



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

1803

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD  
DE PRÁCTICA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUIMICA

Verificación del método para la identificación y cuantificación de vitamina A y D en  
leches fortificadas usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Lizeth Jazmin Bastidas Solarte

Maritza Santa Cruz Guerra  
Cooperativa Colanta

Julian Andres Zapata Ochoa  
Universidad de Antioquia

28/09/2021

# **Verificación del método para la identificación y cuantificación de vitamina A y D en leches fortificadas usando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).**

## **1. Resumen**

Las deficiencias de micronutrientes son responsables de daños funcionales serios en más de un tercio de la población del mundo, afectando la capacidad para el trabajo físico y aumentando la susceptibilidad a infecciones, entre otros efectos. La fortificación de alimentos básicos que consume la mayoría de la población, es la manera más eficaz para corregir las deficiencias de nutrientes esenciales, debido a la fácil adquisición, disponibilidad y bajo costo de estos.

Para Colanta surge la necesidad de establecer una política de nutrición, y de esta manera seguir ofertando a sus clientes productos de excelente calidad no solo por su sabor sino por su valor nutricional, así la identificación y cuantificación de vitamina A y D cobra importancia para la Cooperativa al iniciar un proyecto para la fortificación de sus productos, comenzando con la adición de dichas vitaminas en leche. En ese sentido se hace necesario la implementación y verificación del método de identificación y cuantificación de vitamina A y D para certificar y garantizar dicha concentración adicionada, además de dar cumplimiento a los requisitos de etiquetado establecidos en la Resolución 333 de 2011 del Ministerio de la Protección Social.

Con el presente trabajo se pretende realizar la verificación del método para la determinación de vitamina A y D en leche usando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo los lineamientos establecidos en la norma ISO 12080-2: 2009 y NTC 5044:2002.

## 2. Tabla de contenido

1.	<i>Resumen</i> .....	2
2.	<i>Tabla de contenido</i> .....	3
3.	<i>Marco teórico</i> .....	4
4.	<i>Objetivos (General y específicos)</i> .....	20
5.	<i>Metodología</i> .....	21
6.	<i>Resultados y discusión</i> .....	22
A.	<i>Resultados</i> .....	22
7.	<i>Productos esperados</i> .....	32
8.	<i>Conclusiones</i> .....	33
9.	<i>Recomendaciones</i> .....	34
10.	<i>Referencias bibliográficas</i> .....	35

### **3. Marco teórico**

En el año de 1964 un grupo de campesinos ganaderos de Donmatías, municipio ubicado al norte de Antioquia, decidieron conformar una cooperativa de trabajo que les permitiera comercializar mejor la leche de sus vacas, dándole por nombre a la cooperativa Colanta. Con más de tres mil asociados, la mayoría de ellos pequeños productores, Colanta es la cooperativa agroindustrial más importante del país. Esta produce y vende el 26 por ciento de la leche formal que se consume en Colombia [1].

El modelo cooperativo que desarrolla Colanta tiene cuatro objetivos principales: dignificar el sector rural, haciendo que la compra y venta de la leche de sus productores sea justa; lograr que los agricultores no abandonen el campo; generar empleo campesino e implementar tecnología y procesos productivos especializados, para que los productos sean de alta calidad e inocuos para el consumo humano. El enfoque está puesto en que los asociados, sean pequeños, grandes o medianos productores, encuentren estabilidad y rentabilidad en la producción de la leche.

Una bolsa de leche puede durar más de siete días dentro de la nevera, luego de ser abierta. Lograr que las fechas de vencimiento sean las más amplias del mercado, han hecho de Colanta una cooperativa líder. Sin embargo, tras las fechas de vencimiento, hay procesos de tecnología y transferencia de conocimiento que la cooperativa hace con los productores, para que la calidad de sus productos sea su principal valor diferencial. Cada asociado de la cooperativa tiene la oportunidad de producir una leche de altos estándares de calidad, equivalente a los estándares internacionales. Para cumplir este objetivo, Colanta presta asistencia técnica a sus productores en implementación de tecnología de cuidado y ordeño del ganado, cultivo de pastos más productivos y el mejoramiento de la genética y la reproducción. En la constante búsqueda de mejorar la calidad de sus productos y seguir impulsando el agro colombiano surge la necesidad de adaptarse a nuevos mercados con nuevas necesidades, un ejemplo claro de esto es la búsqueda de la fortificación de sus productos lácteos para de esta manera no solo entregar un mejor producto sino contribuir en la buena nutrición de la población.

La fortificación hace referencia a la adición de un nutriente o componente que el alimento ya contenía. La fortificación de alimentos básicos que consume la mayoría de la población, es la manera más eficaz para corregir las deficiencias de nutrientes esenciales en una población, debido a la fácil adquisición, disponibilidad y bajo costo de estos; además la fortificación es socialmente aceptable y no requiere cambios en las prácticas dietarias [2]. La leche es un alimento insustituible en todas las etapas de la vida dentro de una dieta equilibrada. Numerosas investigaciones han demostrado el papel que desempeñan la leche y sus derivados como vehículos de nutrientes esenciales para el adecuado funcionamiento del organismo [3].

No obstante, la fortificación de alimentos apoya otras líneas de acciones y por lo tanto debe considerarse como parte de un enfoque amplio e integral para prevenir la deficiencia de micronutrientes en la población. En la actualidad hay distintas técnicas en uso; la elección del método depende del nutriente y del alimento, se resaltan los siguientes [4]:

- Enriquecimiento o fortificación masiva, suele ser propiciado por los gobiernos en casos en que exista una ingesta insuficiente a nivel poblacional, con consecuencias negativas para la salud pública.
- Fortificación de alimentos específicos, en la cual los nutrientes se adicionan a alimentos dirigidos a subgrupos específicos de la población, por ejemplo alimentos complementarios para lactantes y niños de corta edad, alimentos desarrollados para programas de alimentación escolar, galletas especiales para los niños y las mujeres embarazadas, y las raciones para la alimentación de emergencia y personas desplazadas.
- Fortificación voluntaria, impulsada por el mercado, en los casos en que una determinada empresa productora de alimentos toma la iniciativa de agregar cantidades específicas de uno o más micronutrientes en alguno de sus productos. En la Unión Europea, por ejemplo, los alimentos procesados y fortificados han demostrado ser una fuente sustancial de micronutrientes como el hierro, y las vitaminas A y D.

A continuación se describe parte de la estrategia nacional para la prevención y control de las deficiencias de micronutrientes en Colombia según el ministerio de salud [5]. Este proceso se caracteriza por ser una medida de bajo costo, de fácil implementación, si se emplean concentraciones de nutrientes de acuerdo a las necesidades fisiológicas de los individuos o grupos poblacionales, no representa riesgos en los niveles de ingesta y puede lograr impacto a corto o mediano plazo, dependiendo de la cantidad y la frecuencia de consumo. En la tabla 1 se presenta la dupla nutriente y tipo de alimento que se han utilizado a nivel mundial en el marco de programas de fortificación.

**Tabla 1.** Algunos alimentos utilizados como vehículos en programas de Fortificación.

<b>Nutriente</b>	<b>Tipo de alimento</b>
<b>Ácido ascórbico</b>	Frutas y bebidas enlatadas, congeladas y secas, productos lácteos enlatados, productos de cereales secos
<b>Tiamina, Riboflavina y Niacina</b>	Cereales secos, harina, pan, pasta, productos lácteos
<b>Vitamina A o beta-caroteno</b>	Productos de cereales secos, harina, pan, pasta, productos lácteos, margarinas, aceites vegetales, azúcar, té, chocolate
<b>Vitamina D</b>	Productos lácteos, margarina, productos de cereales secos, aceites vegetales, bebidas de fruta
<b>Calcio</b>	Productos de cereales, pan
<b>Hierro</b>	Productos de cereales, pan, leche en polvo enlatada
<b>Yodo</b>	Sal
<b>Proteína</b>	Productos de cereales, pan, y harina de yuca
<b>Aminoácidos</b>	Cereales, pan y sustitutos de la carne

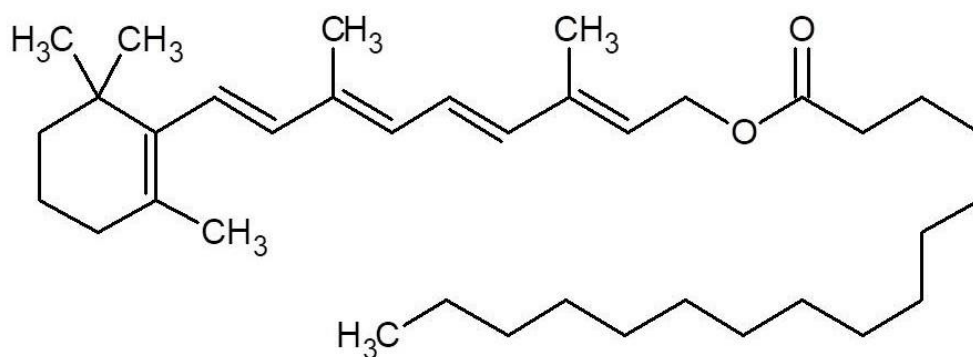
Concretamente, la leche es un excelente vehículo de nutrientes que permite ser enriquecida fácilmente gracias a sus propiedades físico-químicas (densidad, pH, punto crioscópico, punto de ebullición, conductividad eléctrica), por su elevada biodisponibilidad, facilitada por fosfopéptidos de las propias proteínas lácteas, lactosa y otros componentes, especialmente iones tales como fosfato, citrato y lactato, así como por la ausencia de inhibidores de la absorción, como fitatos y oxalatos presentes en otras fuentes, especialmente vegetales, como cereales, legumbres, semillas oleaginosas y algunas verduras [6]. La mayoría de la leche descremada y semidescremada que se produce a nivel mundial es enriquecida con vitamina A y D, esto debido a que la cantidad de vitamina A y D es proporcional a la cantidad de grasa presente en la leche, mismas que se pierden al descremar debido a que estas vitaminas son liposolubles. Por esta razón, las leches semidescremadas y descremadas son alimentos ideales para fortificar con vitaminas A y D.

Las vitaminas son sustancias orgánicas presentes en cantidades muy pequeñas en los alimentos, pero necesarias para el metabolismo. Se agrupan en forma conjunta no debido a que se relacionen químicamente o porque tengan funciones fisiológicas semejantes, sino debido, como su nombre lo implica, a que son factores vitales en la dieta, además de que todas se descubrieron en relación con las enfermedades que causan su carencia. Aún más, no encajan en otras categorías de nutrientes (carbohidratos, grasas, proteínas y minerales o metales traza) [7]. Las vitaminas, aunque presentan estructuras químicas muy diversas, se clasifican en dos grandes grupos: hidrosolubles y liposolubles; esta clasificación permite establecer una serie de características y comportamientos comunes a las vitaminas que constituyen cada grupo. Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), grupo en las que se encuentran aquellas en las que se centra este trabajo (A y D), se absorben en el tracto gastrointestinal mediante mecanismos pasivos y a continuación se transportan en quilomicrones<sup>1</sup>. [8]

---

<sup>1</sup> Los quilomicrones son lipoproteínas que se sintetizan en las células epiteliales del intestino. Son grandes partículas esféricas que transportan los triglicéridos y el colesterol en la sangre hacia los tejidos.

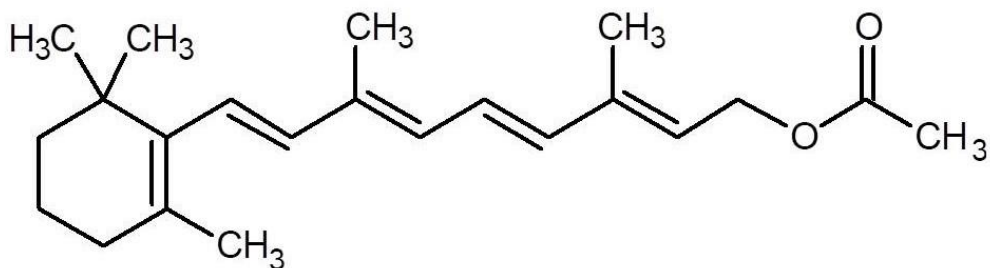
La vitamina A se descubrió en 1913, cuando los investigadores encontraron que ciertos animales de laboratorio dejaban de crecer si la manteca (hecha con grasa de cerdo) era la única forma de grasa presente en la dieta, pero, si se suministraba mantequilla en vez de manteca (la dieta en otros aspectos permanecía igual) los animales crecían y se desarrollaban. Los estudios posteriores con animales demostraron que la yema de huevo y el aceite de hígado de bacalao contenían el mismo factor alimenticio vital, que se denominó vitamina A [7]. El retinol<sup>2</sup> es la forma principal de vitamina A en las dietas humanas. En su forma cristalina pura, es una sustancia amarilla-verdosa pálida. Es soluble en grasa, pero insoluble en agua, y se encuentra únicamente en productos animales. Como hoy existe disponibilidad de vitamina A pura y cristalina comercializada como alcohol retinol, su concentración y actividad en los alimentos se expresa y mide en equivalentes de retinol (ER) en vez de unidades internacionales (UI) que se usaban anteriormente. Una UI de vitamina A equivale a 0,3 µg de retinol [9]. La vitamina A se encuentra principalmente como retinol, retinal y ácido retinoico. Se almacena como retinol esterificado a ácidos grasos, principalmente como retinol palmitato (figura 1) y en una menor proporción en retinol acetato (Ver Figura 2) [10].



**Figura 1.** Estructura de retinol palmitato.

<sup>2</sup> Retinol es el nombre químico del derivado alcohólico, y se utiliza como patrón de referencia.





**Figura 2.** Estructura retinol acetato

En 1929-1931, Paul Karrer (Nobel de Química en 1937) determinó por primera vez la estructura de la vitamina A. Todas las formas de la vitamina A (retinol, retinal y ácido retinoico) presentan, en la cadena del polieno, cuatro de los cinco dobles enlaces que pueden dar lugar diferentes isómeros geométricos (configuración cis o trans). Sin embargo, los isómeros cis son menos estables y pueden convertirse fácilmente a la configuración trans. Por otro lado, algunos isómeros cis se encuentran de forma natural y realizan funciones esenciales en el organismo. Por ejemplo, el isómero 11-cis-retinal es el cromóforo de la rodopsina, la molécula fotorreceptora de los vertebrados. La rodopsina está formada por la molécula de 11-cis-retinal unida covalentemente a través de una base de Schiff a la proteína opsina. Así, el proceso de visión se basa en la isomerización inducida por la luz del cromóforo de 11-cis a trans que resulta en un cambio de conformación y activación de la molécula fotorreceptora [11].

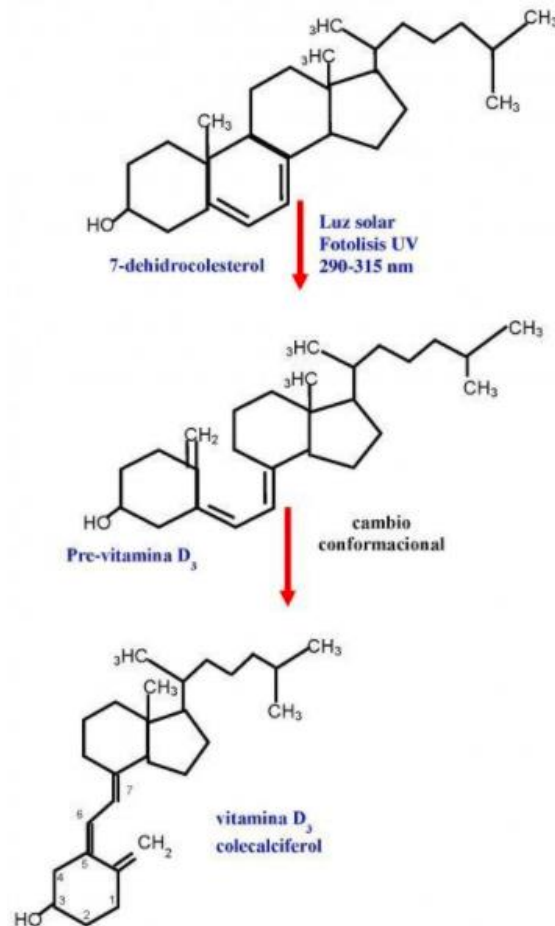
El calentamiento en ausencia de oxígeno puede producir la isomerización del retinol (trans) para formar el 13-cis retinol, que tiene una potencia vitamínica de alrededor del 75% de la del tras. También se pueden formar otros isómeros, como el 11-cis y el 9-cis, con una potencia vitamínica del orden del 25% de la del trans. En el caso de la leche, la pasterización produce la isomerización de entre el 3 y el 7%, dependiendo de la temperatura y tiempo de tratamiento. En el tratamiento UHT, este porcentaje es de alrededor del 16%, mientras que en la leche esterilizada en botella, o en algunos quesos, la isomerización puede llegar al 35%. A pH por debajo de 4,5, el efecto del calor es más marcado, aumentando la isomerización e hidrolizándose los ésteres de retinol. El retinol

no esterificado es más fácilmente alterable. El isómero 9 cis se forma en el procesado térmico, pero fundamentalmente por la acción de la luz. En el procesado térmico de los vegetales, especialmente en el enlatado, se producen también pérdidas del valor vitamínico del b caroteno, por isomerización. Sin embargo, estas pérdidas quedan compensadas largamente por la mejora de la biodisponibilidad, si se compara con el valor vitamínico del alimento crudo [12].

La vitamina D se asocia con la prevención del raquitismo y su homólogo en el adulto la osteomalacia o ablandamiento de los huesos. Durante muchos años se sospechó que el raquitismo se debía a carencias nutricionales, y en ciertas partes del mundo se utilizó para su tratamiento aceite de hígado de bacalao. En efecto, en 1919 Sir Edward Mellanby, en estudios efectuados en cachorros de perro, señaló sin dudas que la enfermedad era de origen nutricional y que respondía a la vitamina D contenida en el aceite de hígado de bacalao. Más adelante se demostró que la acción de la luz solar en la piel producía la vitamina D utilizada por los seres humanos [7]. Ciertos compuestos, todos esteroides íntimamente relacionados con el colesterol, poseen propiedades antirraquíticas. Se descubrió que ciertos esteroides que no tenían estas propiedades pasaban a ser antirraquíticos al exponerlos a la luz ultravioleta. Los dos esteroides importantes activos son la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) y la vitamina D<sub>3</sub> (colecalciferol). La estructura química de ambos es la de ciclopentanoperhidrofenantreno, típico de los esteroides. Las dos formas tienen la misma actividad en el hombre, por lo tanto se utiliza el término vitamina D para las dos formas.

La vitamina D es una prohormona y se convierte a la hormona activa (calcitriol) a través de un mecanismo de síntesis muy regulado. La síntesis de colesterol en el hígado por medio de Acetil CoA es el primer paso, después de varios cambios complejos se llega a un intermediario llamado 7-dehidrocolesterol. Cuando los rayos UV entran en contacto con la piel este 7-dehidrocolesterol sufre unas transformaciones produciendo vitamina D<sub>3</sub>. Esta vitamina D<sub>3</sub> no es biológicamente activa por lo tanto debe ser sometida a dos hidroxilaciones: la primera en el hígado formando 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol) y la

segunda en el riñón formando 1,25-dihidroxicolecalciferol también llamada calcitriol (forma activa) (figura 3). La 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D es la forma activa de la vitamina D [13].



**Figura 3. Estructura química de la vitamina D**

En los seres humanos, cuando la piel está expuesta a los rayos ultravioleta de la luz solar, se activa un compuesto esteroide para formar vitamina D, que entonces queda disponible para el cuerpo y que tiene exactamente la misma función que la vitamina D consumida en los alimentos. La función de la vitamina D en el cuerpo es permitir la absorción adecuada del calcio. La vitamina D que se forma en la piel o que se absorbe de los alimentos actúa como una hormona e influye el metabolismo del calcio. El raquitismo y la osteomalacia, enfermedades en las que hay carencia de calcio en ciertos tejidos, no se deben a la carencia de calcio en la dieta sino a la falta de vitamina D que

permita la correcta utilización del calcio de los alimentos. La vitamina D con frecuencia se expresa en unidades internacionales: 1 UI equivale a 0,025 µg de vitamina D3 [7].

De acuerdo a la resolución 333 del 2011 del Ministerio de Protección Social, la cual establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano, en el capítulo IV, artículo 13, se presentan los valores diarios de referencia de nutrientes para niños mayores de seis meses y menores de 4 años de edad y niños mayores de cuatro años y adultos, así los valores establecidos para la vitamina A y D se presentan en la siguiente tabla [14].

**Tabla 2.** Valores diarios en vitaminas.

<b>Nutriente</b>	<b>Unidad de Medida</b>	<b>Niños mayores de 6 meses y menores de 4 años</b>	<b>Niños mayores de 4 años y adultos</b>
<b>Vitamina A</b>	Unidades Internacionales	1332 UI	5000 UI
<b>Vitamina D</b>	microgramos/Unidades Internacionales	5 µg / 200 UI	10 µg / 400 UI

Adicionalmente, según el capítulo III de la Resolución 333 la declaración de nutrientes debe ser obligatoria para todo alimento que declare cualquier tipo de información nutricional, propiedades nutricionales o de salud, o cuando su descripción en la etiqueta produzca el mismo efecto de las declaraciones de propiedades nutricionales o de salud. Así mismo, deberán declararse obligatoriamente en la tabla nutricional, el valor energético y las cantidades de los nutrientes que se indican a continuación (Cantidad de referencia para la leche igual a 240mL):

**Vitamina A.** Las cantidades de vitamina A, deben expresarse con el número entero más cercano a la unidad en porcentajes del valor diario (%VD) por porción del alimento y en intervalos de 2%, desde el 2% hasta e incluyendo el 10% del valor de referencia; en

intervalos de 5% desde el 10% hasta e incluyendo el 50%, y en intervalos de 10% para valores superiores al 50% del valor de referencia. La declaración de vitamina A no es obligatoria para alimentos que contienen cantidades inferiores al 2 % del valor de referencia por porción del alimento. Si estas vitaminas y minerales no se declaran, deberá figurar al final de la Tabla de Información Nutricional cualquiera de las siguientes expresiones: "contiene menos del 2 % de..." o "No es una fuente significativa de..." seguido de las vitaminas y minerales que no se declaran [14].

**Vitamina D.** La vitamina D se debe declarar con los valores de referencia en la tabla 1 y hayan sido adicionados al alimento en cantidades iguales o superiores al 2% del valor de referencia por porción del alimento. Estas vitaminas y minerales deben expresarse con el número entero más cercano a la unidad en porcentajes del valor diario (%VD) por porción del alimento y en intervalos de 2%, desde el 2% hasta e incluyendo el 10% del valor de referencia; en intervalos de 5% desde el 10% hasta e incluyendo el 50%, y en intervalos de 10% para valores superiores al 50% del valor de referencia [14].

El análisis de vitaminas en los alimentos es un gran desafío para los químicos analíticos dado que se asocia con problemas significativos. Muchos de estos problemas han sido eliminados gracias a los recientes avances en la tecnología y el desarrollo de nuevos enfoques analíticos. Todos los antiguos métodos biológicos utilizados para determinar o incluso demostrar la actividad biológica de las vitaminas, han sido en la actualidad reemplazados por métodos microbiológicos. También se han aplicado métodos físico-químicos, principalmente cromatográficos, GC<sup>3</sup> y LC<sup>4</sup>, para solucionar muchos problemas relacionados con el análisis de las vitaminas.

La mayoría de las vitaminas son sensibles a la luz y algunas se oxidan muy rápidamente. Por lo tanto, es necesario evitar la luz solar directa y la luz brillante y utilizar material de vidrio ámbar para prevenir la degradación. Dado que el calor también contribuye a la

---

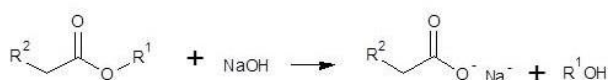
<sup>3</sup> Cromatografía de gas

<sup>4</sup> Cromatografía líquida

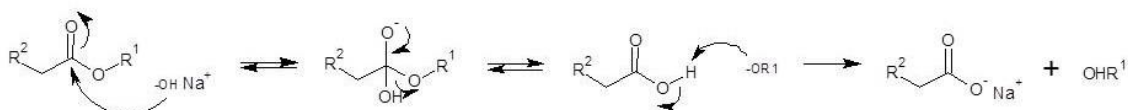
isomerización o a una posterior alteración de las vitaminas, debe evitarse el calor innecesario.

Para la vitamina A la mayoría de los procedimientos de análisis utilizan una etapa de saponificación<sup>5</sup> (figura 4) antes de la extracción con un disolvente orgánico adecuado. Las condiciones para la saponificación pueden variar, pero en general, la muestra se saponifica preferentemente bajo nitrógeno utilizando una mezcla de hidróxido de potasio acuoso, etanol o metanol, agua y con la adición de un antioxidante como ácido ascórbico, pirogalol o butilhidroxitolueno (BHT). Principalmente pueden utilizarse dos modos de cromatografía (fase normal y fase reversa) para la cuantificación de la vitamina A. En algunos de los sistemas cromatográficos, se logra una separación entre el trans-retinol y el 13-cis-retinol.

Reaccion general saponificación



Mecanismo general



**Figura 4.** Mecanismo de reacción general en la saponificación

Las vitaminas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> son extraídas de los alimentos mediante saponificación utilizando una disolución alcohólica de hidróxido de potasio seguida de una extracción en disolvente. La determinación en el extracto de la muestra se realiza mediante LC en fase normal seguida por LC en fase reversa analítica. Se usa un detector UV [15].

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es una de las técnicas de cromatografía más utilizadas debido a su capacidad de separar analitos de distinta

<sup>5</sup> Proceso químico de la hidrólisis de un éster en un medio básico.

naturaleza presentes en una mezcla. Su aplicación industrial abarca la farmacéutica, la bioquímica, los alimentos, los productos de la industria química, la medicina clínica y la química forense. No obstante, esta amplitud de aplicaciones dificulta la toma de decisiones a la hora de desarrollar un proceso de separación por esta técnica, más si es el primer acercamiento a HPLC. Este artículo expone los conceptos básicos para el desarrollo de una primera separación; igualmente, plantea los principios de la HPLC y presenta las partes más representativas del equipo con el fin de poder entender la estructura del método propuesto [16].

El HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan las fases móviles y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla [17]. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London: fuerzas intermoleculares débiles que surgen de fuerzas interactivas entre multipolos temporales en moléculas sin momento multipolar permanente.
- Las interacciones dipolo: Consiste en la atracción electrostática entre el extremo positivo de una molécula polar y el negativo de otra.
- Las interacciones por puente de hidrógeno: Es la fuerza eminentemente electrostática atractiva entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo.
- Interacciones dieléctricas: Es una propiedad macroscópica de un medio dieléctrico relacionado con la permitividad eléctrica del medio.

- Interacciones electroestáticas: Es la que se ejerce entre cargas en reposo.

El tipo de cromatografía más utilizado suele ser en fase normal y fase reversa. Ambos métodos se emplean con base en la polaridad.

- La cromatografía en fase normal consiste en una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, la fuerza de la absorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto [18].
- La cromatografía en fase reversa consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada, el tiempo de retención aumenta o disminuye dependiendo de la naturaleza del compuesto en general un compuesto con una cadena muy alquil muy larga presenta tiempos de retención mayores por la hidrofobicidad de la molécula. En cambio un compuesto con ramificaciones suele presentar tiempos de retención cortos pues la superficie total se ve reducida [18].

Esta técnica se caracteriza por tener ciertas ventajas dentro de las cuales se encuentran:

- Amplio rango de aplicabilidad debido a la alta disponibilidad de equipos, columnas y demás materiales, que la hacen capaz de analizar casi cualquier mezcla deseada [19].
- Alta precisión en sus resultados ( $\pm 0.5\%$  o menor) [19].
- Variedad de técnicas, entre las cuales están la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular [19].
- Fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil [19].
- No es destructiva, es decir, los compuestos separados en la columna pueden ser recolectados, lo que permite el uso de la HPLC como una técnica de preparación o purificación de muestras [19].
- Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada [19].
- Alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos [20].
- Alto poder de separación con detección sensible [20].
- La operación es flexible, personalizable y automatizada [20].



La selección del método de HPLC para la realización del proyecto se debe a que es una técnica rápida para el análisis y separación de mezclas. Los avances tecnológicos relacionados con esta técnica permiten analizar una amplia gama de analitos de manera eficiente y precisa. Es por esto que se han propuesto varios métodos para poder establecer las mejores condiciones y se han desarrollado equipos para la separación de muestras de diferentes naturalezas.

Los métodos analíticos que se apliquen para producir datos de composición química de alimentos deben ser apropiados, utilizar técnicas analíticas exactas y ser realizados por analistas entrenados. Es evidente que el método de análisis seleccionado para un nutriente debe reflejar lo más fielmente posible el valor nutritivo del alimento. En esta elección de un método particular, se debe conocer, en primer lugar la química del nutriente, la naturaleza del sustrato alimenticio a ser analizado, el efecto del procesamiento y la preparación sobre la matriz del alimento y en el nutriente, y el rango esperado de concentración del nutriente. El segundo requisito es comprender las implicancias nutricionales del nutriente, lo cual incluye su rol, su distribución en los alimentos y su importancia relativa en alimentos individuales en el suministro dietario total del nutriente [21]. En la elección de un método se debe focalizar la atención en los principios analíticos involucrados, más que en el grado de sofisticación del instrumento. Muchas veces un método con uso de instrumentos modernos puede producir valores menos confiables que el método tradicional que pretende reemplazar y es preferible desarrollar programas que aseguren la calidad de los datos obtenidos.

Se puede encontrar tres tipos de métodos:

- Métodos normalizados: Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente.
- Métodos no normalizados: Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia.

- Métodos modificados: Método analítico desarrollado por un tercero o que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado.

La validación hace referencia a la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista. Tomando como base lo dicho en la norma NTC-ISO/IEC 17025 el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de sus alcances previstos o modificados de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados. La validación puede incluir procedimientos para muestreo, manipulación y transporte de los ítems de ensayo o calibración.

Los métodos validados poseen unas características de desempeño las cuales deben ser pertinentes para las necesidades que se presenten y deben ser coherentes con los requisitos especificados. Estas pueden incluir, pero no se limitan a:

- Precisión: Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares bajo condiciones especificadas.
- Precisión intermedia: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.
- Reproducibilidad: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.
- Exactitud: Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando. El concepto “exactitud de medida” no es una magnitud y no se expresa numéricamente. Se dice que una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida.
- Incertidumbre de medición: Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando a partir de la información que se utiliza.
- Límite de detección: Menor contenido de analito, si está presente, que será detectado y que puede ser identificado.

- Límite de cuantificación: Menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con un aceptable nivel de incertidumbre.
- Selectividad: Es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar el analito en presencia de interferentes. Generalmente los interferentes se encuentran en la matriz de análisis.
- Linealidad: Capacidad de un método de análisis dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.
- Repetibilidad: Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

La verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación. Según la NTC-ISO/IEC 17025 el laboratorio debe verificar que puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido. Se deben conservar registros de la verificación. Si el método es modificado por el organismo que lo publicó, la verificación se debe repetir, en la extensión necesaria. Si el laboratorio considera que alguno de los parámetros para la verificación de los procedimientos, no aplica en función al método seleccionado, esta decisión debe ser justificada técnicamente.

## **4. Objetivo general**

Implementar los métodos expuestos en las normativas ISO 12080-2 2009 y NTC 5044 del 2002 para cuantificar las vitaminas A y D en cualquier tipo de matriz leche.

### **4.1 Objetivos Específicos**

- Estandarizar el método bajo las condiciones de laboratorio de calidad de leche (LCL) sede San Pedro para la determinación de vitamina A y D por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, bajo el requerimiento de la norma ISO 12080-2 2009 y NTC 5044 del 2002, respectivamente.
- Verificar mediante evaluación de parámetros de desempeño analítico e interpretación estadística de resultados, que el método utilizado para la determinación de vitamina A y D si cumple con los requerimientos necesarios que permiten la obtención de resultados confiables.
- Realizar análisis de muestra para demostrar que la leche fortificada producida cumple con la declaración de la vitamina A y D.

## **5. Metodología**

Se hace uso de una metodología normalizada donde por medio de la técnica de HPLC que se adapta de acuerdo a las normas ISO 12080-2 2009 y NTC 5044 del 2002, se busca cuantificar la cantidad de vitamina existente en la leche fortificando que Colanta está iniciando a producir.

Para esto el grupo de trabajo realiza un proceso donde busca estandarizar el método para la determinación de vitamina A y D por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, bajo el requerimiento de la norma ISO 12080-2 2009 y NTC 5044.2002, respectivamente. Esto en búsqueda de que las cantidades de vitamina encontradas cumplan con la resolución 333 del 2011.

La Verificación del método es realizado mediante la evaluación de parámetros de desempeño analítico e interpretación estadística de resultados como lo son la precisión, precisión intermedia, reproducibilidad, exactitud, incertidumbre de medición, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, linealidad y repetibilidad. De esta manera demostrar que el método utilizado para la determinación de vitamina A y D si cumple con los requerimientos necesarios que permiten la obtención de resultados confiables.

Finalmente se realiza análisis de muestra para demostrar que la leche fortificada producida cumple con la declaración de la vitamina A y D expuestos en la resolución 333 del 2011.

## 6. Resultados y discusión

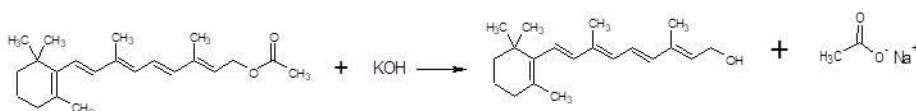
### A. Resultados

Se estructuró el formato de plan de verificación según la norma ISO 12080-2 2009 y NTC 5044.2002 para la identificación de vitamina A y vitamina D, los parámetros de desempeño que se pretenden analizar son: selectividad, precisión, rango de trabajo, linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), veracidad e incertidumbre. Los criterios de aceptación tomados en cada parámetro, se basan en el método según la norma ISO 12080-2 2009 y NTC 5044.2002, la AOAC, ICH Q2, Pharmacopea y FDA (anexo 1).

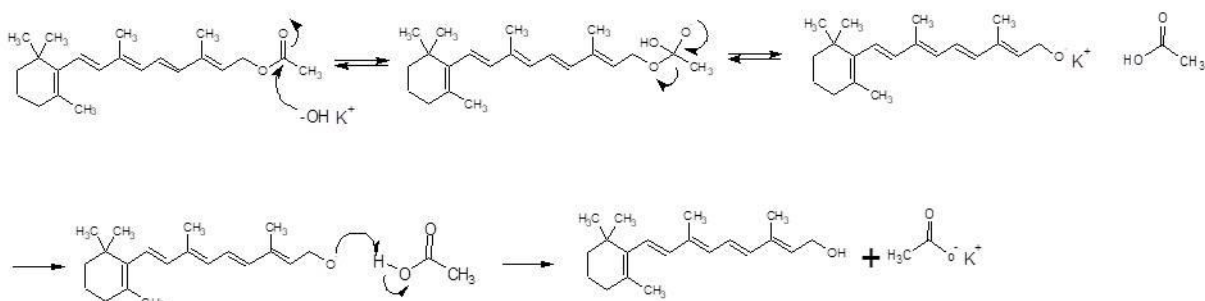
Se colocó en plan de acción el formato de verificación, empleando la norma ISO 12080-2 2009 y NTC 5044.2002. Estas normas se basan en la detección y cuantificación de la vitamina A (retinol acetato y palmitato) y D, por medio de la técnica (HPLC); para esto emplean una reacción de saponificación.

La vitamina A, se saponifica con el fin de obtener el alcohol retinol, proveniente de sus dos principales formas, acetato de retinol y palmitato de retinol (figura 5).

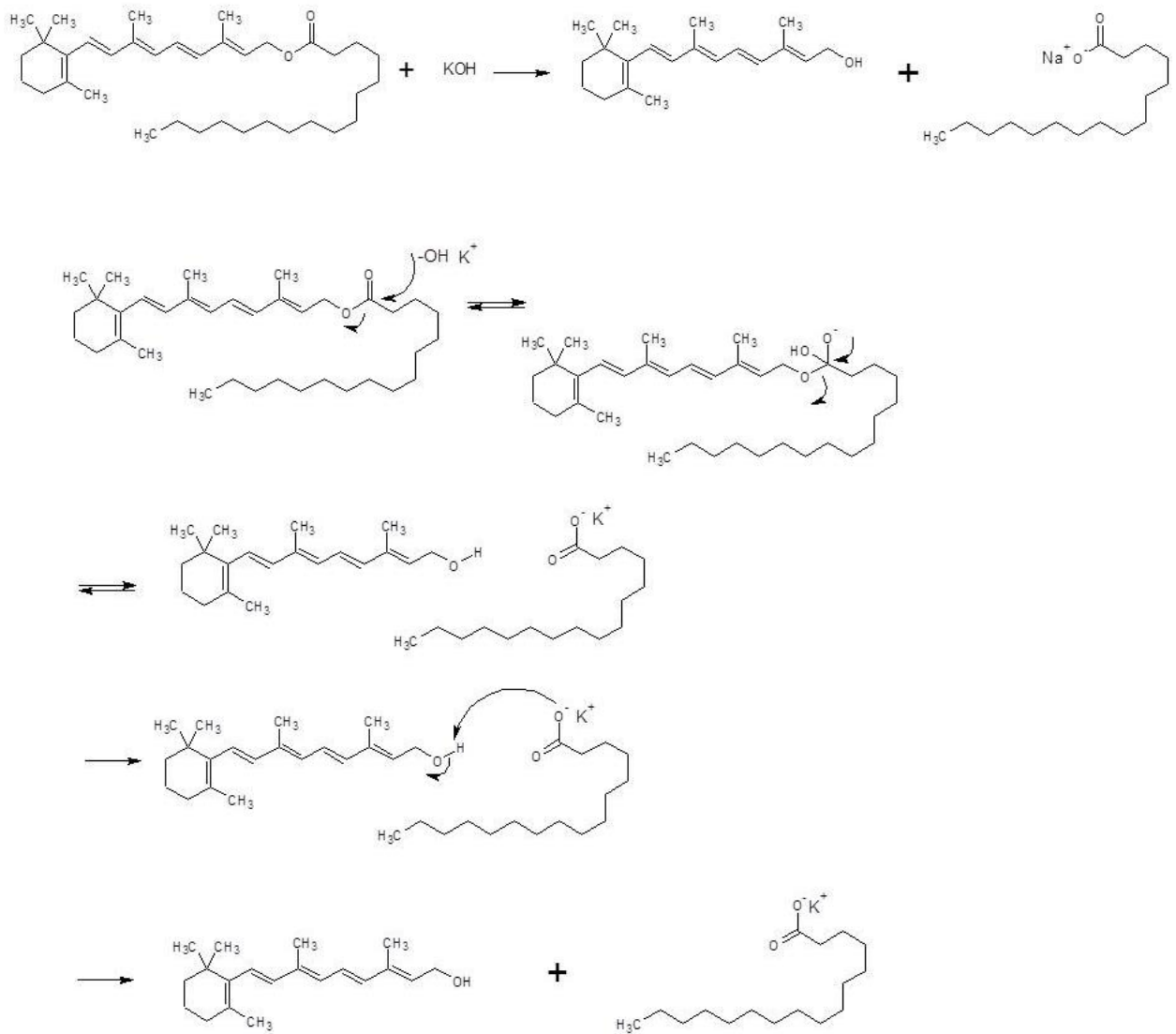
Reaccion saponificación - Vitamina A - Retinol acetato



Mecanismo Vitamina A - Acetato de retinol



Reacción saponificación - Vitamina A - Palmitato de retinol



**Figura 5.** Reacción y mecanismo de saponificación: A: Acetato de retinol y B. Acetato de palmitato

Para empezar la implementación del método para vitamina A, se realizó un primer ensayo donde, se prepararon dos muestras fortificadas con diferentes marcas de vitamina A en leche pasteurizada proveniente de la cooperativa Colanta y un estándar de vitamina A, para obtener las concentraciones requeridas por la división comercial (con base a la resolución 333 de 2011), se analizó por medio del protocolo del método normalizado (ISO 12080-2), para esto se llevó a cabo la reacción de saponificación y posterior extracción. Se identificó que la reacción se generó, debido a un cambio en el color de la muestra de

blanco a café oscuro. Se procedió a realizar el proceso extracción, donde se observó, la formación de emulsiones, para romper el equilibrio del sistema se adicionó, cloruro de sodio (NaCl) y metanol, sin embargo, aunque visualmente se apreció una disminución estas perduraron, debió a que la leche está compuesto mayoritariamente por partículas de grasa dispersas en el ambiente acuoso. Debido a la falta de implementación del sistema de nitrógeno (descrito en la norma) o el dispositivo evaporador rotativo, se almacenó el estrato en frascos ámbar a una temperatura de 4°C el día 16 de marzo de 2021. Se continuó el secado de las muestras (día 17 de marzo de 2021) y la reconstitución en las instalaciones de laboratorio de pedagogía de Química Orgánica de la Universidad de Antioquia (UdeA) donde se contaba con la implementación necesaria. Sin embargo, antes de hacer la reconstitución de las muestras se observó presencia de partículas de grasa (figura 6), que en el momento de realizar la reconstitución no fueron solubles en el solvente orgánico metanol grado analítico. Esto se atribuye a varios factores entre ellos:



**Figura 6.** Estrato de las muestras después de rotoevaporar.

- La reacción de saponificación: la reacción no se llevó a competición devolviendo el equilibrio del sistema (figura 7), debido a que no se alcanzó el umbral de energía por condiciones de tiempo y temperatura.



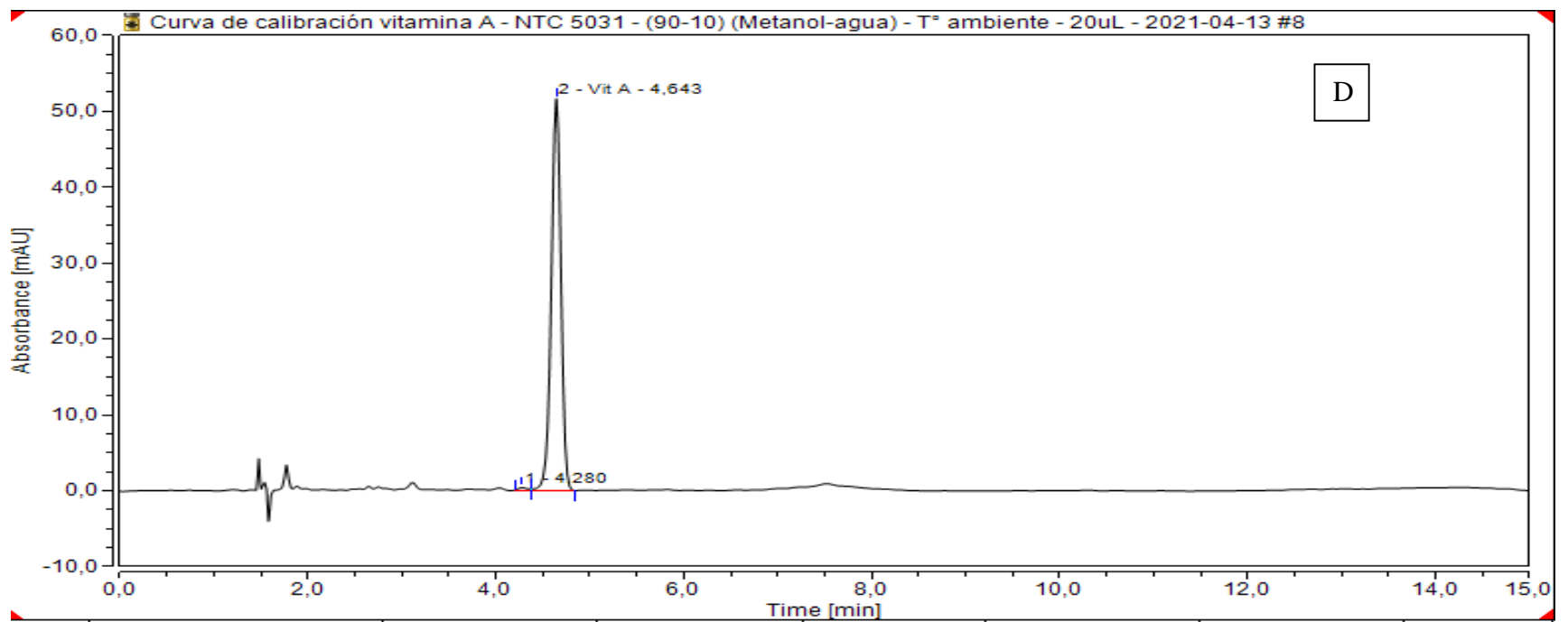
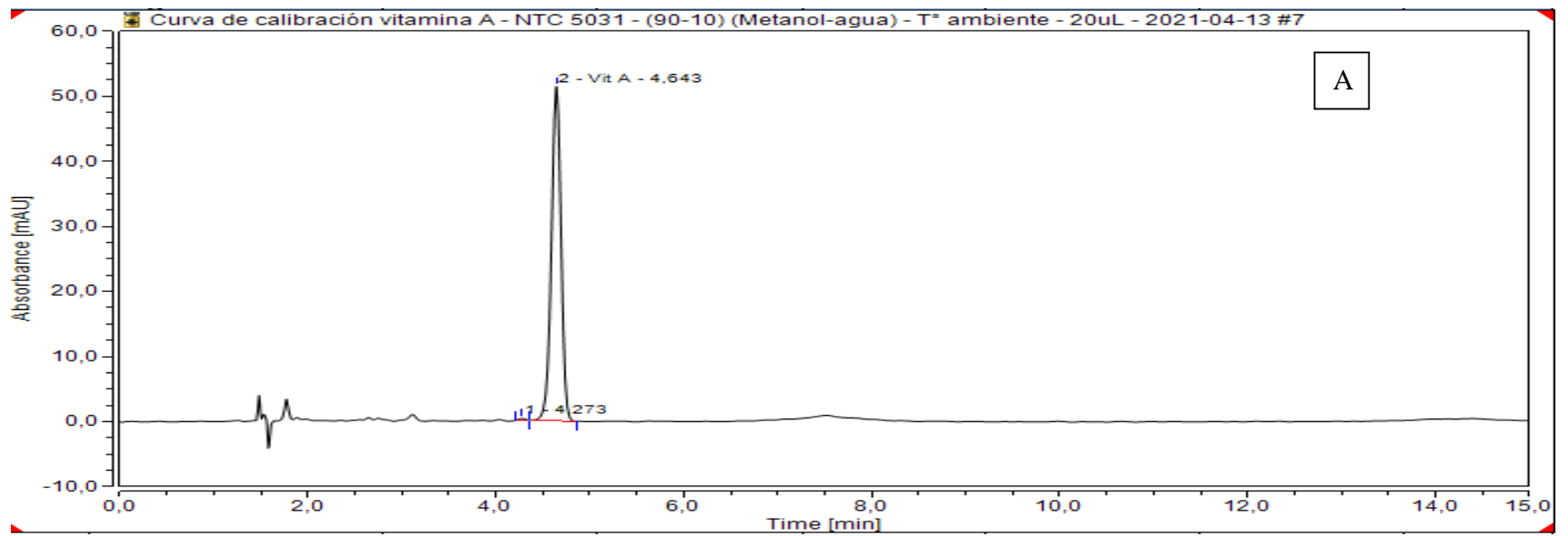
- Proceso de extracción: presencia de problemas en el proceso de extracción por la formación de emulsiones.

Las muestras para análisis se almacenaron en el Laboratorio de Calidad de Leche de la cooperativa Colanta en la Planta San Pedro de los milagros, a una temperatura de  $-17^{\circ}\text{C}$ , en viales ámbar, recubiertas con aluminio, para evitar la degradación de estas.

Se llevó acabo el análisis cromatográfico de las muestras el 17 de abril de 2021, por motivos externos al laboratorio (mora de reactivos), para esto se acondiciona el equipo de HPLC, con una previa activación de la columna C-18 en fase reversa, luego se procede a generar el corrido de la secuencia por replica de cada muestra. Terminado esto se reportó los siguientes resultados presentados en la (tabla 3) y perfiles cromatográficos figura 5, 6 y 7:

**Tabla 3.** Resultados cromatográficos de la corrida de diferentes muestras

Parámetros		Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
		Muestra	Réplica	Muestra	Réplica	Muestra	Réplica
Tiempo de retención	Rango de tiempo de retención (min)	4,272	4,280	4,273	4,267	4,353	4,353
		4,643	4,630	4,637	4,657	4,690	4,690
	Promedio	4,458	4,455	4,455	4,462	4,522	4,522
	Promedio tiempo de retención por muestra	4,456		4,459		4,522	
Área de la señal mAU * min	Área de la señal mAU*min	6,144	6,171	4,168	4,165	104,480	105,151
	Promedio señales	6,158		4,167		104,816	
Altura de pico (mAU)	Altura mAU	51,765	51,974	34,433	34,341	860,091	864,089
	Promedio altura de pico	51,870		34,387		862,090	
Concentración (UI g de retinol /g de vitamina A)		250,000		325,000		250,000	
Masa (g) de vitamina A, de diferentes muestras		0,014		0,010		0,0067	
Concentración esperada teórica de vitamina A (mg/L)	Concentración esperada mg/L	14		10		670	
	Concentración esperada UI/L	3,575		3,250		1,675	
Alícuota tomada de leche (mL)				25			
Reconstitución con metanol (mL)				10			
Concentración calculada (mg/L)(con base en los factores de respuesta) (relación de áreas)		15,709	15,778	10,657	10,649	-	-
%de recuperación		109,856	110,339	106,570	106,494	-	-
Concentración calculada (UI/L)		47,175	47,383	32,003	31,980		



**Figura 7.** Perfil cromatografico: A. Muestra 1.B. Réplica de la muestra 1.

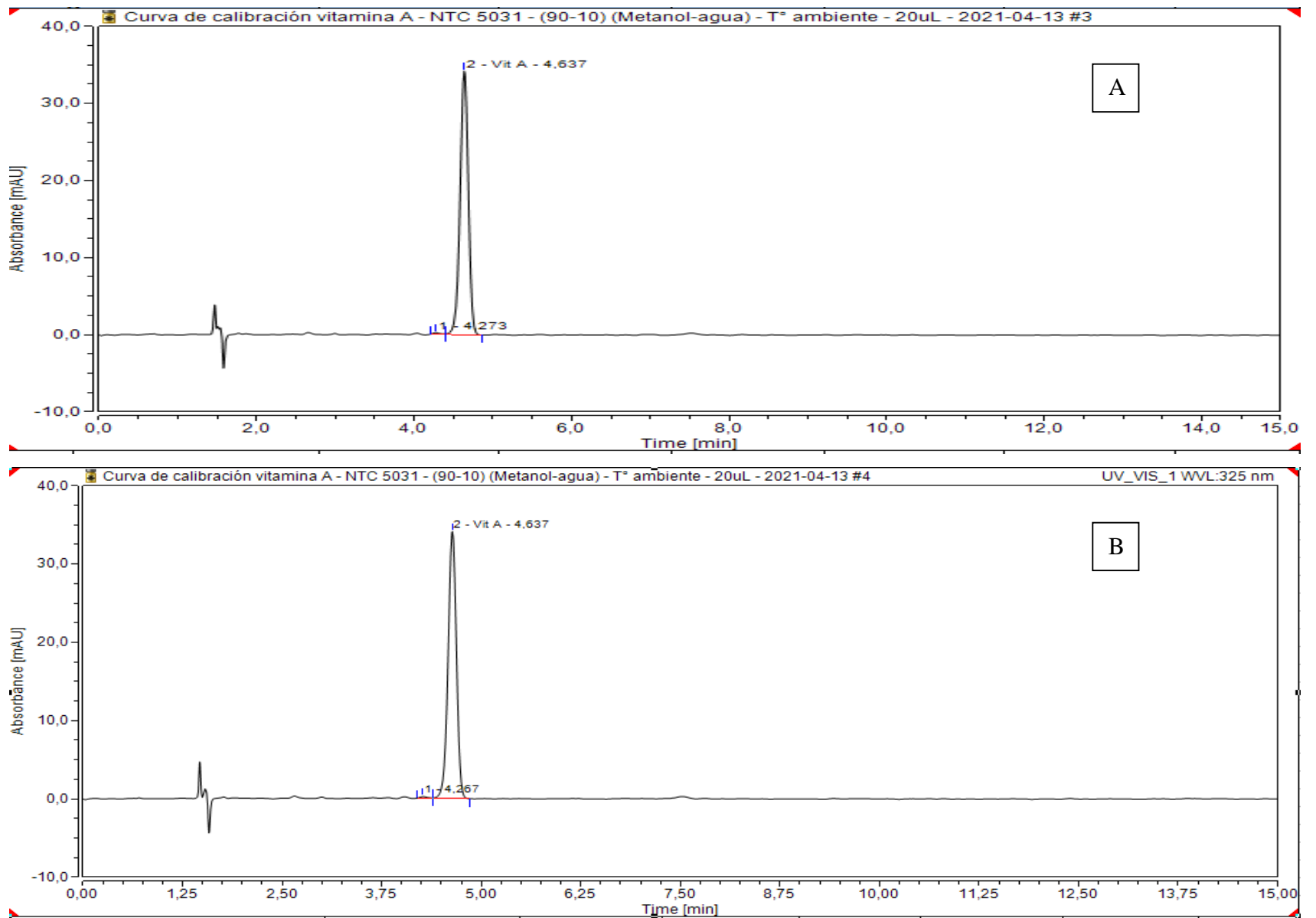
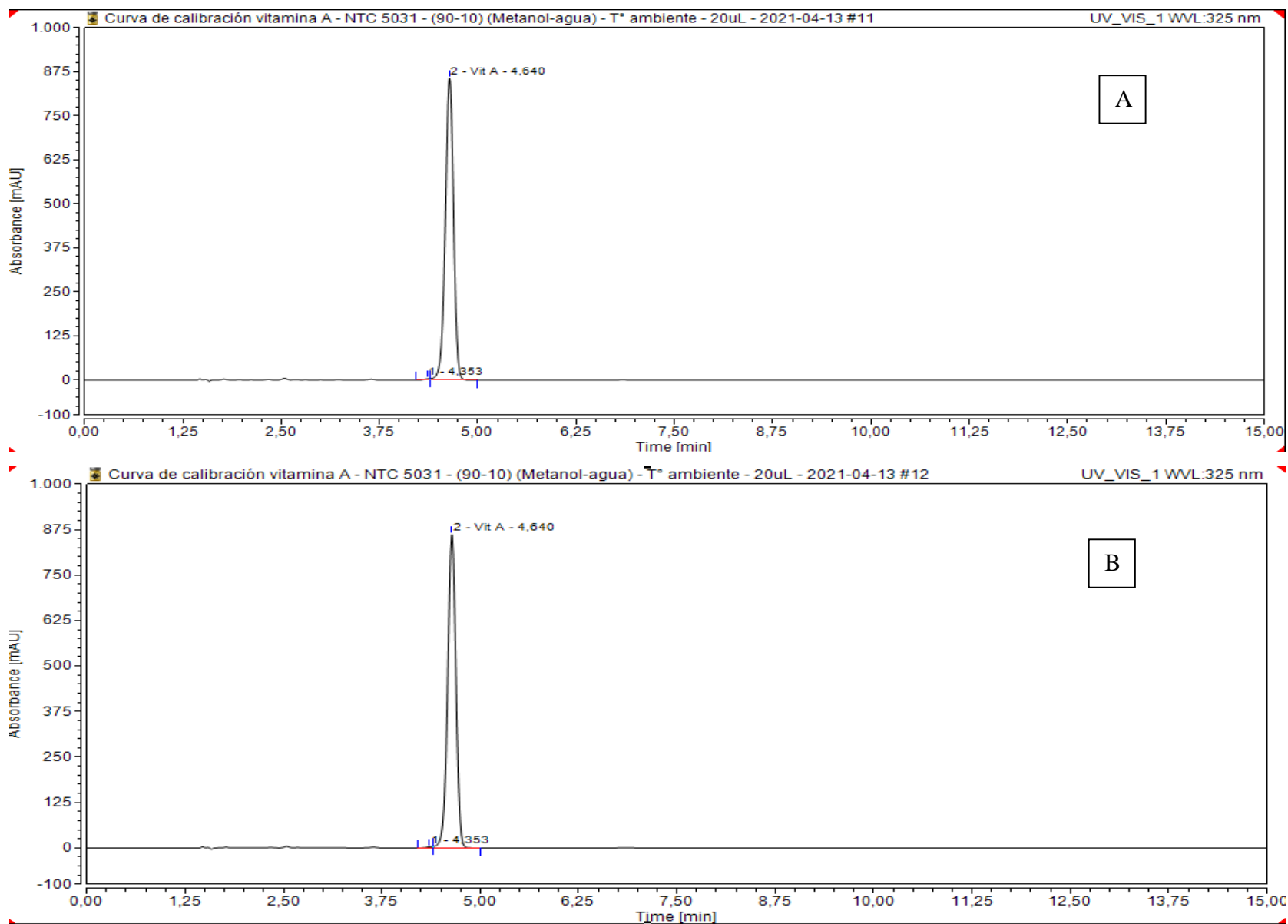


Figura 8. Perfil cromatografico: A. Muestra 2.B. Réplica de la muestra 2.

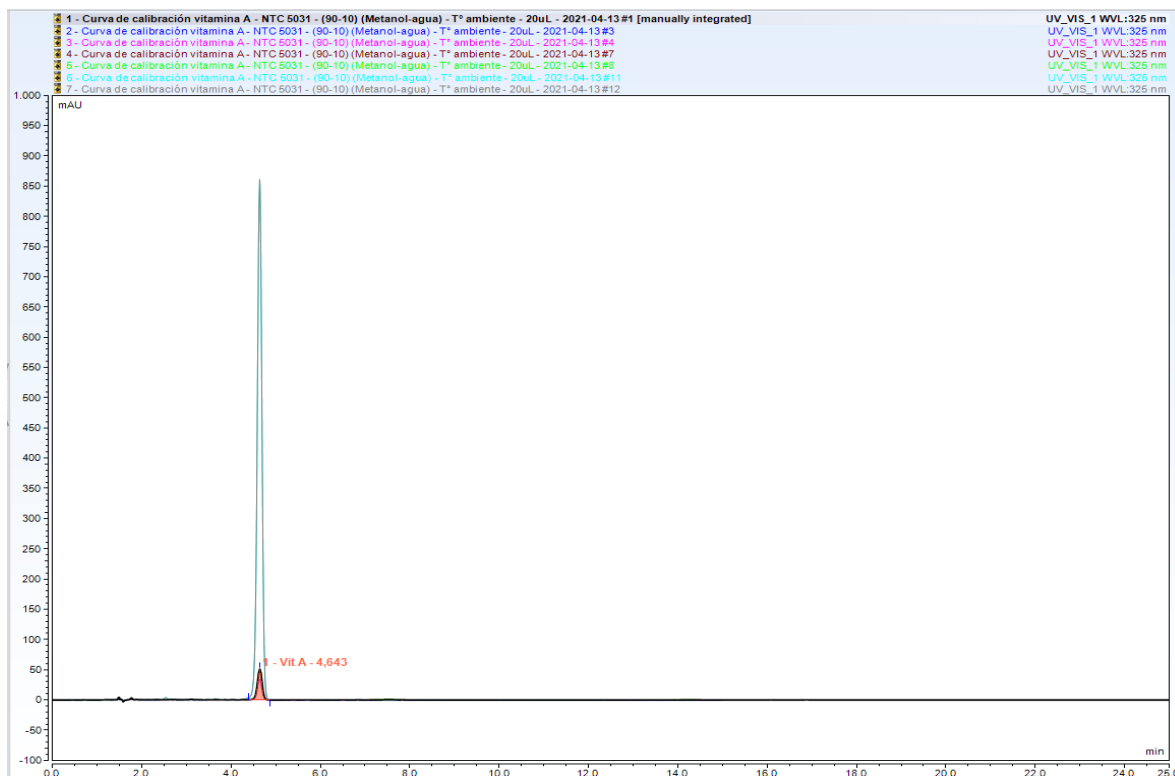


**Figura 9.** Perfil cromatografico: A. Muestra 3.B. Réplica de la muestra 3.

Los resultados presentados por los perfiles cromatográficos de las muestras analizadas, presentan tiempos en rangos similares, en comparación con el estándar. La concentración esperada se tomó en relación con lo reportado en la resolución 333 de 2011. Se obtuvo un porcentaje de recuperación entre el 109,85 % y el 106,494% de la muestra 1 y 2 (respectivamente), lo cual corresponde a lo reportado en las tablas de la AOAC [22].

Los perfiles cromatográficos presentan un comportamiento similar entre ellos, presentando cualitativamente y bajo observación, simetría en el pico y poco factor de cola, debido a que el pico tiene una forma de Gaussiana y una alta simetría, sin embargo para corroborar lo dicho anteriormente, se debe realizar una medida cuantitativa. Esto puede deberse a que el proceso de extracción fue efectivo, pese a los inconvenientes realizado.

Los datos reportados en la tabla 3, reportan que los tiempos de retención son muy similares, sin embargo, para corroborar de manera visual, se procedió a sobreponer todas las señales analizadas (figura 8).



**Figura 10.** Perfil cromatográfico superposición de señales de las muestras analizadas.

Como se observa en la figura 8 y se reporta en la tabla 1, las muestras analizadas tienen tiempos de retención similares, lo que genera una información que el método bajo las condiciones del laboratorio de Calidad de Leche, en primera instancia presenta resultados favorables, sin embargo, se tiene que reportar el plan de verificación a cabalidad, optimizando las condiciones experimentales.

Para la vitamina D, se realiza una reacción de saponificación a los ácidos estéricos presentes en la leche con el fin de obtener la Chocalciferol y Ergocalciferon presente en esta para proceder con el análisis por la técnica de HPLC.

La norma NTC 5044.2002, utiliza la adición de patrón de estándar interno para realizar la cuantificación de estas, con base a esto se procedió a realizar el plan de verificación (anexo A). Sin embargo, aun no se ha llevado a cabo la ejecución de este plan de verificación.

## **7. Productos esperados**

Se espera optimizar los resultados del método normalizado bajo la norma 5031.2002 y 5044.2002, para la determinación de vitamina A y D, en varios tipos de leches, cruda, descremada, semi-descremada y pasteurizada de diferentes plantas a nivel nacional pertenecientes a la cooperativa Colanta, con el fin de cumplir con los requisitos establecidos por el INVIMA.

Se busca conseguir la validación del método por medio de la optimización de las condiciones de este en el laboratorio de calidad de leche, con el fin de analizar diferentes muestras de leche de las diferentes plantas nacionales pertenecientes a Colanta.

Se espera hacer entrega de toda la documentación necesaria para respaldar la verificación del método obtenido, con el fin de que tener un soporte para futuras investigaciones y auditorias hechas a la empresa.

Se espera a futuro implementar la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para diferentes análisis en pro de mejorar el servicio de la calidad de los productos que ofrece la cooperativa Colanta.



## **8. Conclusiones**

- Se consiguió finalizar el formato del plan de verificación acorde a las normas ISO 12080-2 2009 y NTC 5044.2002 y de esta forma poder dar inicio a la estandarización del método para la cuantificación de las vitaminas A y D en cualquier matriz leche.
- Se dejan reportados los cálculos necesarios para realizar la evaluación de parámetros de desempeño analítico para el método a emplear.
- Tras la ejecución de un análisis de diferentes muestras fortificadas con vitamina A se realizó un primer acercamiento de la optimización de las condiciones del laboratorio de calidad de leche a el método propuesto.
- Se hace entrega de las fichas técnicas de los equipos empleados para la optimización del método junto con la ficha de procedimiento de la vitamina A y D.

## **9. Recomendaciones**

Se recomienda que para la ejecución del formato del plan de validación del método se tenga al alcance una cantidad de reactivos e insumos considerables, con el fin de evitar retrasos en la misma.

Agilizar la adquisición del sistema de flujo de nitrógeno para de esta manera poder llevar a cabo el proyecto.

Se recomienda mayor acompañamiento y organización en el proceso de práctica.

## 10. Referencias bibliográficas

- [1] Revista Semana, “Colanta, la universidad de la leche,” *Revista Semana*, Bogotá, 26-Apr-2020.
- [2] N. S. Scrimshaw, “La Fortificación de Alimentos: Una Estrategia Nutricional Indispensable ,” *Anales Venezolanos de Nutrición* , vol. 18. scielon , pp. 64–68, 2005.
- [3] J. Rodríguez Huertas, A. Rodríguez Lara, O. González Acevedo, and M. D. Mesa, “Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas ,” *Nutrición Hospitalaria* , vol. 36. scieloes , pp. 962–973, 2019.
- [4] WHO, “Guideline: Use of multiple micronutrient powders for home fortification of foods consumed by infants and children 6–23 months of age,” *Geneva, World Heal. Organ.*, pp. 1–30, 2011.
- [5] Ministerio de salud y protección social, “ESTRATEGIA NACIONAL PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS DEFICIENCIAS DE MICRONUTRIENTES EN COLOMBIA 2014 – 2021.” Ministerio de Salud, Bogotá, p. 6, 2015.
- [6] FUNDACION ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN and FUNDACIÓN IBEROAMERICANA DE NUTRICIÓN, “La leche como vehículo de salud para la población,” Madrid, 2017.
- [7] Food and A. O. of the United Nations, *Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo-Capítulo 11*. FAO, 2002.
- [8] J. Canquillusco, “Vitaminas liposolubles,” *Rev. Actual. Clínica Investig.*, vol. 41, no. 2304–3768, p. 5, 2014.
- [9] World Health Organization, “Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency,” *WHO Iris*, p. 55, 2009.
- [10] A. J. Meléndez-Martínez, I. M. Vicario, and H. Francisco J., “Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides ,” *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* , vol. 54. scielon , pp. 149–155, 2004.
- [11] A. N. Zeba *et al.*, “Major reduction of malaria morbidity with combined vitamin A

- and zinc supplementation in young children in Burkina Faso : a randomized double blind trial,” vol. 7, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1186/1475-2891-7-7.
- [12] R. B. Rucker, J. Zempleni, J. W. Suttie, and D. B. McCormick, *Handbook of Vitamins, Fourth Edition*. Taylor & Francis, 2007.
- [13] FAO and World Health Organization, “Vitamin and mineral requirements in human nutrition Second edition,” *World Heal. Organ.*, pp. 1–20, 1998, doi: 92 4 154612 3.
- [14] Resolución Número 333, “Requisitos de rotulado o etiquetado nutricional para alimentos envasados para consumo humano,” *Minist. la protección Soc.*, vol. 2011, p. 56, 2011.
- [15] M. Engelsen and Å. Hansen, “Rapid High-Performance Liquid Chromatography Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals,” *Cereal Chem. - Cereal CHEM*, vol. 85, pp. 248–251, Mar. 2018, doi: 10.1094/CCHEM-85-2-0248.
- [16] D. Suarez Ospina and Y. Morales Hernández, “Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas,” *América Rev. Semilleros Form. Investig.*, vol. 4, 2018.
- [17] A. Fallon, R. F. G. Booth, and L. D. Bell, *Applications of HPLC in Biochemistry*. Elsevier Science, 1987.
- [18] R. M. R. P. S. Castro *et al.*, “High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC.,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 139, no. 2, pp. 263–269, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.05.001.
- [19] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley, 2011.
- [20] M. Dong and A. Llanas, “The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities,” *Lc Gc North Am.*, vol. 31, p. 472, Jun. 2013.
- [21] C. Moron, I. Zacarias, and S. de Pablo, *Produccion y manejo de datos de composicion quimica de alimentos en nutricion-Capítulo 13*. FAO. Direccion de Alimentacion y Nutricion, 1997.
- [22] AOAC International, “AOAC Official Method 992.04 Vitamin A (Retinol Isomers) in Milk and Milk-Based Infant Formula,” *AOAC Off. Methods Anal.*, pp. 4–5, 1995.

## 11. Anexos

**Anexo 1:** Ver anexo externo [Documento en Word]. [Formato de verificación vitamina A y D.docx](#)