluorescencia. Todas las soluciones se prepararon con agua grado HPLC. El extracto

se colocó en fase isocrática con buffer de fosfatos, con concentración de 30 mM, pH 2.2 y en una relación del 90% de buffer y 10% de acetonitrilo, seguido de una disminución de éste último a 85% y 15% respectivamente en los siguientes 8 minutos, para volver al estado inicial en los siguientes 3 minutos. Se utilizó un flujo de 0.8 ml/min y una longitud de onda de 290 nm en UV para ácido fólico, mientras que las condiciones para el detector de fluorescencia fueron 290 nm de emisión y 356 nm de excitación para dihidrofolato, tetrahydrofolato y 5-metil-tetrahydrofolato. En el caso de 5-formil-tetrahydrofolato se usó una excitación de 360 y 460 nm de emisión, respectivamente. La fase móvil con un pH ácido tiende a tener pobres identificaciones para el 10 formil-tetrahydrofolato, por la conversión a 5-10 metenil-tetrahydrofolato y la reducción del dihydrofolato a tetrahydrofolato (Díaz De la Garza *et al.*, 2004; Robinson, 1971).

## Resultados y discusión

En una gran cantidad de reportes científicos se ha tratado de optimizar la preparación de la muestra y las condiciones cromatográficas para la obtención de una mayor cantidad de folatos de los diferentes materiales bajo estudio; sin embargo, a pesar de todos estos esfuerzos, sólo se ha llegado a tratar de optimizar la cantidad de muestra a extraer, dependiendo de la capacidad de detección de los aparatos empleados. Es por ello que al emplear *Physalis* como material para cuantificar los niveles de folatos presentes se tuvo que trabajar en la adecuación del método para garantizar la precisión de la medición, por medio de la elucidación de la cantidad mínima a detectar, llegándose a una conclusión fundamental respecto a la cantidad mínima de muestra necesaria para lograr reproducibilidad del método y detectar las concentraciones de las diferentes estructuras relacionadas a folatos. Esta situación arrojó que con un tamaño de muestra de 5 g es suficiente para estar por encima de los límites de detección.

La capacidad de las columnas con FBP se midió con ácido fólico y se obtuvo en promedio un 92% de recuperación de esta vitamina, con una desviación estándar de 6.2% y un flujo por gravedad entre 0.37-0.42 ml/min. Estos valo-

res se utilizaron como factor de corrección para la cuantificación precisa de los folatos en tomatillo y determinar la aportación de este importante complejo vitamínico en la dieta.

Los folatos de la matriz del tomatillo extraídos mediante calor tienen una interconversión del 10-formil-tetrahidrofolato a 5-formil-tetrahidrofolato. Es por eso que en ocasiones no se detecta, ya que depende de la actividad y cantidad que tenga en cada alimento, o las sustancias que se emplean para evitar oxidación, como el 2-mercaptoetanol. En este estudio se detectó una elevación del contenido de ácido fólico como resultado de la oxidación del dihidrofolato; además, la importancia del uso de la combinación de dos antioxidantes (2% w/v ácido ascórbico y 2mM de 2-mercaptoetanol) da la estabilidad y convierte una cantidad de los folatos presentes en su forma dihidrofolato a tetrahidrofolato, abriendo la posibilidad de identificar y cuantificar los diferentes derivados de folatos y sus formas de estados de oxidación. Lo anterior se llevó a cabo a pH de 4.1 para realizar la reducción del 5-metil-dihidrofolato a 5-metil-tetrahidrofolato, así como de dihidrofolato a tetrahidrofolato, lográndose una mayor detección en fluorescencia (Wilson y Horne, 1984; Gregory *et al.*, 1990; Vahteristo *et al.*, 1996). Estas formas son de las que se han reportado como de mayor actividad dentro de las plantas y animales (figura 2).

Durante la extracción se tiene que prever

la cantidad de proteína y almidón, ya que interfieren en la cuantificación. Asimismo es necesario tener una aproximación de la concentración posible de folatos que pueden estar presentes, con el número adecuado de repeticiones para optimizar el tiempo de extracción. Para lograr la digestión de las proteínas y almidones y liberar los folatos unidos a ellos, se determinó que los tiempos para cada enzima fueron como sigue: á-amilasa, 6 horas; proteasa, 2 horas; ã-carboxilasa, 4 horas. Con estos tratamientos fue posible evitar la degradación térmica de los folatos a pesar de los tiempos tan largos para la digestibilidad.

La cantidad de folatos medidos usando el método trienzimático resultó en una precisión superior al 132% con respecto a la cuantificación de estos compuestos a través de la acción exclusiva de la conjugasa, por lo que se demuestra que los folatos en tomatillo se encuentran retenidos en la matriz celular del tejido del alimento.

Para la identificación y la cuantificación de los folatos fue necesario determinar la longitud de onda apropiada para cada compuesto, ya que no todos pueden ser identificados a la misma longitud, por ejemplo, la señal de detección por fluorescencia para dihidrofolato es muy baja en comparación con las diferentes formas de tetrahidrofolato.

En los resultados cromatográficos (figuras 3 y 4) se tomó la mezcla racémica de cada folato como un solo compuesto, ya que es muy

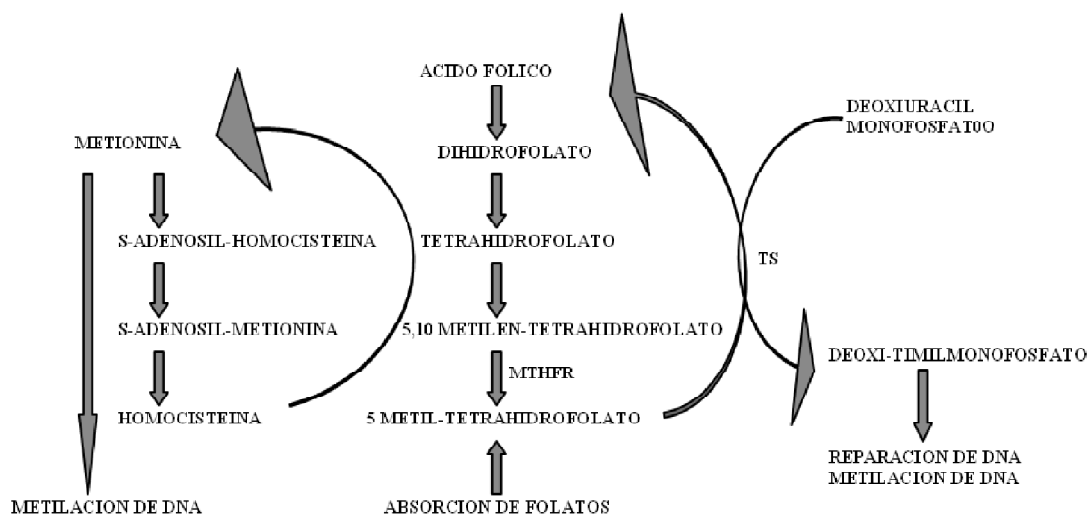


Figura 2. Principales derivados activos de folatos y las diferentes rutas metabólicas en las cuales están implicados (Ravanel *et al.*, 2001).

complicado hacer la separación de los isómeros bajo la metodología empleada.

A pesar de la gran dificultad para la detección y cuantificación de estos metabolitos como resultado del pH propio del alimento y que afecta la estabilidad de los mismos, fue posible obtener una excelente reproducibilidad del método y buenos resultados en la cuantificación total de folatos (1.21  $\mu\text{mol}/100\text{g}$ , en base a peso fresco), por lo que se ha podido elucidar que *Physalis ixocarpa* es una fuente adecuada para proporcionar cantidades de folatos importantes en la dieta.

En el cuadro 1 se muestran las diferentes formas cuantificadas de folatos en tomatillo, que presenta niveles importantes del metabolito 5-metil-tetrahidrofolato, el cual se considera el de mayor significancia biológica. Si asumimos que la ingesta *per capita* alcanza niveles de 3.5 kg/año (SAGARPA, 2001), es necesario introducir campañas para promover su consumo, porque representa una fuente importante de folatos. Hay que recordar todos los problemas asociados con mujeres en edad fértil (Sauberlich, 1971; Scholl *et al.*, 2000).

El impacto positivo que tiene el tomatillo en la dieta, por desconocimiento, se ha ignorado, ya que siempre se asocia como producto típico de la comida mexicana. Se analizaron sus potenciales basándose en la prevención de defectos de tubos neurales y anencefalia, principalmente en embarazos no planeados, mediante la cuantificación del aporte de folatos presentes en este producto.

El uso de la extracción trienzimática fue efectivo, obteniendo niveles más altos que el empleo de una sola enzima, la conjugasa. En

el método trienzimático se obtuvieron niveles de folatos hasta de 1.8 veces por encima de la conjugasa, debido principalmente a la interferencia causada por la presencia de polímeros (almidón y proteínas) que atrapan a este tipo de compuestos. Sin embargo, su potencial radica en la prevención de defectos del tubo neural.

Para una adecuada detección de folatos en concentración reducida, que es lo que ocurre comúnmente en los alimentos, se requiere utilizar métodos de separación e identificación con técnicas de alta sensibilidad (Vahteristo *et al.*, 1996), empleando cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia, con límites inferiores que oscilan entre 0.03 a 2.3  $\text{pmol}/100\mu\text{L}$  en el punto de inyección (Gregory *et al.*, 1984). Además de ser un método rápido en comparación con el comúnmente empleado (que se basa en una prueba microbiológica), también permite determinar las diferentes especies de folatos presentes como monoglutamatos y poliglutamatos, así como sus estados de oxidación.

Cuadro 1. Cantidades de los diferentes estructuras derivadas de los folatos presentes en tomatillo (*Physalis ixocarpa*).

Compuesto	Cantidad $\mu\text{mol}/100\text{g}$ (media)
Ácido Fólico	0.185
5 formil-tetrahidrofolato	0.4152
Dihidrofolato	—
Tetrahidrofolato	0.0912
5 metil-tetrahidrofolato	0.5226
Total	1.2114

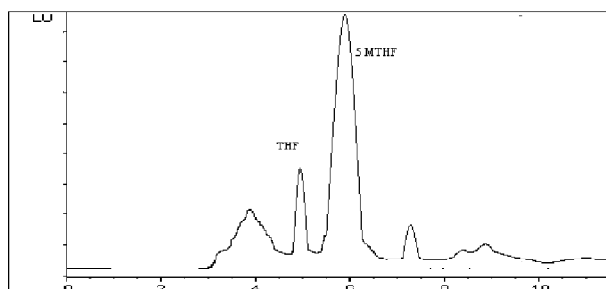


Figura 3. Análisis con detector de fluorescencia para la identificación de diferentes especies derivadas de folatos como monoglutamatos (excitación 290, emisión 356) en *Physalis ixocarpa*.

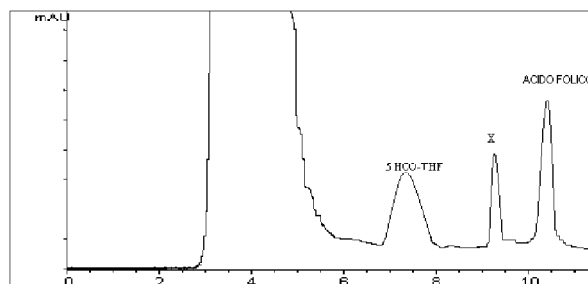


Figura 4. Identificación de diferentes especies derivada de folatos como monoglutamatos con detector de UV y arreglo de diodos ( $\lambda$  290 nm) en *Physalis ixocarpa*.

La más alta concentración de folatos se logró al tratar las muestras a pH de 4.1, ya que inhibió la actividad de la enzima conjugasa endógena contenida en la matriz del alimento y por lo tanto afectó la extracción de este tipo de compuestos (Gregory *et al.*, 1990). A este pH se optimizó la actividad de la proteasa y amilasa para la extracción completa de los folatos del tejido del tomatillo. Es probable que algunos de ellos se encuentren atrapados en proteínas y carbohidratos y, por consiguiente, tienen que ser sometidos a un proceso de digestión para su liberación y correcta cuantificación en el alimento.

Al terminar el proceso de extracción de los folatos se recomienda inmediatamente inyectarlos, ya que al ser almacenados a bajas temperaturas se reduce su concentración, debido al deterioro y destrucción por exposición a la luz.

El total de las formas de folatos antes del tratamiento trienzimático es significativamente diferente después del tratamiento trienzimático (Nehmatallah, 2003), o se incrementa la concentración de compuestos, principalmente de conversión de dihidrofolatos a tetrahidrofolatos, ya sea por conversión como resultado de la temperatura, extracción ácida y el uso de antioxidantes (Lucock *et al.*, 1995). De forma similar, empleando como fluyente de la columna el ácido trifluoroacético y DL-ditiotreitol, se pueden perder derivados del folato como 5-HCO-THF, que tiene una gran inestabilidad a pH bajos y puede convertirse parcialmente a 5,10 metenil THF (Robinson, 1971).

## Conclusiones

Este es el primer reporte en la literatura en donde se ha trabajado con tomatillo (*husk tomato*), que resulta ser una excelente fuente de folatos, por lo que su consumo o introducción en la dieta, sobre todo en mujeres con potencial de gestación, representa un alimento ideal para evitar o reducir el índice de defectos del tubo neural y anencefalias en recién nacidos. Se ha establecido una metodología para la identificación y cuantificación de los diferentes folatos presentes en *Physalis ixocarpa* empleando una modificación en la metodología por HPLC, basada en un detector de fluo-

rescencia que ofrece rapidez y precisión, superando lo reportado en donde se emplean ensayos microbiológicos, que muchas veces no son tan sensibles en la cuantificación por ser cantidades muy pequeñas de folatos en los alimentos. Aunado a lo anterior, se cuenta con una excelente técnica de extracción de folatos de la matriz por el método trienzimático y la afinidad de folatos en columnas con proteínas inmovilizadas para la purificación de la muestra.

Durante la extracción se dio una variación de los resultados con una desviación estándar de 6.2%, debido a que se compraron tomatillos en diferentes tiendas y diferentes fechas (entre febrero y abril), que pueden cambiar en su composición debido a factores bióticos y abióticos teniendo variaciones en la cantidad de folatos o bien expresándose más algunos folatos debido a su actividad interna en el tomatillo.

Los niveles de folatos encontrados en *Physalis* permiten elucidar su importancia como alimento constitutivo en una dieta que ayude a preparar balanceos nutrimentales entre los tipos de alimentos que debemos consumir, principalmente para mujeres en edad reproductiva.

## Literatura citada

- BERRY, R.J., Z. Li, D. Erickson, S. Li, C.A. Moore, H. Wang, J. Mulinare, P. Zhao, L.C. Wong, J. Gindler, S. Hong, A. Correa. 1999. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *N. Engl. J. Med.* 341:1485-1490.
- BIRKTOFT, J.J., K. Bredman. 1994. Glutamyl endopeptidases. *Methods in Enzymology* 244: 114-126.
- BOUSHEY, C.J., S.A.A. Beresford, G.S. Omenn and A.G. Motulsky. 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J. Am. Med. Ass.* 274: 049-1057.
- CERNA, L. and J. Kas. 1983. New conception of folacin assay in starch or glycogen containing food samples. *Nahrung* 10:957-964.
- CZEIZEL, A. and I. Dudas. 1992. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. Engl. J. Med.* 327:1832-1835.
- DÍAZ DE LA GARZA, R., E.P. Quinlivan, M.J. Klaus, J.C. Basset, J.F. III Gregory and A.D. Hanson. 2004. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 101 (38):13720-13725.
- FOHR, I., R. Prinz-Langenohl, A. Bronstrup, A. Bohlmann, H. Nau, H. Berthold and K. Pietrzik. 2002. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype deter-

- mines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young woman. *Am. J. Clin. Nut.* 75 (2):275-282.
- GIOVANNUCCI, E., E.B. Rimm, A. Ascherio, M.J. Stampfer, G.A. Colditz and W.C. Willett. 1995. Alcohol, low-methionine-lowfolate diets, and risk of colon cancer in men. *J. Nat. Cancer Inst.* 87:265-273.
- GREGORY, J.F., R. Engelhardt, S.D. Bhandari, D.B. Sartain and S.K. Gustafson. 1990. Adequacy of extraction techniques for determination of folate in foods and other biological materials. *J. Food Comp. An.* 3:134-144.
- GREGORY, J.F., D.B. Sartain and B.P.F. Day. 1984. Fluorometric determination of folacin in biological materials using higher performance chromatography. *J. Nutrition.* 14:341-353.
- GREGORY, J.F. and J.P. Toth. 1988. Chemical synthesis of deuterated folate monoglutamate and in vivo assessment of urinary excretion of deuterated folates in man. *Anal. Biochem.* 170:94-104.
- JASTREBOVA, J., C. Witthoft, A. Grahn, U. Svensson and M. Jägerstad. 2003. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chem.* 80 (4):579-588.
- LUCOCK, M.D., M. Green, I. Priestnall, M. Daskalakis, I. Levene and R. Hartley. 1995. Optimization of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. *Food Chem.* 53:329-338.
- MARTIN, J.I., W.O. Jr. Landen, A. G. Soliman and R. R. Eitenmiller. 1990. Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 73:805-808.
- MASON, J. 1995. Folate status: effects on carcinogenesis. In: *Folate in Health and Disease*. Lynn Bailey (ed.). Marcel Dekker, New York, N.Y. pp. 329-361.
- NEHMATALLAH, N.J. 2003. Capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography determination of polyglutamyl folates in citrus products. In: *IFT Annual Meeting*. Chicago.
- PEÑA, L.A. 2001. Situación actual y perspectivas de la producción y mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en México. *Memoria del XXIV Congreso Nacional de Fitogenética*. 4-9 de octubre. UAAN.
- RADER, J.I., C.M. Weaver and G. Angyal. 1998. Use of a micro-biological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chem.* 62(4):451-465.
- RAVANEL, S., H. Cherest, S. Jabrin, D. Grunwald, Y. Surdin-Kerjan, R. Douce and F. Rébeillé. 2001. Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: Molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 98(26):15360-15365.
- ROBINSON, D.R. 1971. The nonenzymatic hydrolysis of N5 N10-methenyltetrahydrofolic acid and related reactions. *Methods Enzymol.* 18B:716-725.
- SAUBERLICH, H.E. 1995. Folate status of U. S. population groups. In: *Folate in Health and Disease*. Lynn Bailey (ed.). Marcel Dekker, NY. pp 171-194.
- SCHOLL, T.O. and W. G. Johnson. 2000. Folic Acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am. J. Clin. Nut.* 71:1295-1303.
- SELHUB, J., O. Ahmad and I.H. Rosenberg. 1980. Preparation and use of affinity columns with bovine milk folate-binding protein covalently linked to Sepharose 4B. *Methods Enzymol.* 66:686-690.
- TAMURA, T., Y. Mizuno, K.E. Johnson and R.A. Jacob. 1997. Food folate assay with protease  $\alpha$ -amylase and folate conjugase treatments. *J. Agr. Food Chem.* 45:135-139.
- TAMURA, T. 1998. Determination of food folate. *Nutr. Biochem.* 9: 285-293.
- VAN OART, F., A. Boonstre, I. Brower, R. Clarke, C. West, M. Katan and P. Verhoef. 2003. Folic acid and reduction of plasma homocysteine concentration in older adults, a dose response study. *Am. J. Clin. Nut.* 77 (5):1318-1323.
- VAHTERISTO, L. T., V. Ollilainen, E. K. Pekka and P. Varo. 1996. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.* 44:477-482.
- WAGNER, C. 1995. Biochemical role of folate in cellular metabolism. In: *Folate in health and disease*. Lynn Bailey (ed.). Marcel Dekker, NY 23-42.

Recibido: Marzo 24, 2006/Aceptado: Agosto 19, 2006

