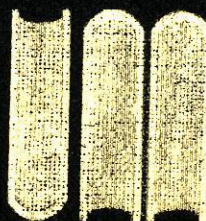


UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE
VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN LECHE POR
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

REPORTE DEL PROGRAMA DE
EVALUACION FINAL
PRESENTADO POR

MARTHA LETICIA GOMEZ CISCOMANI

EN OPCION AL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1983

T

TX553

475

G6

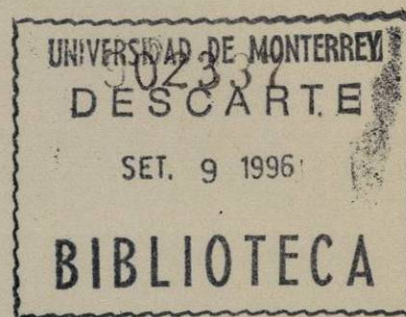
C.1



1080070877

DICNE
\$ 100.00

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS



DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE
VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN LECHE POR
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

REPORTE DEL PROGRAMA DE
EVALUACION FINAL
PRESENTADO POR

MARTHA LETICIA GOMEZ CISCOMANI

EN OPCION AL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1983

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

T
TX 553
.V5
96



A mis Padres

Domingo y Olga,

a mis Hermanos

Domingo, Arturo, Olga,

Carlos y Ma. Antonieta,

por los consejos, comprensión

y apoyo que me brindaron para

llegar al feliz término de mi

carrera.

Agradezco con especial cariño
a la Q.F.B. Maricela Ramírez
Benavides por la dedicación y
el interés demostrados en la
realización de mi trabajo.

I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	23
RESULTADOS	29
DISCUSION Y CONCLUSIONES	33
RESUMEN	37
BIBLIOGRAFIA	39

I N T R O D U C C I O N

Desde hace varios siglos, el hombre pensaba que consumir una dieta rica en proteínas, carbohidratos y lípidos era suficiente para gozar de buena salud. Sin embargo, en el siglo XVI se detectó en Inglaterra una enfermedad de los marineros que desaparecía al alimentarse con naranjas y limones, por lo que en el año 1804 se hizo obligatorio el consumo de estos cítricos. En 1880 se publicó en Alemania un estatuto en el que se decía que la leche contenía nutrientes indispensables, pero no fue hasta principios de este siglo cuando se descubrieron algunos factores químicos esenciales para el buen funcionamiento del

cuerpo humano y para prevenir ciertas enfermedades. Se vió también que estos factores tenían propiedades de aminas y se les llamó vitaminas por ser consideradas como aminas indispensables para la vida. Este término, propuesto por el químico polaco Funk, es actualmente erróneo, debido a que no todas las vitaminas tienen estructura de amina, aunque el uso de esta palabra se ha generalizado para este grupo de compuestos (2,3,12,19).

Las vitaminas son sustancias orgánicas de composición muy variada, necesarias para el organismo animal generalmente en cantidades muy pequeñas. La mayor parte de las vitaminas que los animales necesitan son proporcionadas directa o indirectamente por los vegetales, que son capaces de sintetizarlas. Desempeñan un papel importante en la transferencia de energía así como también en el control de muchos procesos metabólicos. La mayoría son termoestables y en ausencia de oxígeno lo son incluso a temperaturas superiores a los 100°C. Muchas de ellas, aunque todas de gran complejidad, pueden obtenerse hoy sintéticamente, con lo que se ha enriquecido notablemente la terapéutica moderna (3,21).

Aún no se conoce perfectamente la función biológica de

Las vitaminas en el organismo humano; sin embargo, se sabe que las del grupo B, participan en ciertos sistemas enzimáticos muy específicos del metabolismo (2).

La importancia de las vitaminas se ha demostrado en muchas ocasiones y se sabe que la carencia de ellas produce malestares o enfermedades en el hombre, a pesar de que consuma una dieta rica en los demás nutrientes (2).

Las vitaminas son moléculas orgánicas que funcionan como coenzimas o cofactores y se les considera indispensables ya que el organismo no las sintetiza, por lo que deben estar presentes en la dieta diaria. Existen algunas excepciones; por ejemplo, el hombre puede sintetizar la vitamina D por medio de reacciones fotoquímicas que suceden cuando expone la piel a los rayos solares; de igual forma, la microflora bacteriana del intestino humano sintetiza el ácido fólico, la biotina y la vitamina K, que pueden ser directamente absorbidas a través de la mucosa del tubo gastrointestinal. La flora bacteriana normal se destruye cuando los enfermos se sujetan a tratamientos a base de antimicrobianos, lo que trae consigo una reducción en la síntesis de vitaminas en el intestino (2,28).

Debido a que las diferentes vitaminas no guardan entre

si relaciones estructurales, su clasificación es prácticamente imposible. Sin embargo, hay un hecho importante que las distingue, sus propiedades de solubilidad; por ello se dividen en dos grandes grupos: las hidrosolubles, que comprenden la vitamina C, las vitaminas del grupo B, el inositol y la biotina, y las vitaminas liposolubles, A, D, E y K (13).

Las principales características y propiedades de las vitaminas liposolubles se presentan en la Tabla No. 1 (2, 22,23,24).

Para seleccionar los alimentos que proporcionan vitaminas en la dieta deben tomarse en cuenta las siguientes características:

- 1) Utilizar fuentes comunes de alimentos en lugar de sus concentrados bajo circunstancias normales.
- 2) Determinar la frecuencia con que debe incluirse cierto alimento en la dieta.
- 3) Determinar los requerimientos diarios del alimento.
- 4) Comprender los efectos que el procesamiento y la preparación de los alimentos tienen sobre la retención de vitaminas.
- 5) Considerar los factores económicos como disponibilidad y costo (19).

TABLA No. 1

Principales características y propiedades de las vitaminas liposolubles.

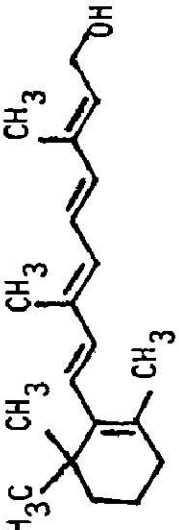
NOMBRE	COMPOSICION	PROPIEDADES
<p>VITAMINA A</p>	<p>9,13-dimetil-7-(1,1,5-trimetil-6-ciclohexen-5-il)-7,9,11,13-nonatetraen-15-ol. (C₂₀H₃₀O).</p>  <p>Configuración Trans</p>	<p>1. Formas químicas: retinol (alcohol), retinal (aldehído), ácido retinóico (ácido), esterificado con ácido palmítico. 2. En forma pura: cristales amarillo claro. 3. Punto de fusión: 63-64°C. 4. Absorción máxima a 325-328 nm. 5. Soluble en grasas, insoluble en agua. 6. La descomposición se acelera aumentando la temperatura y catalizado con iones minerales. Es sensible a la luz, al oxígeno, a la luz ultravioleta y a agentes oxidantes. 7. Relativamente estable en ausencia de aire al calor y a pH alcalinos y ácidos. 8. Los antioxidantes de los alimentos, como el BHA, BHT y la vitamina E, aumentan la estabilidad de esta vitamina. 9. Precursores: α y β-carotenos. 10. I.U.I.=0.6μg de Vitamina A de configuración trans.</p>

TABLA No. 1. Continuación

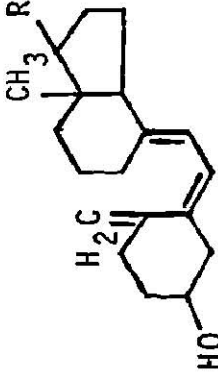
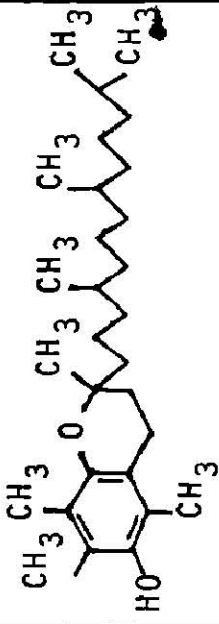
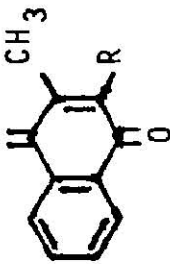
<p>VITAMINA D₂ (Ergocalciferol)</p>	<p>3 (β)-hidroxi-9, 10-seco-6 ("cis")-6,7-seco-trans-ergosta-5,7,10 (19) 22-tetraeno. (C₂₈H₄₄O). $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$</p>	<p>1. Estables a tratamientos térmicos. 2. Se oxidan en presencia de oxígeno y luz. 3. Precursores de las vitaminas D₂ y D₃: ergosterol y 7-dehidrocoles-terol, respectivamente. 4. 1 U.I. = 0.025 μg de vitaminas D₂ y D₃ cristalinas puras.</p>
<p>VITAMINA D₃ (Colecalciferol)</p>	<p>3(β)-hidroxi-9,10-seco-6 ("cis")-6,7-seco-trans-colesta-5,7,10 (19)-trieno. (C₂₇H₄₄O). $R = \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ </p>	

TABLA No. 1. Continuación.

<p>VITAMINA E (α-tocoferol)</p>	<p>5,7,8-trimetiltocol. ($C_{29}H_{50}O_2$).</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aceites viscosos a temperatura ambiente. 2. Color amarillo claro. 3. Punto de fusión del α-tocoferol: 2.5-3.5°C. 4. Soluble en Solventes para lípidos, insoluble en agua. 5. Sensibles a los rayos ultravioleta, se oscurecen con la luz. 6. Estables a temperaturas elevadas, a ácidos y a álcalis en ausencia de aire. 7. Son oxidados lentamente por el oxígeno atmosférico. 8. 1 U.I.= 1 mg de acetato de α-tocoferol.
<p>VITAMINA K₁ VITAMINA K₂</p>	<p>2-metil-3-fitil-1,4-naftoquinona. R= $C_{20}H_{35}$.</p> <p>2-metil-3-difarnesil-1,4-naftoquinona. R= $C_{15}H_{26}$, $C_{30}H_{50}$, $C_{50}H_{66}$.</p> <p>$C_{45}H_{74}$, $C_{55}H_{97}$.</p> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se disuelven en solventes orgánicos (éter, éter de petróleo, benceno, hexano, acetona), insoluble en agua, parcialmente soluble en metanol o etanol. 2. Inestables al oxígeno y a la luz. 3. Estables al calor. 4. Punto de fusión: $K_1 = -20^\circ C$, $K_2 = 54.5^\circ C$.

La Tabla No. 2 muestra los requerimientos dietéticos diarios aconsejables de las vitaminas liposolubles (19).

Todos los alimentos satisfacen las necesidades energéticas del cuerpo proporcionando los nutrientes necesarios para la estructuración de los tejidos y las funciones reguladoras. Ningún alimento individual llena todas estas necesidades. Aún un alimento como la leche, que en general se considera el más perfecto, no contiene todos los constituyentes alimenticios en cantidades óptimas. La leche es una excelente fuente de nutrientes: está compuesta principalmente de un 80-90% de agua, en la cual se encuentran disueltas o en suspensión las proteínas, la lactosa (el azúcar de la leche), los minerales (calcio, hierro y fósforo) y las vitaminas hidrosolubles. Entre los lípidos de la leche podemos encontrar los triglicéridos, los fosfolípidos, los esteroides, varios pigmentos y las vitaminas A, D, E y K, así como otras sustancias en concentraciones muy bajas (2,9,17,19).

Debido a su contribución para mejorar el bienestar y la salud de la población en general, es necesario determinar las vitaminas liposolubles en la leche. Como no existe una buena fuente de vitamina D en la alimentación habitual del hombre, se puede enriquecer la leche de las

siguientes maneras:

- 1) Administración de ciertos alimentos irradiados a las vacas, ejemplo: levadura de cerveza.
- 2) Adición de vitaminas sintéticas, D₂ o D₃, a la leche.
- 3) Irradiación de la leche con rayos ultravioleta (1,2).

Entre las razones por las cuales la leche se considera como un alimento adecuado e importante en nuestra alimentación, están:

1. Su sabor.
2. Su alta digestibilidad.
3. Es un alimento bien balanceado para los niños en crecimiento ya que su sistema digestivo la tolera adecuadamente. Además, la leche homogeneizada y enriquecida con la vitamina D está especialmente adaptada para la alimentación infantil.
4. Es un alimento excelente para los adultos ya que es una fuente rica en proteínas; proporciona minerales necesarios, suministra un azúcar de fácil digestión y la grasa como fuente de energía.
5. La leche y sus derivados son indispensables para las personas de edad avanzada como fuente de proteínas y minerales, especialmente de calcio; mineral muy importante para mantener el vigor de los huesos.

6. Su bajo costo.
7. No requiere preparación para usarse en el hogar.
8. No contiene desperdicios.
9. Es un alimento para muchos usos, como bebida, en sopas, escalopas, caldos, salsas, postres, desayunos de cereales, y en general, para muchos propósitos culinarios.
10. La importancia alimenticia de la leche reside principalmente en las proteínas, el calcio y las vitaminas A, B₁ y B₂ (1,9).

El contenido de vitaminas de la leche experimenta grandes variaciones en relación con los alimentos y comportamiento de la res; si pastan y comen verde, es elevado, reduciéndose por efecto de los piensos secos y la estabulación. Como promedio, la vitamina A abunda, las vitaminas B₁ y B₂ están en pequeña cantidad; la vitamina C está contenida en gran cantidad, sobre todo si la res come verde, y la vitamina D es escasa en reses estabuladas y sometidas a piensos secos, aumentando algo su contenido si las reses pastan, por la influencia desarrollada por las radiaciones solares (20).

La vitamina A es esencial para el crecimiento y para el mantenimiento de las capas superficiales de la piel en una condición saludable; su deficiencia origina una en-

TABLA No. 2

Requerimientos diarios de vitaminas liposolubles.

	EDAD (años)	VITAMINA A Actividad U.I.	VITAMINA D U.I.	VITAMINA E Actividad U.I.
Infantes	0 - 1	1500	400	5
Niños	1 - 10	2000 - 3500	400	10 - 15
Hombres	10 - 22	4500 - 5000	400	20 - 30
	22 - 75+	5000	—	30
Mujeres	10 - 22	4500 - 5000	400	20 - 25
	22 - 75+	5000	—	25
Embarazo	—	6000	400	30
Lactancia	—	8000	400	30

fermedad ocular denominada xerofthalmía y ceguera nocturna (3,9).

La vitamina D de la leche natural es escasa, por lo que es necesario fortalecer este alimento con dicha vitamina. La vitamina D ayuda a la utilización del calcio y del fósforo, jugando así un papel vital en la formación y mantenimiento de los huesos (9,17).

La tiamina o vitamina B₁ es una vitamina hidrosoluble esencial para el crecimiento. Impide la enfermedad nerviosa conocida como beriberi y es parte integral de un sistema enzimático relacionado con el metabolismo de los hidratos de carbono (8).

La riboflavina (vitamina B₂) es una vitamina hidrosoluble esencial para el crecimiento. Esta vitamina está relacionada primariamente con la oxidación de los elementos nutritivos energéticos en las células (9,17).

La niacina es uno de los factores que impide la enfermedad conocida como pelagra. También participa en algunas reacciones enzimáticas de óxido-reducción relacionadas con el metabolismo. La leche la contiene en poca cantidad (1,9).

Por último, la vitamina C (Acido ascórbico) es la vitamina necesaria para evitar o tratar la enfermedad llamada escorbuto, que en sus etapas avanzadas hace al individuo muy susceptible a contraer infecciones (2).

Por otra parte, dada su composición, la leche no sólo es un excelente alimento para el hombre, sino también un caldo de cultivo ideal para bacterias y otros microorganismos, por lo que es necesario asegurarse de que la leche vendida para el consumo de los seres humanos sea un producto que conserve su calidad. Esto ha llevado a desarrollar un sistema estricto de control en el manejo y el procesamiento de la leche, que destruye a todos los microorganismos patógenos y reduzca la presencia de otros. El medio más eficaz para destruir las bacterias de la leche se basa en el principio de la pasteurización (17).

La pasteurización puede ser de dos formas:

A) La pasteurización baja que comprende las operaciones de filtración, calentamiento (de 62.8-65.6°C por 30 minutos), enfriamiento por debajo de los 10°C (de preferencia a 6°C) y envasado a prueba de contaminaciones ulteriores.

B) La pasteurización alta y rápida (72°C durante 15 segundos) es la más utilizada, y ha sustituido a la anti-

gua, en la cual la leche se calentaba a unos 85°C durante un tiempo variable en aparatos abiertos (1,17,20).

En las leches transportadas a larga distancia se practica frecuentemente una doble pasteurización, la primera en el centro donde se realiza la recolección de la leche, y la segunda a su llegada a la central lechera (1).

La pasteurización no altera el sabor de la leche, siempre que se conserve en lugar fresco. Los efectos sobre el valor nutritivo no son significativos debido a que los nutrientes más importantes (proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales y la mayor parte de las vitaminas) no se ven afectados. Las únicas pérdidas apreciables son un 10% de tiamina y vitamina B₁₂ y cerca de la mitad de la concentración de la vitamina C presente originalmente; las vitaminas A y D se pierden en cantidad mínima. La vitamina B₁₂ es en sí misma estable frente al calor y por lo tanto soporta el proceso de pasteurización, sin embargo, se presentan pérdidas por interacción con los productos formados en la destrucción de la vitamina C (17,20).

Después de la pasteurización se analiza la leche para determinar su calidad. Una leche de alta calidad debe poseer las siguientes características:

1. Libre de todo microorganismo patógeno.
2. Una cuenta baja de microorganismos totales.
3. Libre de sedimentos y materias extrañas.
4. De un ligero sabor dulce y un gusto y aroma suaves, libre de olores extraños.
5. Que cumpla con los requisitos estatales y/o federales en cuanto al contenido mínimo de grasa, sólidos no grasos y total de sólidos (9).

La leche fresca sólo se conserva durante pocas horas a menos que se refrigere; la leche pasteurizada se conserva durante varios días, pero debe mantenerse en lugar fresco (7).

Para determinar la calidad de la leche se pueden realizar las siguientes pruebas:

- a) Pruebas organolépticas.
- b) Pruebas bacteriológicas.
- c) Pruebas fisicoquímicas (9).

Entre las pruebas fisicoquímicas que se practican a la leche están la determinación de la densidad, el peso específico, la acidez, el punto crioscópico, el índice de refracción, la cremometría, la estabilidad de sus proteínas, el cálculo del extracto seco, la determinación de

grasa, la digestibilidad y el análisis de vitaminas (19).

Algunas vitaminas pueden ser estimadas biológicamente, sin embargo este método de análisis es poco preciso, costoso y requiere mucho tiempo para su realización. También se han venido utilizando los métodos fisicoquímicos como colorimetría y espectrometría, en los cuales las vitaminas deben ser extraídas y después purificadas para eliminar sustancias que interfieran con el análisis. Algunos métodos de purificación se llevan a cabo por cromatografía en columna (adsorción, partición, intercambio iónico), en papel y electroforesis (26).

Hasta la fecha se han venido haciendo ensayos en alimentos para desarrollar métodos rápidos de análisis de las vitaminas. Un método de análisis es el espectrofotométrico, el cual mide la absorción máxima de la luz ultravioleta por las vitaminas; por ejemplo, para el alcohol puro de la vitamina A todo-trans es de 325 nm, y para la vitamina D es de 265 nm (23,27).

La vitamina A, en particular, puede determinarse por varios métodos fisicoquímicos como son: espectroscopía de luz ultravioleta, infrarrojo y de resonancia magnética

nuclear, fluorescencia, cromatografía en capa fina, cromatografía en papel y destilación (22,27).

La vitamina D se puede analizar por espectroscopía infrarroja para diferenciar el ergocalciferol del colecalciferol. Para el análisis fotométrico de la vitamina D se puede aplicar principalmente el método químico del tricloruro de antimonio; aunque se pueden presentar interferencias con otras sustancias presentes en la mezcla, las cuales se pueden eliminar por cromatografía de partición o cromatografía en capa fina (8,27).

Para la determinación de la vitamina D en presencia de la vitamina A, Wilkie expuso un método en el que después de saponificar y extraer la muestra, se elimina la vitamina D por cromatografía en columna. También pueden separarse estas vitaminas, por cromatografía de partición y por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel (23,27).

El método más simple para determinar los tocoferoles, se basa en la medición espectrofotométrica del color rojo producido al agregar cloruro férrico y bipyridil a la solución de la fracción insaponificable de la muestra. En los productos que contienen ésteres de tocoferol, se debe saponificar cuidadosamente antes del análisis de los

tocoferoles totales o individuales. La cromatografía en columna se puede utilizar para el análisis de estas vitaminas utilizando como fase estacionaria la tierra de Fuller o la alúmina. La cromatografía en papel es otro método que separa los tocoferoles con vitamina E activa, de los tocoferoles inactivos y otras sustancias. La cromatografía en capa fina y la de papel son igualmente útiles para la determinación de estos compuestos, pero para una cuantificación es más eficiente la cromatografía en capa fina (24,27).

La determinación de las vitaminas liposolubles en la leche se puede llevar a cabo por los métodos enunciados en la Tabla No. 3 (17,20).

Existen varios métodos cromatográficos utilizados en la detección de estas vitaminas en la leche. La cromatografía comprende un diverso grupo de métodos de separación de gran importancia ya que permiten separar, aislar e identificar los componentes de mezclas que de otro modo serían resueltas con dificultad o no podrían resolverse. Son procesos basados en diferencias de velocidades por medio de las cuales los componentes individuales de una mezcla migran por un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil. Esta separación puede ser por pro-

TABLA No. 3. Métodos para el análisis de vitaminas liposolubles en la leche.

VITAMINA	MÉTODOS DE ANALISIS
A	<p>1) <u>Espectrográfico</u>: el espectro ultravioleta de adsorción de la vitamina A tiene su máximo a una longitud de onda de 328 nm.</p> <p>2) <u>Colorimétrico o espectrofotométrico</u>: utiliza la reacción de la vitamina A con el tricloruro de antimonio en solución clorofórmica. Desarrolla color azul.</p>
D ₂ , D ₃	<p>1) <u>Colorimétrico</u>: midiendo el color violeta desarrollado por la vitamina D₂ con el cloruro de aluminio en alcohol absoluto. La presencia simultánea de vitamina A impide la determinación.</p> <p>2) <u>Espectroscópico</u>: estas vitaminas producen una banda de adsorción amarilla típica en presencia del tricloruro de antimonio en cloroformo.</p>
E	Espectrofotométrico, volumétrico y colorimétrico.

cesos de adsorción, intercambio iónico, de reparto, de inclusión, o por una combinación de éstos (5,18,25).

Entre los métodos cromatográficos utilizados están la cromatografía de gases, en columnas, en papel y en capa fina (15,26).

Aunque la cromatografía en papel ha sido un factor de gran valor en el progreso de la biología y de la química, el uso de celulosa como fase estacionaria es limitante, ya que el papel no es satisfactorio para todas las separaciones (por ejemplo, algunas clases de lípidos y otros compuestos hidrófobos). Por lo tanto, los investigadores buscaron alternativas para el empleo de los adsorbentes, que les proporcionaran una utilidad análoga a la del papel en el método de columna de Tswett. Después de varios intentos, se desarrolló y se adoptó mundialmente la técnica de cromatografía en capa delgada perfeccionada posteriormente por Stahl en 1956 (5,16,29).

En esta técnica, el adsorbente se mezcla con un aglutinante, como yeso; se suspende en agua y se deposita sobre una placa de vidrio o sobre una superficie plana rígida, metálica o de un material plástico, por medio de un dispositivo embadurnador apropiado. Al secarse, la suspen-

si3n queda adherida a la placa de vidrio como una capa delgada de adsorbente que puede variar en espesor. Esta capa puede utilizarse en el m3todo cromatogr3fico en forma similar a una hoja de papel. La separaci3n depende en gran parte de las propiedades adsorbentes de la capa (5, 11,16,29).

Por el momento, el adsorbente m3s utilizado en la cromatograf3a en capa fina es la gel de s3lice. Al escoger un adsorbente, sirven de gu3a las caracter3sticas de las sustancias que se desean separar, tales como acidez, basicidad, car3cter i3nico, solubilidad y posibilidad de reacci3n con la capa o con el disolvente. En general, los compuestos lip3filos se separan sobre 3xido de aluminio, gel de s3lice, celulosa acetilada y poliamida. Cuando la gel de s3lice no se activa por el calor, contiene agua suficiente para que las separaciones ocurran por un mecanismo de reparto similar al de la cromatograf3a en papel (5,29).

Dependiendo del adsorbente, de su actividad y de la clase de los compuestos empleados como solutos, se pueden utilizar gran variedad de disolventes: los solventes puros de las series elutr3picas, las mezclas de disolventes y tambi3n los disolventes totalmente acuosos y org3nicos, los acuoso-org3nicos y los i3nicos (5,29).

Se ha observado que los tocoferoles y otras vitaminas se caracterizan por su comportamiento cromatográfico bajo condiciones experimentales claramente definidas, como por ejemplo, sus valores de R_f en cromatografía en papel y en capa fina (24).

La cromatografía en capa delgada es un método analítico versátil, sensible en alto grado, de excelente nitidez, y rápido para separar en forma muy definida compuestos estructuralmente muy parecidos (5,16,18,29).

El objetivo de este trabajo es la estandarización del método de semicuantificación de las vitaminas liposolubles presentes en la leche, debido a que este alimento representa una fuente significativa de estos nutrientes esenciales para el crecimiento, el desarrollo y la buena salud principalmente de los infantes en general para toda la población.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

En este estudio se realizó la estandarización y la determinación semicuantitativa de vitaminas liposolubles en leche utilizando la técnica de Cromatografía de Adsorción en Capa Fina.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey.

Se analizaron un total de 40 muestras obtenidas en los diferentes comercios del municipio de Garza García, Nuevo

León, en el transcurso de los meses de Enero a Abril de 1983.

A.- MATERIALES.

Rotavapor 115 V, 50-60 CY, Buchler Instruments.

Es un evaporador rotatorio que trabaja a presión reducida por medio de una bomba, y sirve para la concentración de soluciones. Consta de un recipiente en forma de espiral y un baño de agua a temperatura constante.

Tanque de Cromatografía.

Es un recipiente de vidrio que debe estar bien cerrado para impedir que los vapores del solvente escapen y se pueda llevar a cabo la saturación necesaria de los vapores del eluyente para que se efectúe la separación en forma correcta.

Cromatografía Al de Silicagel 60 F 254 para cromatografía de capa fina, Merck.

Se trata de una lámina de aluminio duro, cuya superficie se ha activado por medio de un previo tratamiento espe-

cial. El espesor de la lámina es de 0.1 mm lo que facilita su flexibilidad siendo a la vez, lo suficientemente rígida para no doblarse en las cámaras de desarrollo habituales. Su tamaño es de 20 x 20 cm y el espesor de la capa del adsorbente es de 0.2 mm (14).

Centrífuga IEC Modelo K.

B.- METODOS.

Prelavado de los cromatofolios.

Se coloca en la cuba el solvente de lavado (R-1); y en las paredes del tanque se colocan tiras de papel filtro impregnadas con el solvente. Después se coloca el cromatofolio en el tanque y se deja correr el eluyente. Terminado el lavado, se sacan los cromatofolios y se dejan secar a temperatura ambiente.

Activación de los cromatofolios.

Después del lavado, los cromatofolios se colocan en la estufa a 110°C por una hora. Se dejan enfriar y se almacenan en el desecador. Los cromatofolios deben ser utilizados durante la misma semana en que se activaron.

Recolección de la muestra.

La muestra de leche se toma del local de expendio, se transporta al laboratorio y se refrigera hasta que se lleve a cabo el análisis.

Preparación de la muestra.

Una vez que la muestra está a temperatura ambiente, y si consiste de un sólo envase, debe invertirse varias veces con el objeto de mezclar el contenido y hacer homogénea la muestra. Si hay dos o más envases, deben mezclarse antes de abrirlos, y utilizar 100 ml de cada recipiente para su análisis.

Método de Análisis.

La determinación de las vitaminas liposolubles puede resumirse en los siguientes pasos:

- 1.-Extracción.
- 2.-Cromatografía.
- 3.-Detección e Identificación.

1. Extracción.

A 100 ml de leche se le agregan 100 ml de alcohol etílico absoluto. Se agita, se centrifuga y se decanta la so-

lución etanólica. Posteriormente, el precipitado se lava con 150 ml de cloroformo. Se evapora el extracto de cloroformo en un rotavapor a 40°C hasta obtener un volumen de 1 a 5 ml.

2. Cromatografía en capa fina.

Al cromatofolio activado se le aplica una alícuota de 20 μ l de la solución clorofórmica de cada extracto y se deja secar (evaporación del solvente). Posteriormente, el cromatofolio con la muestra se coloca en el tanque de cromatografía conteniendo el eluyente seleccionado (R-2). Una vez que el eluyente se desplaza 15 cm, se saca el cromatofolio del tanque y se deja secar a temperatura ambiente.

3. Detección e Identificación.

Los componentes de la mezcla se detectan rociando sobre el cromatofolio la solución reveladora (R-3), lo que da como resultado coloraciones diferentes para cada vitamina:

Vitamina A: azul intenso (se extingue rápido).

Vitamina D: amarillo naranja, pasando luego a gris.

Vitamina E: sólo se observa hasta después de haber calentado a 100°C por 10 minutos; apareciendo el α -tocoferol de color ama-

rillo y el acetato de color pardo (13). La identificación se lleva a cabo basándose en el R_f específico de cada vitamina; y la semicuantificación se realiza por comparación visual tomando como referencia muestras de leche cruda.

C.- REACTIVOS.

(R-1). Eluente de lavado: Solución acuosa de acetona al 50%.

(R-2). Eluente de separación: Ciclohexano-éter etílico (1:1).

(R-3). Solución reveladora: Cloruro de antimonio (III). Se disuelven 20 g de cloruro de antimonio (III) en cloroformo hasta completar 100 ml. Conviene tratar previamente el cloroformo con óxido de aluminio. Para tal fin se mezcla un litro de cloroformo (aproximadamente al 1% de etanol) y 100 g de óxido de aluminio activo básico, se deja reposar de tres a cuatro horas, agitando con frecuencia. Luego se pasa por un filtro de pliegues (13).

R E S U L T A D O S

Se analizaron un total de 40 muestras correspondientes a cuatro marcas comerciales diferentes que se consumen en el área metropolitana de la Ciudad de Monterrey. Para el análisis semicuantitativo se tomó como patrón la leche cruda, la cual debe contener (Alais, 1971) 150 U.I. de Vitamina A y 2 U.I. de Vitamina D por 100 g de leche.

Los resultados del análisis cualitativo se muestran en la Tabla No. 4, donde se puede observar que el total de muestras vitaminadas correspondió a 33 (82.5%), de las cuales 3 (7.5%) contenían sólo la Vitamina A, otras tres (7.5%)

la Vitamina D y 27 de ellas (67.5%) presentaron ambas vitaminas.

Los datos anteriores son relativamente significativos, así como también los resultados del análisis semicuantitativo que se muestran en las Tablas No. 5 y 6, las cuales nos indican la distribución y la frecuencia de las leches vitaminadas de acuerdo a la concentración relativa de cada vitamina presente. De un total de 30 muestras con Vitamina A, el 66.67% (20) presentó menos de 150 U.I. de la vitamina por 100 g de leche, el 20.00% (6) una concentración igual a la de la leche cruda y sólo el 13.33% (4) una concentración superior. En lo que se refiere a la Vitamina D presente en las muestras de leche, el 70.00% (21) del total de muestras con esta vitamina (30) presentó menos de 2 U.I. de la vitamina por 100 g de leche y el 30.00% (9) una concentración igual a la leche de referencia.

TABLA No. 4

Frecuencia de muestras vitaminadas en relación a la(s) vitamina(s) presente(s). (40, total de muestras).

VITAMINAS	No. DE MUESTRAS	PORCENTAJE (%)
A	3	7.5
D	3	7.5
A,D	27	67.5
TOTALES	33	82.5

TABLA No. 5

Distribución del número de muestras vitaminadas en relación a la concentración relativa de las vitaminas liposolubles.

VITAMINAS	CONCENTRACION		
	MENOR	IGUAL*	MAYOR
A	20	6	4
D	21	9	—

*Concentración de vitamina en 100 g de leche cruda:

Vitamina A = 150 U.I.

Vitamina D = 2 U.I.

TABLA No. 6

Frecuencia porcentual de las muestras vitaminadas en base a la concentración relativa del contenido vitamínico.

VITAMINAS	CONCENTRACION		
	MENOR	IGUAL*	MAYOR
A	66.67	20.00	13.33
D	70.00	30.00	—

*Concentración de vitaminas en 100 g de leche cruda:

Vitamina A = 150 U.I.

Vitamina D = 2 U.I.

D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S

Para la identificación de las vitaminas liposolubles se tomaron en cuenta los valores de R_f de soluciones estándar, con lo que se pudo determinar la presencia de las Vitaminas A y D en cada una de las muestras analizadas.

En el análisis semicuantitativo se observó, que en relación a la concentración que presentaba la leche cruda, que se usó como estándar de referencia, hubo muestras en las que no se detectó ninguna concentración apreciable de estos compuestos y otras en las que se detectaron concentraciones menores y superiores. Estos datos demuestran

que en la mayoría de las muestras hubo una considerable disminución en la concentración de cada vitamina, por lo que en relación a ésto puede inferirse que tal reducción pudo deberse a que:

- 1) Durante la transportación de la leche cruda de los establos a las plantas pasteurizadoras se descuidó la refrigeración, lo que trajo como consecuencia el que se ocasionaran pérdidas de las vitaminas al elevarse la temperatura del alimento.
- 2) Durante el proceso de pasteurización las temperaturas elevadas originaron bajas en el contenido vitamínico, ya que se ha observado que por cada 8°C de aumento de la temperatura, la pérdida de nutrimentos se duplica (2).
- 3) El envasado de la leche se realizó en recipientes de vidrio transparente, lo cual expone al alimento a la acción de la luz y se pueden originar pérdidas; por lo cual se recomienda el uso de envases de cartón u otros que no permitan la entrada de luz.
- 4) Durante el almacenamiento anterior a la distribución del producto, no se haya respetado el tiempo establecido que garantiza al consumidor la calidad del mismo.

Por otra parte, una cantidad muy pequeña de muestras de leche analizada presentaron una concentración relativamente mayor de vitaminas que la de la leche cruda, de lo

cual se puede inferir, que ésto se debió tal vez, al enriquecimiento de la leche que en ocasiones se hace momentos antes de pasteurizarla.

En relación al número de muestras que contenían la misma concentración de estas vitaminas que la leche cruda, se observó que fue superior al número de muestras con un contenido vitamínico mayor, prevaleciendo una concentración menor en la mayoría del total analizado.

De lo antes expuesto, se concluye que, aunque el método de Cromatografía de Adsorción en Capa Fina para el análisis y cuantificación de Vitaminas Liposolubles es uno de los más recomendados, no proporciona resultados confiables mientras no se consideren las condiciones adecuadas para llevar a cabo su realización, lo cual implicaría en primer lugar, el tener que trabajar en cuartos con iluminación especial y sin corrientes de aire para que no se afecten las vitaminas; además de que es necesario utilizar material de laboratorio especial fabricado con vidrio opaco con sus respectivas tapaderas que protejan a las vitaminas de cualquier factor externo.

Considerando lo expuesto en la bibliografía, la leche es un alimento que contiene gran cantidad de nutrientes, por

lo que la ingestión diaria de un litro de leche como único alimento bastaría para suplir las necesidades vitamínicas en los niños, pero debido a que también son indispensables los demás nutrientes, es necesario combinar este alimento con carnes, verduras y harinas para que se alcance diariamente el aporte nutricional adecuado para su desarrollo y supervivencia.

Por último se recomienda a las personas que participan en la producción y manipulación de la leche, prestar atención a los cuidados que deben tenerse desde la alimentación de la vaca y durante la ordena; así como también en su transportación y refrigeración antes y después de pasteurizarla.

R E S U M E N

En este estudio se realizó la identificación y la determinación de la concentración relativa de las vitaminas liposolubles presentes en varias marcas de leche, utilizando el método de Cromatografía de Adsorción en Capa Fina.

Se utilizaron soluciones de cada una de las vitaminas para la identificación y varias muestras de leche cruda para llevar a cabo el análisis semicuantitativo.

La mayoría de las muestras analizadas presentaron concen-

traciones de Vitaminas A y D inferiores a la leche de referencia.

B I B L I O G R A F I A

1. Alais, C. 1971. Ciencia de la leche. C.E.C.S.A., España.
2. Badui, S. 1982. Química de los alimentos. Editorial Alhambra, México.
3. Braverman, J.B.S. 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. 3a. ed. Ediciones Omega, España.
4. De Ritter, E. 1976. Stability characteristics of vi-

tamins in processed foods. Food Technol. 30: 48-51.

5. Domínguez, X.A. 1975. Cromatografía en papel y en capa delgada. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, México.
6. Farranicop, H. 1944. The vitamin content of milk related to certain feeding practices in Arizona. University of Arizona, U.S.A.
7. Fisher, P., A. Bender. 1972. Valor nutritivo de los alimentos. Editorial LIMUSA, México.
8. György, O., W.N. Pearson. 1967. The vitamins. 2a. ed. Academic Press, Inc., U.S.A. Volumen VI.
9. Judkins, H., H. Keener. 1979. La leche: su producción y procesos industriales. C.E.C.S.A., México.
10. Kessler, H.G. 1981. Food engineering and dairy technology. Publishing House Verlag A. Kessler, Alemania.
11. Laitinen, H.A., W.E. Harris. 1975. Chemical analysis. McGraw-Hill, Inc., U.S.A.

12. Lampert, L.M. 1970. Modern dairy products. Chemical Publishing Company, Inc., U.S.A.
13. Merck, E. Información sobre cromatología en capa fina, II, Darmstadt (Rep. F. de Alemania).
14. Merck, E. Cromatofolios Al para cromatografía en capa fina. Darmstadt (Rep. F. de Alemania).
15. Panalaks, T. 1970. A gas chromatographic method for the determination of vitamin D in fortified non-fat dried milk. Analyst 95: 862-867.
16. Pomerans, Y., C.E. Meloan. 1978. Food analysis: theory and practice. Avi Publishing Company, Inc., U.S.A.
17. Porter, J.W.G. 1981. Leche y productos lácteos. Editorial Acribia, España.
18. Randerath, K. 1974. Cromatografía en capa fina. Ediciones Urmo, España. Enciclopedia de la Química Industrial. Tomo 8.
19. Robinson, C.H. 1979. Fundamentos de nutrición normal. C.E.C.S.A., México.

20. Rosell, J.M., I. Dos Santos. 1952. Métodos analíticos de laboratorio lactológico. Editorial Labor, España. Volumen I.
21. Salvat Editores. 1955. Diccionario enciclopédico salvat, 7a. ed. Editorial Orinoco, Venezuela. Tomo XII.
22. Sebrell, W., Harris. 1967. The vitamins. 2a. ed. Academic Press, Inc., U.S.A. Volumen I.
23. Sebrell, W., R. Harris. 1971. The vitamins. 2a. ed. Academic Press, Inc., U.S.A. Volumen III.
24. Sebrell, W., R.S. Harris. 1972. The vitamins. 2a. ed. Academic Press, Inc., U.S.A. Volumen V.
25. Skoog, D.A., D.M. West. 1975. Análisis instrumental. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México.
26. Stahl, E. 1965. Thin-layer chromatography, a laboratory handbook. Academic Press, Inc., Publishers, Berlín.

27. Strohecker, R., H.M. Henning. 1965. Vitamin assays, 023.7
tested methods. Verlag Chemie, GmbH, Darmstadt,
Alemania.

28. Stryer, L. 1976. Bioquímica. Editorial Reverté, S.A.,
Venezuela.

29. Zweig, G., J. Sherma. 1966-1977. Handbook of chroma-
tography. CRC Press, Inc., U.S.A. Volumen II.

