



# 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.

Vega Romero C., Ramón Camargo J

Departamento de Alimentos, Grupo de investigaciones en Operaciones Unitarias para la Industria de Alimentos, GOUIA. Universidad de Pamplona, Colombia.  
cromero@unipamplona.edu.co

## ABSTRACT

A methodology was developed to quantify folic acid in melon, soya and lentils, since they contain large amounts of this vitamin according to tests done. In order to add iron and folic acid to yogurt in the percentage that a gestating mother needs. The extraction of the vitamin was compared using three methods: magnetic agitation, ultrasound and radiation by microwaves. The samples analyzed by HPLC in reverse phase in a chromatographer Agilent 1100, from the standard of folic acid (MERCK 98%). The extractions were carried out in triplicate to evaluate the precision of the method. The results obtained were that soya has a greater concentration of folic acid with relation to melons and lentils; the folic acid was then added to the yogurt.

## KEY WORDS

Atomic absorption, Folic Acid, Iron, HPLC, Melon, Lentils, Agilent 1100.

## RESUMEN

Se desarrollo una metodología para cuantificar Hierro en soja y acido fólico en el melón, soya y lentejas, ya que contienen gran cantidad de dicha vitamina según literatura, para luego adicionar al yogurt el porcentaje de hierro y acido fólico que una madre gestante necesita.

El hierro se determinó por método gravimetrico y por absorción atómica. Se comparo la extracción de la vitamina por tres métodos: agitación magnética, ultrasonido y radiación de microondas.

Las muestras para ácido fólico se analizaron por HPLC en fase reversa en un cromatógrafo liquido Agilent 1100, a partir de un estándar con acido fólico (MERCK 98%). Las extracciones se llevaron a cabo por triplicado para evaluar la precisión del método.

Como resultado se obtuvo que la soya tiene mayor concentración de ácido fólico con relación al melón y las lentejas, el cual se adicionó al yogurt y se determinó su cantidad por el análisis ya mencionado.

## PALABRAS CLAVES

Absorción Atómica, Acido fólico, Hierro, HPLC



## INTRODUCCION

Los folatos y el hierro son nutrientes esenciales para el crecimiento celular y para su división y diferenciación, por lo que su aporte adecuado resulta esencial durante el embarazo (ATUKORALA et al, 1994)

Se denominan folatos de forma genérica todos los derivados de la vitamina B que tienen la actividad biológica del ácido pteroilmonoglutámico. El ácido fólico es la forma completamente oxidada del monoglutamato de la vitamina, mientras que las otras formas que se encuentran en la naturaleza se denominan folatos. Los suplementos de ácido fólico en periodos cercanos a la concepción reducen el riesgo de que el feto tenga defectos del tubo neural (MRC, 1991; CZEIL, DUDAS, 1992). Cuando los requerimientos diarios no son cubiertos adecuadamente los tejidos pueden depletarse en unos pocos meses. Actúan como un cofactor en diversas reacciones enzimáticas aceptando y transfiriendo 1 carbono (1-C), las que están involucradas en la síntesis, interconversión y modificación de nucleótidos, aminoácidos y otros componentes celulares claves en la síntesis de ADN y proteínas (BAILEY et al, 2001).

Los folatos se presentan en los alimentos como poliglutamatos, los que deben ser convertidos a monoglutamatos por la gamma-glutamyl-hidrolasa localizada en el ribete estriado de los enterocitos del yeyuno. El ácido fólico se absorbe como tal por tratarse de un monoglutamato. Luego, el folato monoglutamato atraviesa la membrana por un mecanismo transportador dependiente del pH. Antes de entrar en la circulación portal, todas las formas de folato sufren la transformación a tetrahidrofolato, y son metilados en las células de la mucosa. (BAILEY et al, 2001) La forma predominante en el plasma es el 5-metiltetrahidrofolato, la que es ligada libremente a albúmina, con un pequeño porcentaje unido con alta afinidad a la proteína ligadora de folato. El transporte de folatos a través de las membranas de ciertos tejidos,

incluyendo riñón, placenta, y plexo coroideo, ocurre vía proteína ligadora de folato asociada a membranas, que actúa como un receptor de membranas, facilitando así el ingreso tisular de folato. Una vez dentro de las células, el 5-metiltetrahidrofolato es demetilado y convertido a la forma poliglutamato por una sintetasa. Debido a que el folato poliglutamato no atraviesa las membranas celulares como resultado de la carga de su cadena lateral, el folato queda secuestrado dentro de la célula. Antes que sea liberado de los tejidos a la circulación, el folato poliglutamato es reconvertido a monoglutamato por la hidrolasa poliglutamato (ROSNBLATT, WHITEHEAD, 1999).

Los hallazgos más comunes asociados con la deficiencia de folatos son la anemia megaloblástica y trastornos de nervios periféricos, médula espinal y trastornos psiquiátricos depresivos. (BOTTIGLIERI et al, 1994; PRUTHI, TEFFERI, 1994). Se ha demostrado que los niveles de folato plasmático son más altos en la sangre de cordón que en la sangre materna (HENDERSON et al, 1995). Se conoce como biodisponibilidad del hierro, a la proporción del hierro dietario que es absorbido y utilizado por el cuerpo. El principal factor que influye sobre la biodisponibilidad de este mineral es su forma química. El hierro se presenta en la naturaleza como: hierro hemínico y hierro no hemínico. El hierro hemínico forma parte exclusivamente de alimentos de origen animal, ya sea como hemoglobina y/o mioglobina (SHARMA, 2003). El hierro no hemínico se encuentra principalmente en los alimentos de origen vegetal y su absorción está determinada por múltiples factores dietarios que favorecen o impiden su solubilidad. El hierro no hemínico requiere de un pH ácido para reducirse y pasar de Fe III a Fe II; la forma ferrosa se puede unir a complejos de bajo peso molecular que son solubles. Existen diferentes compuestos que contribuyen a estabilizar el Fe II, como el ácido clorhídrico, los ácidos orgánicos de los alimentos (ascórbico principalmente) y algunos aminoácidos (cisteína principalmente). Por el



contrario, otros compuestos presentes en los alimentos más bien dificultan su absorción. Entre estos se encuentran: los oxalatos, fitatos, taninos y algunos nutrientes inorgánicos como calcio y aluminio (QUINTERO, 2002). El porcentaje de absorción del hierro no hemínico depende exclusivamente del efecto concomitante de los alimentos ingeridos. Debido a la gran cantidad de factores que pueden determinar el porcentaje de absorción, la tasa varía entre el 2 y el 20% (SHARMA, 2003). Si bien es cierto que en algunas dietas puede presentarse el 2% de absorción, su biodisponibilidad puede incrementarse inclusive hasta cuatro veces más, si se vigilan adecuadamente los factores dietéticos (RUIZ et al, 2002). El hierro hemínico (derivado de hemoglobina y mioglobina de tejidos animales), es una importante fuente dietética de hierro porque es absorbido con mucha mayor eficiencia que el hierro no hemínico y más aún, porque potencia la absorción de este último. Su elevado porcentaje de absorción obedece a la estructura hemo, que le permite entrar directamente en las células de la mucosa del intestino en forma de complejo hierro-porfirina, es así como la presencia de sustancias inhibitoras o potenciadoras prácticamente no afectan su absorción, a excepción del calcio (MARTINEZ et al, 1999), que en condiciones muy especiales, puede ser un inhibidor hasta de la tercera parte del hierro hemínico ingerido. Del total de hierro que tiene la carne, entre el 45% al 60% se encuentra en forma hemínica, para efectos de cálculos sobre la estimación de hierro hemínico en la dieta, se utiliza como promedio 40% (VIDAL, FARRE, 2001).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE HIERRO EN LA SOJA**

Se seleccionan los granos de soja que se encuentren en perfecto estado morfológico. El lavado de la soja se realiza con agua potable a temperatura ambiente, y se procede a un secado manual. Posteriormente se procede a obtener la soja en polvo, primero se muele y luego se tamiza con un diámetro de grosor de la malla de 260 micrómetros, se tomaron 500 gramos de soja.

A continuación se pesan una cantidad de 20 gramos y se depositan:

10 gramos en un vidrio reloj, con 5 gotas de ácido nítrico libre de hierro y 5 minutos de calentamiento. Se adicionan 3 gotas de ferrocianuro de potasio.

10 gramos en un vidrio reloj, con 5 gotas de ácido nítrico libre de hierro y 5 minutos de calentamiento. Se adicionan 3 gotas de sulfocianuro de potasio.

### **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE HIERRO EN SOJA.**

Método gravimétrico

Se obtiene la soja en polvo, por el método anterior descrito.

Se pesaron 0.5, 1.0 y 2.0 gramos de soja en polvo, se colocan en un vaso de precipitado de 250 ml y se agregan ácido clorhídrico y agua, se colocan en baño de maría hasta disolución total de la muestra, luego se agrega cloruro de amonio y hidróxido de amonio hasta precipitar todo el hierro presente, se filtra y se transfiere a un crisol y se calienta en llama, se enfría el crisol y se pesa, se reporta el porcentaje de FeO y Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en la muestra.

Método Absorción Atómica

Se pesa 0.5 gramos de soja en polvo por triplicado, se colocan en crisoles y se adiciona ácido nítrico; se hace precenizas a 92°C por 1 hora y cenizas 105°C por 5 horas, se agrega ácido nítrico hasta disolución total de la muestra, se filtra y se afora a 25 ml.

### **EXTRACCION DEL ACIDO FOLICO**

Según los reportes bibliográficos la soya, el melón y las lentejas son alimentos con alto contenido de ácido fólico, por lo tanto es importante determinar su concentración y cual tiene mayor porcentaje para luego adicionarlo al yogurt.

Teniendo en cuenta las propiedades químicas de este compuesto se lleva a cabo la extracción tomando 100gr de cada muestra y añadiendo 100mL de NaOH 0.1 N, al cabo de

**TABLA 1.** Variación en el contenido de ácido fólico en yogurt con adición de soya, obtenido por diferentes métodos de extracción

Método de Extracción	Concentración Ácido Fólico en la muestra (ppm)	Microgramos de Ácido Fólico en 200ml de Yogurt
Agitación Magnética	2.54	5080
Microondas	2.58	5160
Ultrasonido	3.27	6540

12 horas de extracción se filtra el precipitado y se toma el extracto obtenido.

Una muestra de soya de 100gr también fue extraída con 100ml de  $H_2SO_4$  0.1 N, siguiendo el mismo procedimiento.

Como la soya presenta un mayor contenido de ácido fólico según la literatura (INHA, 1996) y análisis realizados se emplea este alimento como fuente natural de las vitaminas y se elabora un yogurt con adición de soya al 1.5% en peso. Para la determinación del analito en el yogurt elaborado se compara la extracción de la vitamina por 3 métodos: agitación magnética (10min.) ultrasonido (10min.) y radiación microondas (1 min). En un horno convencional de uso domestico marca Whirpool adaptado para tal fin; al 10% potencia).(Ver Tabla Nº 1).

Se toma un 1gr de yogurt con adición de soya y se añade 3 mL de KOH (0.1M) con el fin de extraer el compuesto de interés, luego se aplican los métodos mencionados; a cada extracto se adiciona 3 ml de  $H_2SO_4$  (0.1M) y 350  $\mu$ L de ácido tricloroacetico para precipitar las proteínas. Luego se afora cada extracto a 10mL con buffer fosfato (pH 6.5) centrifugamos por 2 horas a 1800 rpm y se filtra cada muestra con un cartucho PTFE de 0.45 $\mu$ m (VAHTERISTO et al, 1996; RICHTER, KINGTON, 2001).

Los extractos de soya, melón y lentejas obtenidos, se sometieron al mismo procedimiento con ultrasonido.

### ANALISIS CROMATOGRAFICO

Las muestras se analizaron por HPLC en fase reversa en un cromatógrafo líquido Agilent 1100 con bomba cuaternaria, columna Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 ( 150 mm \* 4.6 mm \* 0.5  $\mu$ m ) a

temperatura ambiente (18°C); la fase móvil utilizada fue Acetonitrilo: Buffer Acetato pH 3.5 en una relación 10:90 hasta 24:76 en 9 minutos, con un flujo de 0.5 mL/min.; se utilizó también un detector UV con arreglo de diodos y se cuantificó el compuesto de interés a 290 nm. Las extracciones se llevaron a cabo por triplicado para evaluar la precisión del método. La curva de calibración se hizo utilizando un patrón de ácido fólico marca MERCK (98%), con inyección por triplicado de 20  $\mu$ L. El nivel mínimo de detección del método cromatográfico fue 100ppb.

### CUANTIFICACION

A partir de un estándar con ácido fólico (MERCK 98%) se prepararon 6 soluciones patrón entre 0.800 y 100 ppm usando como solvente Buffer fosfato (pH 6.5).

Se analizan por triplicado estos patrones con las mismas condiciones cromatográficas teniendo así la curva de calibración respectiva (factor de correlación: 0.99988). (Ver figura Nº 1)

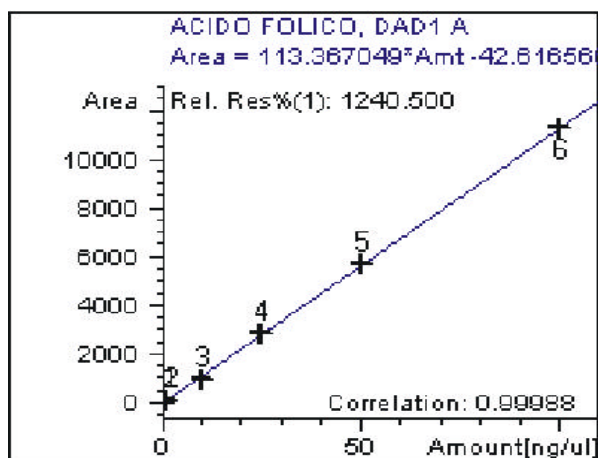


FIGURA Nº 1



**DISCUSION DE RESULTADOS**  
**DETERMINACION DE HIERRO EN LA**  
**SOJA**

Los ensayos con las muestras de soja que se le adicionaron 3 gotas de ferrocianuro de potasio (color azul) y con sulfocianuro de potasio (color rojo) fueron positiva, presencia de hierro (Ver figura N° 2)

**Método Gravimetrico**

Se obtiene la soja en polvo se pesan 0.5, 1.0 y 2.0 gramos de soja en polvo, se colocan en vasos de precipitado de 250 ml y se agrega ácido clorhídrico y agua, se coloca en baño de maría hasta disolución total de la muestra, luego se agrega cloruro de amonio y hidróxido de amonio hasta precipitar todo el hierro presente, se filtra y se transfiere a un crisol y se calienta en llama, se enfría el crisol y se pesa, se reporta el porcentaje de FeO y Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en la muestra

$$\text{Fe} = \frac{\text{FeO}}{\text{PM Fe}} = \frac{71}{55} = 1.29 \text{ (factor)}$$

% Fe =

$$\frac{(\text{peso del crisol} + \text{muestra} - \text{peso crisol}) * \text{factor} * 100}{\text{Muestra utilizada}}$$

Muestra: 0.5 gramos

%Fe= 3.61%

Muestra de 1.0 gramo

%Fe= 28.67%

Muestra de 2.0 gramos

%Fe= 8.1399%

Método Absorción Atómica

Tres muestras de 0.5 gramos diluidas y aforadas a 25 ml

$$0.5_{(1)} = \frac{325 \text{ mg Fe}}{100 \text{ gr}}$$

$$0.5_{(2)} = \frac{299 \text{ mg Fe}}{100 \text{ gr}}$$

$$0.5_{(3)} = \frac{269.5 \text{ mg Fe}}{100 \text{ gr}}$$

Teniendo como promedio  $\frac{297.83 \text{ mg Fe}}{100 \text{ gr}}$

Se identificaron también en la soja:

Sodio:  $\frac{46.51 \text{ mg Na}}{100 \text{ gr}}$

Potasio:  $\frac{1339.16 \text{ mg K}}{100 \text{ gr}}$

Calcio:  $\frac{34.69 \text{ mg Ca}}{100 \text{ gr}}$

**EXTRACCIÓN DEL ACIDO FÓLICO**

El contenido de ácido fólico en los extractos vegetales tratados con ultrasonido se reporta en la Tabla N° 2.

El melón y las lentejas presentan una cantidad

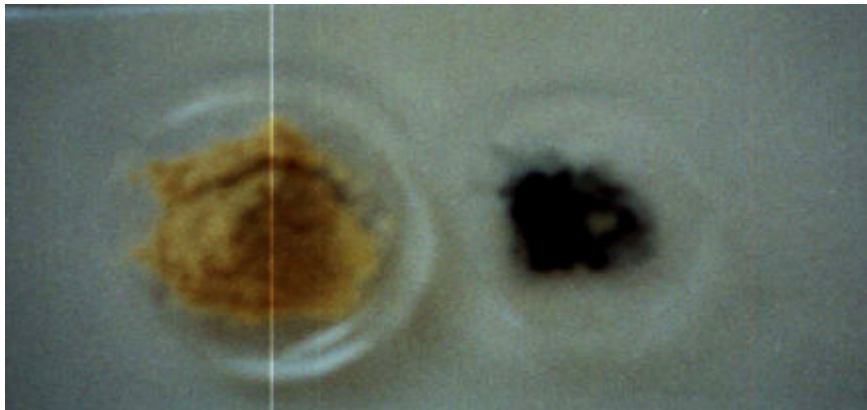


FIGURA N° 2





TABLA 2. Contenido Ácido fólico en extractos de fuentes naturales obtenidas por ultrasonido

Fuente Natural de Ácido Fólico	Concentración de Ácido Fólico en la Muestra (ppm)	Microgramo Ácido Fólico en 100gr de Muestra.
Melón	No Detectado	-
Lentejas	No Detectado	-
Soya (NaOH)	0.997	997
Soya (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.687	687

TABLA N° 3 Reproducibilidad del Método Cromatográfico

Concentración (ppm)	Área Replica 1	Área Replica 2	Área Replica 3	Promedio Área	Desviación Estándar	Coefficiente Desviación (%)
1.00	108.10	108.40	108.50	108.33	0.21	0.19
10.00	918.80	917.70	918.20	918.23	0.55	0.06
25.00	2800.00	2808.40	2788.80	2799.07	9.83	0.35

de ácido fólico menor a la que se puede detectar con el método de extracción empleado, mientras que la concentración del analito de soya si se pudo determinar con este procedimiento y se obtuvo mayor eficiencia en la extracción en medio básico (NaOH).

El ácido fólico presenta un tiempo de retención de 6.104 min. (Ver figura N° 3) analizado con las condiciones descritas. Para verificar la reproducibilidad del sistema Cromatográfico se inyectaron 3 replicas de los patrones, como se observa en la Tabla N° 3, los coeficientes de variación estuvieron por debajo de 5% que es el máximo permitido por las buenas practicas de laboratorio.

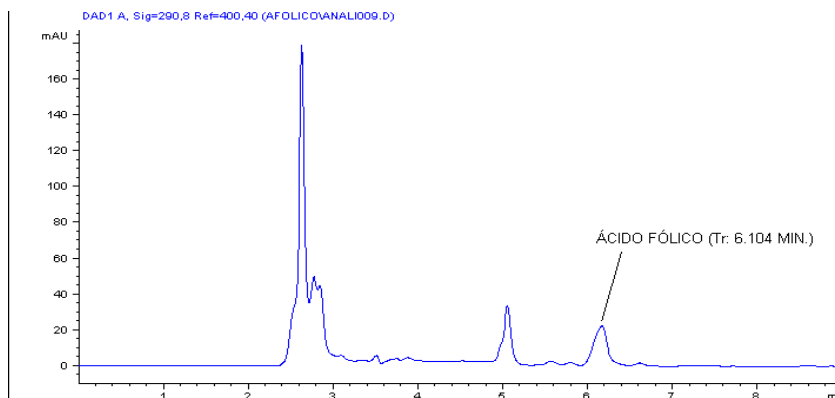
## CONCLUSIONES

Se desarrollo un método Cromatográfico adecuado para la cuantificación de ácido fólico en yogurt y extractos vegetales.

Se obtiene mayor concentración de ácido fólico a partir de yogurt aplicando el método de extracción por ultrasonido.

La extracción con solución alcalina (KOH 0.1 mol/L), con agitación ultrasonido por 10 minutos, se presenta como una alternativa adecuada de determinación de ácido fólico en yogurt con soya..

Se determina un sistema de detención a través de detector ultravioleta a 290 nanómetros, para yogurt y leches enriquecidas, debido a



Cromatograma ácido fólico presenta un tiempo de retención de 6.104 min. Muestra analizada por HPLC en fase reversa en un cromatógrafo líquido Agilent 1100.



disminución de interferencia de otros constituyentes de la muestra.

El patrón de ácido fólico se mantiene estable por 30 días en solución de tampón fosfato (pH 6.5) a temperatura de refrigeración (4°C). No obstante se sugiere un estudio multivariado más rígido sobre la estabilidad del ácido fólico.

La soya es una buena fuente natural de Hierro y ácido fólico y se puede emplear para producir un yogurt enriquecido con estos compuestos teniendo en cuenta la norma NTC 2457.

El yogurt con adición de Hierro y soya elaborado es una buena alternativa para las madres gestantes que necesitan contrarrestar la deficiencia de ácido fólico, ya que contiene los microgramos necesarios para su dieta.

## LITERATURA CITADA

Atukorala TMS, De silva LD, Dechering WHJC, Dassenaeike TSC, perera RS. Evaluation of effectiveness of iron-folate supplementation and anthelmintic therapy against anemia in pregnancy a study in the plantation sector of srilanka. *Am J Clin Nutr.* (1994); 60: 286-292.

Bailey L., Moyers S., Gregory J. Folate. Present knowledge in nutrition. 8th ed. ILSI Press Washington, DC. Chapter (2001) 21: 214-228.

Bottiglieri T, Hyland K, Reynolds EH. The clinical potential of ademetionine (S-adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drug* (1994); 48:137-52.

Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New Engl J Med* (1992);327:1832-5.

Henderson G., Pérez T., Schenker T., et al. Maternal to fetal transfer of 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: Evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery. *J Lab Clin Med* (1995); 126: 184-203.

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Tabla: Composición de alimentos y cantidades necesarias para el cumplimiento de las recomendaciones de ingestión de ácido fólico, (1996)

Martínez, C.;Ros, G.; Periago, Ma. J. y López, G. Biodisponibilidad del hierro en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* (1999);49 :106-113.

MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* (1991);338:131-135

Pruthi RK, Tefferi A. Pernicious anemia revisited. *Mayo Clin Proc* (1994); 69:144-50.

Quintero, G. A. Desarrollo de un alimento funcional a partir de hierro hémico y evaluación de su biodisponibilidad, para la prevención y corrección de la deficiencia de hierro. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. España; Noviembre, (2002).

Richter, Link, D. and Kington, H.M., *Analytical chemistry*, (2001), 30A-37A.

Rosnblatt D., Whitehead V. Cobalamin and Folate deficiency: Acquired and Hereditary Disorders in Children. *Seminars in Hematology* (1999); 36: 19-34.

Ruiz, G. M.; Picó, B. V.; Rosich, G. L. y Morales, L. L. El factor alimentario en la presencia de la deficiencia de hierro. *Revista Cubana de Medicina General e Integral* (2002);18 :46-52.

Sharma,K.K.Improving bioavaibility of iron in Indian diets through food-based approaches for the control of iron deficiency anemia. *Revista Alimentación, Nutrición y Agricultura* (2003);32:51-61

Vahteristo, L.,T., et al, *J. Agric. Food Chem.*, (1996)44, 477-482.

Vidal, M.y Farré, R. Evaluación antropométrica del estado nutricional y estimación de las ingestas de hierro y vitamina C de mujeres posmenopáusicas y hombres mayores de 45 años. *Revista de Nutrición Hospitalaria* (2001):162-169.

Recibido 08 Mayo 2007  
Aceptado 09 Octubre 2007