

# Búsqueda de alimentos ricos en provitamina D.

Tatiana Giráldez Sánchez, Eva Reyes Aguirre, Elena Berraquero  
Calero.

IES Ítaca, IES Galileo Galilei, IES Juan Duarte  
1º Bachillerato

Julia Kazakova, Rut Fernández, Rocío Benítez  
VI CONGRESO SCIENCEIES 2017 “JÓVENES CON  
INVESTIGADORES”

18/4/2017 Curso 2016/2017

## Índice:

1. Resumen
2. Introducción/descripción de la investigación
3. Finalidad
4. Planificación y objetivos
5. Fundamentos teóricos
6. Desarrollo experimental
  - 6.1 Materiales y reactivos
  - 6.2 Instrumentación
  - 6.3 Procedimiento experimental
  - 6.4 Condiciones instrumentales de medida
  - 6.5 Tratamiento de resultados
  - 6.6 Resultados finales
7. Conclusiones
8. Transferencia a la sociedad
9. Valoración personal
10. Agradecimientos
11. Bibliografía

## **1. RESUMEN:**

Se ha realizado la extracción de Provitamina D2 (Ergosterol) en muestras de origen vegetal mediante una serie de procedimientos físico-químicos llevados a cabo en un laboratorio de análisis químico. Las muestras seleccionadas fueron lechuga, dátiles, uvas, arroz y champiñones. Una vez realizado el análisis se compararon los contenidos en Provitamina D2 de cada una de ellas.

## **2. INTRODUCCIÓN/DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:**

En este proyecto hemos seleccionado diversas muestras de alimentos como lechuga, dátiles, arroz, uva y champiñón con las que hemos realizado una serie de análisis para determinar su contenido en Provitamina D2. Para ello, se ha utilizado un procedimiento de extracción con hexano, así la provitamina D2 fue aislada de cada muestra y posteriormente medida en un sistema instrumental llamado Cromatógrafo líquido de alta resolución con detección de ultravioleta-visible. Este sistema, nos permitió averiguar la cantidad exacta de Provitamina D2 en cada tipo de alimento empleando un método de comparación (calibración) de los resultados de las muestras con referencias preparadas por nosotros en el laboratorio a partir de las sustancias puras (patrones). Finalmente, una vez realizadas todas las medidas en el cromatógrafo, se realizaron una serie de cálculos matemáticos (preparación de la una recta de calibrado de 5 puntos), llegando así a saber la cantidad de provitamina D2 que tiene cada uno de nuestros alimentos.

## **3. FINALIDAD:**

La finalidad de este proyecto es lograr averiguar qué cantidad de provitamina D2 tiene cada muestra y compararlas para poder saber cuál de estos alimentos seleccionados presenta un mayor enriquecimiento en dicho precursor de vitamina D. Gracias a esto podremos recomendar a personas con un déficit de esta vitamina la ingesta de ciertos alimentos de forma preferente y habitual tomar más cantidad de estos alimentos naturales y así evitar que tengan que tomar complementos vitamínicos.

## **4. PLANIFICACIÓN Y OBJETIVOS:**

Nuestro trabajo consiste en mediante procesos y manipulación de las muestras lograr saber cuál de nuestras ellas tiene mayor cantidad de provitamina D2.

Este se puede dividir en tres partes:

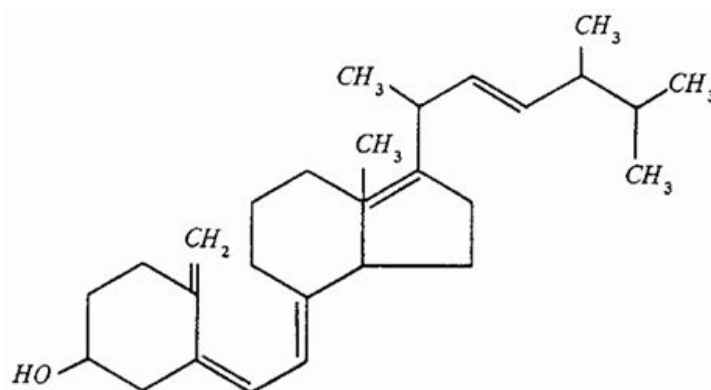
1- Preparación previa de las muestras para extraer la provitamina D2 y realización del procedimiento de extracción de Provitamina D2 con Hexano.

2- Preparación de un conjunto de disoluciones que contienen las sustancias a analizar (en nuestro caso se analizarán los compuestos vitamina D2(calciferol), provitamina D2 (ergosterol) y vitamina D3(colecalciferol)) preparadas a partir de las sustancias puras(patrones) compradas comercialmente, a diferentes rangos o concentraciones.

3- Medida de todas las disoluciones y muestras en el sistema cromatográfico y posterior adquisición de resultados brutos para su posterior tratamiento matemático.

## 5. FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

La existencia de la vitamina D como una sustancia presente en los alimentos fue descubierta en 1922 por Elmer McCollum, al observar que tratando con oxígeno el aceite de hígado de bacalao se destruía una sustancia esencial (el llamado entonces "factor A") pero quedaba otra, la que tenía efecto antirraquítico, que al ser la cuarta vitamina conocida se designó con la letra D. El efecto preventivo de la luz solar sobre el raquitismo ya había sido indicado por Armand Trousseau en 1861. A partir del descubrimiento de la relación entre raquitismo y vitamina D, se pudo establecer que esta sustancia se producía en la piel por la acción de la luz solar, e incluso al irradiar algunos alimentos con luz UV. En la década de 1930, Adolf Windaus descubrió la estructura química de la vitamina D y su relación con los esteroides. Recibió por ello el premio Nobel en 1928, el primero en cuya concesión se mencionan las "vitaminas".



*Vitamina D*  
(*calciferol*)

La vitamina D es de tipo liposoluble de estructura química esteroidea. Se puede obtener a través de alimentos que la contengan y también la podemos sintetizar en la piel a partir de colesterol y la acción de la radiación ultravioleta del sol. Ésta es estable frente al calor (hasta los 150°C) y relativamente resistente a la oxidación, aunque puede oxidarse al ser insaturada, siendo en cambio sensible a la acción de la luz.

La vitamina D es necesaria para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los huesos. Su función más importante es la de mantener la homeostasis de calcio, ya que interviene en la absorción de éste en el intestino. Cuando no hay tanto calcio como el cuerpo requiere, la vitamina D manda una señal a los osteoblastos para disolver el calcio almacenado en los huesos y así regular la homeostasis.

Es por ello que se necesita ingerir una cantidad considerable de alimentos que contienen provitamina D. Se estima que esta cantidad debería ser entre 800-1000 UI, pero pocos alimentos la contienen además de que en muchos de los casos, sintetizar esta provitamina con ayuda de las radiaciones ultravioletas de la luz del sol en zonas de alta insolación llegan a seguir siendo insuficientes para obtener los niveles sugeridos por lo que prácticamente siempre se va a necesitar de suplementos o de una mayor cantidad de ingesta de alimentos que contengan esta vitamina.

La deficiencia de esta vitamina provoca problemas de salud que pueden llegar a ser muy graves como el raquitismo y la osteomalacia (trastornos de la mineralización de los huesos habitualmente debidos a unos niveles insuficientes de vitamina D o de fosfato en el cuerpo) y se ha relacionado con un mayor riesgo de hipertensión, diabetes, enfermedades autoinmunes y cáncer.

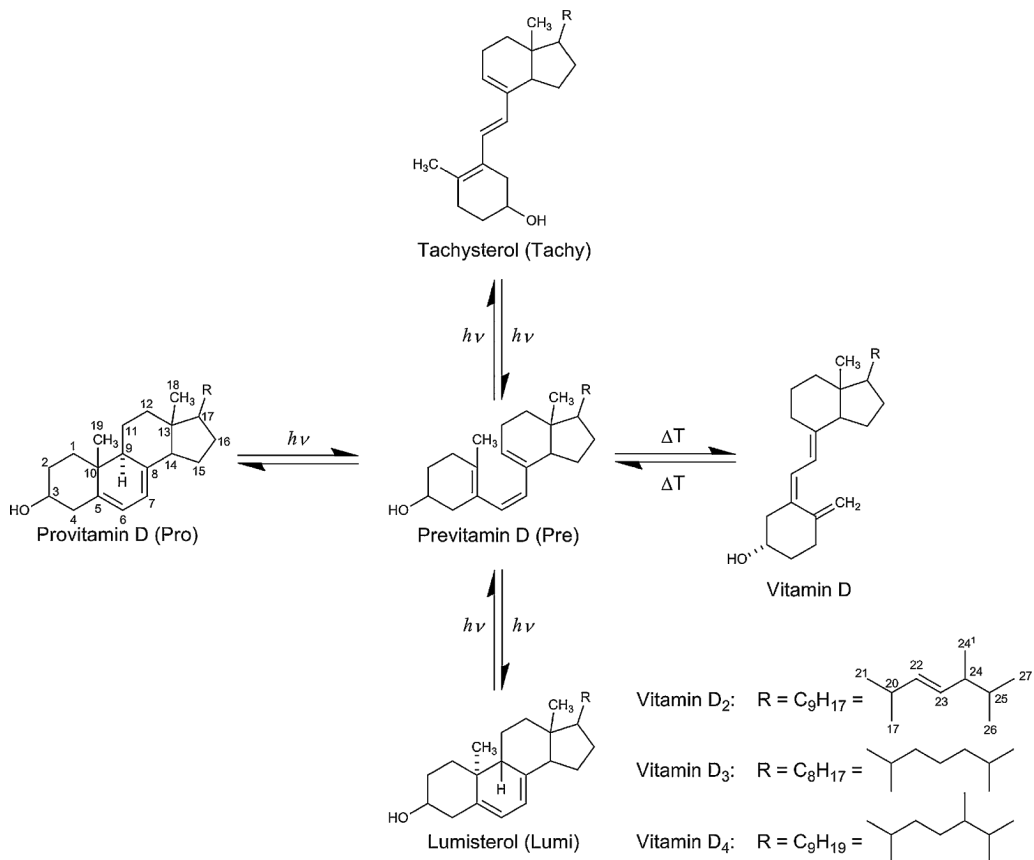
Existen numerosos estudios que comparan la vitamina D2 y la vitamina D3 y la mayoría, aunque no todos, encuentran que la eficacia de la vitamina D3 en el cuerpo humano es igual o superior, pero en ningún caso es menor. Por ello, en los alimentos fortificados y en los suplementos nutricionales deberíamos buscar colecalciferol, la vitamina D3. Además de ser más eficaz, la suplementación con vitamina D3 también parece ser capaz de mantener niveles adecuados de vitamina D en sangre durante más tiempo, lo que es beneficioso durante las estaciones de baja incidencia solar en longitudes muy septentrionales y meridionales

En cuanto al tratamiento farmacológico, ambas vitaminas han demostrado una efectividad similar contra enfermedades relacionadas con deficiencia de vitamina D. Aunque aquí también hay estudios que apuntan a una mayor eficacia de la vitamina D3 y mayor rango terapéutico antes de que aparezca toxicidad, motivos por los que se utiliza preferiblemente la vitamina D3 como fármaco.

Si escogemos como fuente de vitamina D la luz solar, debemos exponer nuestra piel durante un periodo de tiempo que depende de su color. Para las pieles más claras, basta una exposición de entre 10 y 15 minutos en la cara y los antebrazos, o una superficie equivalente de piel. Si la superficie expuesta es mayor, el tiempo puede reducirse. A partir de los 20 minutos, no se observa conversión de provitamina D, así que una exposición más larga resulta innecesaria. Las personas de piel más oscura deberán aumentar el tiempo de exposición entre tres y seis veces; de manera que, una persona de piel muy oscura necesitará alrededor de una hora para que su organismo pueda sintetizar suficiente provitamina D. Durante el invierno, puede producirse lo que se conoce como “invierno de la vitamina D”: si la radiación ultravioleta no es suficiente, nuestro organismo no puede sintetizarla, teniendo que emplear sus reservas. Esto es posible para los adultos, pero no para los niños, que todavía no son capaces de almacenar esta vitamina, y tienen que acudir a medios alternativos.

Dentro de la provitamina D que sintetizamos en nuestro cuerpo podemos encontrar dos tipos: provitamina D3 (7-dehidrocolesterol), de origen animal, y provitamina D2 (ergosterol), de origen vegetal. Las radiaciones ultravioletas de la luz del sol transforman estas provitaminas en colecalciferol (vitamina D3) y ergocalciferol (vitamina D2) respectivamente.

La provitamina D2 está muy presente en muchos alimentos tanto de origen animal como vegetal, como por ejemplo en el pescado, los huevos, las setas etc; A la hora de tomar un alimento, esta provitamina D2 no se convierte en una vitamina como tal directamente, sino que hay que sintetizarla. Poniendo como ejemplo la síntesis de la vitamina D, que encontramos descrita en la bibliografía para los champiñones, se ha demostrado que en el champiñón se encuentra la provitamina D (Pro) la cual se transforma en la previtamina D (Pre) mediante la luz ultravioleta y que posteriormente se transforma en vitamina D mediante la acción de calor. Pero durante el proceso de síntesis y por acción de luz ultravioleta se generan sustancias tóxicas tales como taquisterol (Tachy) y el lumisterol (Lumi) a partir de la previtamina D (Pre). Estas sustancias tóxicas presentes en el champiñón son perjudiciales para el ser humano si es ingerido en grandes cantidades y es por eso que se debe moderar su ingesta.



## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL:

### 6.1. MUESTRAS DE ALIMENTOS UTILIZADOS

Se han utilizado muestras de los siguientes alimentos: dátil, lechuga, champiñón, uva y arroz.



6.2.




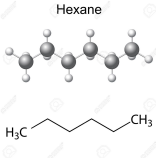

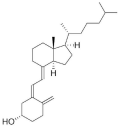
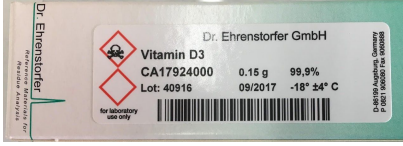
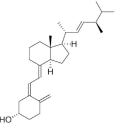
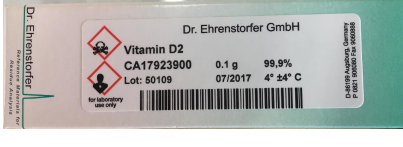
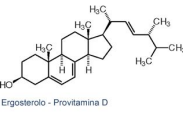
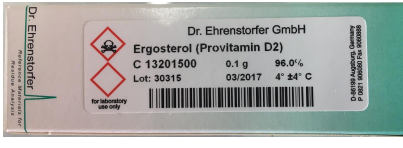




MATERIALES Y REACTIVOS:


Espátulas	
Microviales de inyección	
Balanza analítica de precisión	
Vaso precipitado de 50 mL	
Viales de vidrio de 10 mL	
Papel de plata	

<p>Matraz de 10mL</p>	
<p>Probetas</p>	
<p>Molinillo de café</p>	
<p>Micropipetas de 10-100 <math>\mu</math>L y 100-1000 <math>\mu</math>L</p>	
<p>Frasco lavador</p>	
<p>Microfiltros de jeringa de 0.45<math>\mu</math>m</p>	
<p>Tubo falcon de 15 mL</p>	

<p>Parafilm</p>	
<p>Ácido fórmico</p>	
<p>Metanol</p>	
<p>Hexano</p> <p>Hexane</p> 	
<p>Vitamina D3</p>  <p>Colecalciferol Vitamina D3</p>	
<p>Vitamina D2</p>  <p>Ergocalciferol Vitamina D2</p>	
<p>Provitamina D2 (Ergosterol)</p>  <p>Ergosterolo - Provitamina D</p>	

## 6.2. INSTRUMENTACIÓN:

<p>Ultracongelador</p>	<p>Sirve para congelar las muestras y así poder mantenerlas intactas por mucho más tiempo consiguiendo así su buen estado a largo plazo.</p>	 A tall, white laboratory ultra-freezer with its door open, showing internal shelves and drawers. It has red emergency stop buttons on the door.
<p>Liofilizador</p>	<p>Éste se utiliza para eliminar el agua en productos o disoluciones en condiciones de baja presión y temperatura lo que favorece que estos productos deshidratados conserven todas sus propiedades estables. Consta de tres partes que son:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>-Cámara seca o cámara de liofilización: es el lugar donde se coloca la sustancia a liofilizar.</li><li>-Condensador con circuito de refrigeración: comunica con la cámara seca y es donde se condensa el vapor que se va produciendo.</li><li>-Sistema de vacío.</li></ul>	 A compact, stainless steel lyophilizer with a control panel on the front and a large cylindrical chamber on top with several ports.
<p>Centrifuga</p>	<p>Es un equipo de laboratorio que genera movimientos de rotación, tiene el objetivo de separar por densidad a los componentes o fases en que constituyen una muestra.</p>	 A small, white laboratory centrifuge with its lid open, showing the rotor and sample tubes inside. It has a control panel on the front.

<p>Sistema de extracción en fase sólida (Vacuum Manifold)</p>	<p>Dispositivo para preparar o concentrar muestras para su posterior uso en HPLC, HPLC-MS o GC-MS. Se le puede acoplar una bomba de vacío y una conexión para una bala de nitrógeno. De esta forma el sistema de extracción en fase sólida se puede utilizar para evaporar disolventes.</p>	
<p>Cromatografo Líquido de Alta Resolución (HPLC) acoplado a un sistema de detección ultravioleta-visible</p>	<p>Es un equipo que permite la separación, cuantificación e identificación de componentes de una mezcla. Está compuesto por una bomba de alta presión, un inyector automático y un sistema de detección ultravioleta/visible.</p>	
<p>Baño de ultrasonidos</p>	<p>Este sistema es utilizado para homogeneizar muestras. Se basa en que el interior de la cubeta lleno de agua vibra a una frecuencia determinada.</p>	
<p>Columna de separación cromatográfica (Synergi 2,5 u Hydro-RP 100 A 100×3.00 mm 2,5μ)</p>		

### 6.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

Se seleccionan una serie de alimentos de origen vegetal que según la bibliografía están enriquecidas en provitamina D y son: lechuga, champiñón, uva, arroz y dátil. De cada alimento se harán dos muestras, teniendo un total de 10 muestras. Para la preparación previa de las muestras se han de realizar unos procesos básicos primarios como son: limpiar y cortar las muestras, congelar las muestras en el ultracongelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente liofilizarlas consiguiendo eliminar el contenido de agua del alimento debido a las condiciones de bajas presiones y temperaturas que el liofilizador ejerce sobre las muestras. Algunas veces es necesario liofilizarlas dos veces debido a que el alimento contiene gran cantidad de agua. Finalmente se trituran en molinillo para obtener un polvo fino antes de la etapa de extracción.

Posteriormente, para llevar a cabo el proceso de extracción se pesan, en una balanza analítica, 0,5 gr de cada muestra (hay que tener en cuenta que aunque la balanza analítica es un instrumento de gran precisión, en nuestro caso no se pesó exactamente los 0,5000 gr) a los que se le añaden 6 mL de hexano y 1 mL de vitamina D<sub>3</sub>(patrón interno). Se agita la mezcla manualmente durante cinco minutos y posteriormente se centrifuga a 3200 g durante 15 minutos. El resultado será un líquido (sobrenadante) y un sólido al fondo del tubo falcon. El sobrenadante se trasvasa al vial de vidrio de 30ml, se tapa con papel de aluminio para evitar la degradación de la provitamina D<sub>2</sub> ya que esta es sensible a la luz solar. A continuación, al sólido se le añaden 6 ml de hexano y se repite el proceso de extracción explicado anteriormente. El sobrenadante recogido de la segunda extracción se añade en el mismo vial que el recogido en la primera extracción. Finalmente, se procede a la evaporación del disolvente orgánico (hexano) bajo una corriente de nitrógeno hasta casi sequedad. Las muestras evaporadas se reconstituyen con 1 mL de metanol y se dejan 15 minutos en el ultrasonidos para homogeneizar las mismas. Posteriormente, se microfiltran las muestras con un microfiltro de jeringa de  $0.45\mu\text{m}$

Una vez preparadas las muestras, se procedió a la preparación de los patrones para la recta de calibrado que se medirá posteriormente en HPLC. Para ello se parte de una disolución patrón de cada una de las vitaminas cuya concentración es de 100 mg/L. A partir de esas disoluciones patrón se prepara una disolución intermedia que contiene ergosterol y vitamina D<sub>3</sub> y a partir de esa se preparan las disoluciones diluidas de concentraciones 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/L.

#### 6.4 CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA:

Para la medida en el sistema cromatográfico fue necesario poner las condiciones de cada parámetro del instrumento óptimas. La separación de los distintos componentes a analizar (ergosterol, vitamina D2 y Vitamina D3, siendo este último nuestro patrón interno de referencia para poder cuantificar), se llevó a cabo aplicando en el cromatógrafo lo que se denomina gradiente de separación, que consiste en introducir una mezcla de disoluciones y disolventes a través del cromatógrafo que atraviesan una columna de separación, variando con el tiempo dichas proporciones, esto hace que cada compuesto llegue al final del sistema a tiempos diferentes y podamos analizar cada uno por separado aunque en la disolución de partida estén todos juntos. En nuestro caso se aplicó el gradiente de separación que se muestra en la siguiente tabla:

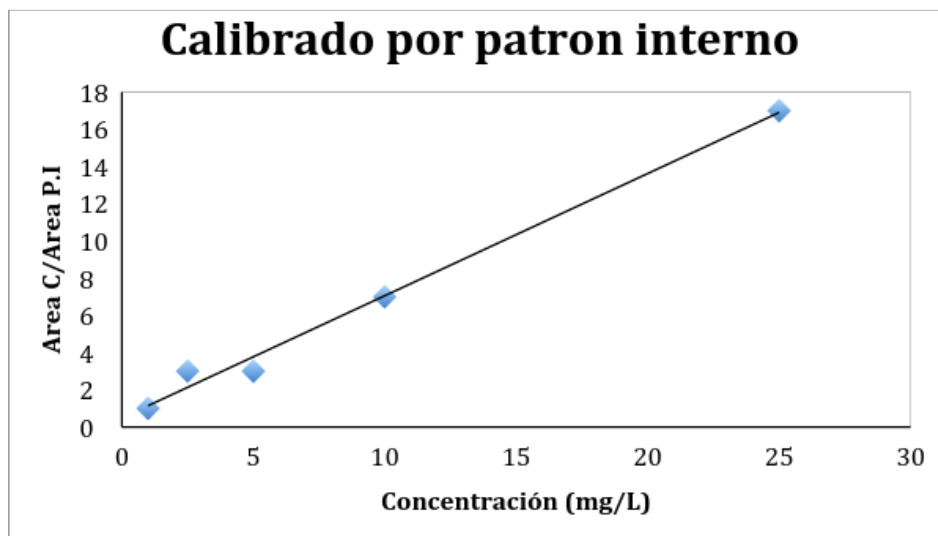
Tiempo (min)	% Agua + 0,01% de Ácido Fórmico	% Acetonitrilo	Flujo (mL/min)
0	1	99	0,5
4	1	99	0,5
5	10	90	0,5
8	10	90	0,5
8,1	1	99	0,5
10	1	99	0,5

Así, una vez recorrida por completo la columna, llegan a una zona donde se mide su absorción de luz, es lo que se llama detector, en nuestro caso era un detector ultravioleta-visible. Cada compuesto absorbe luz de unas determinadas longitudes de onda y así podemos identificar de qué compuesto se trata. En la siguiente tabla se muestran los tiempos de elución (tiempo que tarda cada compuesto en atravesar el cromatógrafo) característicos de cada compuesto medido así como las longitudes de onda de absorción de luz características de cada uno de los compuestos.

Compuesto	Tiempo elución (min)	Longitud onda (nm)
Colecalciferol (Vitamina D3)	5,23	250
Ergocalciferol (Vitamina D2)	5,36	255
Ergosterol (Provitamina D2)	7,31	270

## 6.5 TRATAMIENTO DE RESULTADOS:

Calibrar es establecer referencias (de concentración conocida y preparadas por nosotras, es decir, 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/L) para averiguar las áreas que corresponden a esas concentraciones. Existen varias formas de calibrar: el calibrado directo y el calibrado por patrón interno. El calibrado que nosotras hemos empleado es por patrón interno para ello se usa una referencia de concentración constante y conocida, en nuestro caso es vitamina D3 de 1 mg/L. Si siempre es la misma concentración el área debe ser siempre igual. Pero varía entre inyección e inyección. Esa variación nos permite corregir las áreas del resto de inyecciones y detectar posibles variaciones no deseadas en nuestro procedimiento. Lo que se hace es representar en el gráfico de calibración (Área compuesto/ Área patrón interno) vs concentración compuesto o sea,



Vemos que es lineal mediante microsoft excel averiguó la ecuación de la recta a la que corresponden esos pares de datos. Esto es un procedimiento estadístico llamado: “ Ajuste por mínimos cuadrados”. La ecuación que obtenemos es  $y = ax + b$ , es decir, Área = pendiente·C + ordenada, donde C es la concentración del compuesto en mg/L. En nuestro caso la ecuación es

$$y = 0,6568x + 0,4857$$

Una vez que ya tenemos nuestro calibrado realizado, ahora solo hay que calcular la concentración del ergosterol para cada muestra medida. Con los datos obtenidos de cada muestra, uva, lechuga, dátil, arroz, y champiñón, es decir, las áreas de la vitamina D3 y el área del ergosterol, los introducimos en la siguiente expresión:



$$\frac{Area_{Ergosterol}}{Area_{Patron\ Interno}} = Pendiente \times Concentración_{Ergosterol} + ordenada$$

Lo único que nos queda es sustituir en la expresión anterior cada uno de los datos y obtener la concentración de cada compuesto en cada una de las muestras en mg/L.

## 6.7 RESULTADOS FINALES:

Según el tratamiento de los datos descrito en el apartado anterior, los resultados obtenidos son los que se muestran en la tabla siguiente.

Muestra	Contenido medio en ergosterol(mg/g) extracto seco	% Humedad	Contenido en ergosterol (mg/g) en muestra
Arroz	<2	14	<0,28
Uva	<2	81,6	<1,62
Dátil	<2	73	<1,46
Lechuga	1890,5 ± 16	94	1191,0 ± 10
Champiñón	3790,9 ± 213	63	3563,5 ± 201

El contenido en ergosterol en muestra se calculó teniendo en cuenta el porcentaje de humedad de cada alimento.

## 7. CONCLUSIONES:

De aquellas muestras que utilizamos para la investigación de nuestro proyecto hemos averiguado que aquellos alimentos con más cantidad de provitamina D en su composición son la lechuga y el champiñón. En la muestra de champiñón vemos que tiene una concentración de 3563,5 ± 201 mg de ergosterol por gramo de champiñón mientras que en la lechuga se observa una concentración de 1191,0 ± 10 mg de ergosterol por gramo de lechuga consumido.

Esto nos lleva a la conclusión de que el consumo regular tanto de lechuga como de champiñón nos podría ayudar a reducir aquellos déficits de Vitamina D sin tener que tomar ningún suplemento vitamínico, si no que sería de una manera totalmente natural y sana.

## **8. TRANSFERENCIA A LA SOCIEDAD:**

Al averiguar cuál de los alimentos seleccionados tiene mayor cantidad de esta sustancia en su composición se podría concienciar a las personas de este hallazgo mediante conferencias etc.

Una forma clara de potenciar esto sería averiguando de qué forma la ingesta de este alimento es más positiva para que el cuerpo pueda llegar a sintetizar una mayor cantidad de esta provitamina.

Actualmente hay un elevado número de personas con déficit de esta provitamina que ni siquiera son conscientes de que lo padecen. Concienciar a la gente de que estos alimentos contienen una elevada cantidad de esta provitamina es una buena forma de fomentar su consumo y prevenir o solucionar esta carencia de una forma natural y saludable.

## **9. VALORACIÓN PERSONAL:**

Ha sido una experiencia enriquecedora, sobre todo acercarnos al mundo de la investigación y desarrollar por nosotras mismas (aunque siempre contando con la ayuda y colaboración de las investigadoras y la profesora) este proyecto.

Este proyecto nos ha ayudado a ver la gran amplitud que tiene el campo de la ciencia y de la investigación así como lo interesante e importante que es para el mundo encontrar cosas innovadoras para el uso cotidiano o como una mejora en la salud de las personas.

## **10. AGRADECIMIENTOS:**

A las investigadoras Rut y Julia y a la profesora Rocío por ayudarnos y enseñarnos en todo momento.

A los profesores de nuestros institutos por mostrarnos este proyecto y por sacrificar parte de su tiempo por nosotros.

Al proyecto de Jóvenes con Investigadores por darnos esta fantástica oportunidad para acercarnos al mundo de la investigación.

## **11-BIBLIOGRAFÍA:**

<https://medes.com/publication/71596>

<http://www.ecoagricultor.com/la-vitamina-d-funcion-fuentes-y-cantidades-recomendadas/>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.10338/full>

[http://www.teinteresa.es/Microsites/Pregunta\\_al\\_medico/Alimentacion/vicentelahera/importante-vitamina-tomamos\\_0\\_915508566.html](http://www.teinteresa.es/Microsites/Pregunta_al_medico/Alimentacion/vicentelahera/importante-vitamina-tomamos_0_915508566.html)