



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Estudio de los efectos de la pasteurización sobre los niveles de vitaminas,  
elementos esenciales y elementos potencialmente tóxicos en leche materna**

**Jessica Santander**

**Tesis de Doctorado en Química**

Presentada como uno de los requisitos para el título de

**Doctor**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

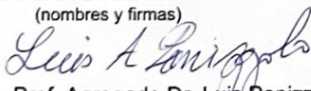
Noviembre 2024

|                       |                                                                                                                                                       |                     |               |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------|
| CARRERA DE POSGRADO   | Doctorado en Química                                                                                                                                  |                     |               |
| ESTUDIANTE            | NOMBRE:<br>Jessica Santander                                                                                                                          | C.I.<br>4683977-0   |               |
| DEFENSA               | LUGAR<br>Facultad de Química                                                                                                                          | FECHA<br>28/11/2024 | HORA<br>10:00 |
| TÍTULO DE TESIS       | Estudio de los efectos de la pasteurización sobre los niveles de vitaminas, elementos esenciales y elementos potencialmente tóxicos en leche materna. |                     |               |
| DICTAMEN <sup>1</sup> | CALIFICACIÓN<br>Excelente                                                                                                                             | NOTA<br>12          |               |

JUSTIFICACIÓN

El tema de tesis es de interés multidisciplinario y de importancia para la salud pública en general, así como para la gestión y los procesos en los bancos de leche humana.  
Se destaca la originalidad de estos resultados para nuestro país.  
Los aportes comparando diferentes dietas y cambios intradía e intrames, en la composición de la leche materna son un resultado muy importante de esta tesis que servirá como insumo para otras investigaciones.  
La introducción posee una descripción muy detallada, comprensible y completa del ciclo de lactancia, la composición de la leche materna, el proceso de lactogénesis, así como el funcionamiento de los bancos de leche humana en nuestro país e internacionalmente.  
La discusión acerca de los oligoelementos a estudiar, así como los micronutrientes fue muy buena y detallada, no solo para los componentes nutricionales del estudio como algunos elementos potencialmente tóxicos (plomo y arsénico). El estado del arte de la descripción de las metodologías analíticas disponibles para las determinaciones de vitaminas y oligoelementos fue muy exhaustivo.  
Los objetivos están correctamente planteados. Los resultados y la discusión están presentados de una forma ordenada cumpliendo con los objetivos presentados.  
  
En suma, el manuscrito de tesis es claro, ordenado y la lectura del mismo es fluida y amena.  
La presentación oral fue excelente, con un uso acertado de los recursos audiovisuales. Es de destacar que la tesista contestó las preguntas del tribunal con solvencia y seguridad.  
  
Por todo lo antes expuesto el tribunal le otorga la calificación: excelente (12)

DIRECTORES DE TESIS  
(nombres y firmas)

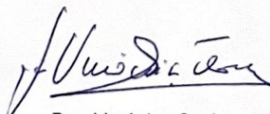
  
Prof. Agregado Dr. Luis Panizzolo Rodríguez

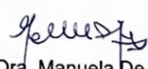
  
Prof. Agregado Dr. Ignacio Machado

  
Prof. Adjunto Dra. Analía

TRIBUNAL  
(nombres y firmas)

  
Dra. Valery Bühl

  
Dra. Verónica Cesio

  
Dra. Manuela De María

<sup>1</sup> La Tesis podrá resultar:

- a) Aprobada con las siguientes calificaciones (notas): Excelente (10, 11 ó 12); Muy Bueno (8 ó 9); Bueno (5, 6 ó 7); Aceptable (3 ó 4).  
b) Reprobada con las siguientes calificaciones: Insuficiente (1 ó 2); Muy Insuficiente (0).



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS  
Ministerio de Educación y Cultura - Universidad de la República

Área Química

ACTA. En Montevideo al 28 de noviembre de 2024, se reúne en Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de tesis de Doctorado en Química que postula el/la Qca. Jessica Santander, cuyo título es "Estudio de los efectos de la pasteurización sobre los niveles de vitaminas, elementos esenciales y elementos potencialmente tóxicos en leche materna".

Asisten todos sus integrantes: Dra. Manuela De María, Dra. Verónica Cesio, Dra. Valery Bühl (tribunal) y Dr. Luis Panizzolo, Dr. Ignacio Machado, Dra. Analía Rodríguez (Directores de tesis).

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

El tema de tesis es de interés multidisciplinario y de importancia para la salud pública en general, así como para la gestión y los procesos en los bancos de leche humana. Se destaca la originalidad de estos resultados para nuestro país. Los aportes comparando diferentes dietas y cambios intradía e intrames en la composición de la leche materna son un resultado muy importante de esta tesis que servirá como insumo para otras investigaciones. La introducción posee una descripción muy detallada, comprensible y completa del ciclo de lactancia, la composición de la leche materna, el proceso de lactogénesis, así como el funcionamiento de los bancos de leche humana en nuestro país e internacionalmente. La discusión acerca de los oligoelementos a estudiar así como los micronutrientes fue muy buena y detallada, no solo para los componentes nutricionales del estudio como algunos elementos potencialmente tóxicos (plomo y arsénico). El estado del arte de la descripción de las metodologías analíticas disponibles para las determinaciones de vitaminas y oligoelementos fue muy exhaustivo. Los objetivos están correctamente planteados. Los resultados y la discusión están presentados de una forma ordenada cumpliendo con los objetivos presentados. En suma, el manuscrito de tesis es claro, ordenado y la lectura del mismo es fluida y amena. La presentación oral fue excelente, con un uso acertado de los recursos audiovisuales. Es de destacar que la tesista contestó las preguntas del tribunal con solvencia y seguridad.

Po todo lo antes expuesto el tribunal le otorga la calificación: excelente (12)

Firmas de los integrantes del tribunal (todos en pie de igualdad, sin discriminar presidente, etc)

*[Firma]*  
M. De María

*[Firma]*  
V. Cesio

*[Firma]*  
Valery Bühl

*[Firma]*  
I. Machado

*[Firma]*  
A. Rodríguez

*[Firma]*  
Luis A. Panizzolo

Firmas del/los tutor/es (opcional y preferentemente todas las firmas en la misma hoja)

**ÁREA QUÍMICA**

Facultad de Química. Av. General Flores 2124, Montevideo 11800, URUGUAY

Teléfonos: (+598) 29242338. Fax: (+598) 29241906.

Página web: [www.pedeciba.edu.uy/quimica](http://www.pedeciba.edu.uy/quimica)

Correo electrónico: [presupuestoquimica@pedeciba.edu.uy](mailto:presupuestoquimica@pedeciba.edu.uy) - [gabig@fq.edu.uy](mailto:gabig@fq.edu.uy)

# **Estudio de los efectos de la pasteurización sobre los niveles de vitaminas, elementos esenciales y elementos potencialmente tóxicos en leche materna**

Jessica Santander

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química  
Universidad de la República  
2024

## **DIRECTORES**

Prof. Agregado Dr. Luis Panizzolo  
Facultad de Química, Universidad de la República

Prof. Agregado Dr. Ignacio Machado  
Facultad de Química, Universidad de la República

Prof. Adjunto Dra. Analía Rodríguez  
Facultad de Química, Universidad de la República

## **DIRECTOR ACADÉMICO**

Prof. Agregado Dr. Luis Panizzolo  
Facultad de Química, Universidad de la República

**Estudio de los efectos de la pasteurización sobre los niveles de vitaminas, elementos  
esenciales y elementos potencialmente tóxicos en leche materna**

**Tribunal:**

**Dra. Valery Bühl**

**Dra. Verónica Cesio**

**Dra. Manuela De María**

**Dr. Luis Panizzolo, director de tesis**

**Dr. Ignacio Machado, director de tesis**

**Dra. Analía Rodríguez, directora de tesis**

## **Agradecimientos**

A mis tutores: Dr. Ignacio Machado, Dra. Analía Rodríguez y Dr. Luis Panizzolo.

A los miembros del tribunal por haber accedido al estudio de esta tesis y por sus aportes.

Al personal del Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell por su apoyo y compromiso con este trabajo de tesis. Especialmente a: Lic. Arturo Puyol, Dra. Lilián Carroscia, Mag. Lic. Laura Fazio y Dra. Gabriela Siré.

A todas las madres donantes ya que sin ellas este trabajo no habría sido posible. Especialmente a: B.C. Paulina Pizzorno.

A los Dres. Ana Hernández y Claudio Rodríguez del Área de Inmunología del Instituto de Higiene – Udelar, por su importante apoyo en los comienzos de este trabajo de tesis.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por su apoyo a través de la financiación de un proyecto en la convocatoria Vinculación Universidad – Sociedad y Producción (CSIC-VUSP), titulado “Estudio de la composición de oligosacáridos, vitaminas, elementos indispensables y elementos potencialmente tóxicos en leche donada al Banco de Leche Humana – Centro Hospitalario Pereira Rossell” (responsable Dr. Luis Panizzolo).

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por su apoyo económico y académico.

A los compañeros de Química Analítica por su apoyo a lo largo de estos años.

A Facultad de Química – Udelar por hacer posible la concreción de este trabajo.

A mi familia y amigos.

## Resumen

La leche humana aporta diversos nutrientes que favorecen el crecimiento de los lactantes y los protegen contra enfermedades. Sin embargo, la pérdida de estos nutrientes puede causar importantes problemas de salud. Asimismo, la composición química de la leche humana varía a lo largo del tiempo de acuerdo con los requerimientos energéticos y nutricionales del lactante, siendo el volumen de producción variable entre madres. En este sentido, los bancos de leche humana tienen como objetivo apoyar la lactancia materna de los recién nacidos, cuyas madres no cuentan con suficiente leche para su adecuada nutrición. Pero ésta debe ser previamente pasteurizada para asegurar la inactivación de agentes microbianos. En este sentido, el protocolo más utilizado para tratar la leche humana donada es la pasteurización Holder, proceso que consiste en calentar la muestra a 62,5 °C durante 30 min. Este proceso puede provocar la pérdida de nutrientes sensibles al calor y a las condiciones ambientales. En este contexto, en el marco de esta tesis se planteó la evaluación de los niveles y de las potenciales pérdidas de oligoelementos y vitaminas en leche humana donada (obtenida del Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell), debido al proceso térmico de pasteurización, en un grupo de analitos de gran implicancia en la nutrición y salud de los lactantes: arsénico, cobre, hierro, iodo, plomo, selenio, zinc, retinol,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido fólico, ácido ascórbico y cobalamina. Con este fin se buscó desarrollar métodos analíticos que fueran eficientes para la extracción cuantitativa de los analitos, aplicando, en lo posible, procedimientos multianalito y alineados con la Química Analítica Verde.

Con el objetivo de evaluar los niveles y las pérdidas de vitaminas luego de la pasteurización, se optimizaron tres métodos de extracción y las condiciones cromatográficas necesarias. Para la determinación simultánea de retinol,  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno se empleó un procedimiento de saponificación, mientras que el ácido fólico y el ácido ascórbico se extrajeron mediante extracciones simples con disolvente, seguido del análisis mediante cromatografía líquida de alta presión con detección de arreglo de diodos. Las concentraciones en muestras de leche humana donada cruda fueron:  $1,5 \pm 0,2/0,38 \pm 0,08$  (retinol),  $12,8 \pm 2,5/2,9 \pm 0,7$  ( $\alpha$ -tocoferol),  $0,58 \pm 0,08/0,067 \pm 0,009$  ( $\beta$ -caroteno),  $1,05 \pm 0,20/20,3 \pm 4,7$  (ácido fólico),  $55,4 \pm 4,1 / 36,1 \pm 5,9$  (ácido ascórbico),  $0,0018 \pm 0,0004/0,00039 \pm 0,00008 \pm$  (cobalamina) (calostro/madura, mg L<sup>-1</sup>). Se

observaron pérdidas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) luego de la pasteurización para todos los compuestos estudiados, que oscilaron entre 6,4 % y 14,2 %. Las pérdidas de vitaminas liposolubles fueron mayores en el calostro, probablemente debido a las menores concentraciones de grasa en esta etapa, mientras que se observó la tendencia opuesta para las vitaminas hidrosolubles. El ácido ascórbico fue el compuesto más afectado, con pérdidas de 14,2 %. Las concentraciones de los analitos fueron mayores en el calostro respecto a la leche madura, a excepción del ácido fólico, tal como se reporta en la literatura.

En cuanto a las determinaciones elementales, se optimizó un método de extracción multielemento basado en una extracción asistida por microondas, seguido del análisis mediante diferentes técnicas de espectrometría atómica. En el caso del iodo, se realizó una extracción ácida por vía abierta y el posterior análisis mediante el método espectrofotométrico de referencia. Las concentraciones en muestras de leche humana donada cruda fueron:  $0,0042 \pm 0,0004/0,0036 \pm 0,0004$  (arsénico),  $0,45 \pm 0,12/0,40 \pm 0,10$  (cobre),  $2,5 \pm 0,2/1,9 \pm 0,8$  (hierro),  $0,1962 \pm 0,005/0,1543 \pm 0,0117$  (iodo),  $0,0030 \pm 0,0007/0,0020 \pm 0,0002$  (plomo),  $0,0164 \pm 0,0017/0,0132 \pm 0,0016$  (selenio), y  $6,2 \pm 1,1/4,5 \pm 0,9$  (zinc) (calostro/madura, mg L<sup>-1</sup>). Los niveles de los oligoelementos fueron acordes a los reportados en la literatura para leche humana. Asimismo, los niveles de arsénico y plomo fueron acordes con los valores reportados a nivel internacional para madres no expuestas, garantizando la inocuidad del alimento frente a estos contaminantes. Estos datos son de gran relevancia pues constituyen los primeros reportes en leche de madres uruguayas. Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los niveles antes y después de la pasteurización, salvo para el selenio, observándose pérdidas del 10,8 % para el calostro.

Paralelamente, se evaluó la variación intradía e intrames en los niveles de los oligoelementos en estudio, la cual mostró cambios estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) en los niveles de cobre, hierro y zinc intradía, siendo la concentración de hierro un 44 % mayor en la mañana. Asimismo, se observaron descensos estadísticamente significativos en los niveles de todos los oligoelementos estudiados a lo largo de un mes. Adicionalmente, con el fin de evaluar la incidencia de la dieta materna, se compararon los niveles de oligoelementos entre un grupo de madres veganas y un grupo de madres omnívoras. Los resultados mostraron diferencias

significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos grupos para todos los oligoelementos estudiados, siendo estos menores en la leche de madres veganas. Sin embargo, el mismo estudio aplicado a las vitaminas, demostró que los niveles de éstas eran estadísticamente equivalentes entre ambos grupos. Finalmente, se estudiaron potenciales correlaciones entre oligoelementos y vitaminas, observándose algunas correlaciones estadísticamente significativas, destacándose la correlación negativa selenio/zinc y varias correlaciones positivas como cobre/selenio, hierro/ácido ascórbico, selenio/ $\alpha$ -tocoferol, retinol/ $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico/ácido fólico, entre otras.

En suma, los resultados de este trabajo de tesis aportaron información novedosa respecto a la composición de la leche humana de madres uruguayas, que no estaba disponible hasta el momento en nuestro país. Cabe destacar que en todos los casos los niveles de los nutrientes estudiados resultaron aptos para cubrir las necesidades de los lactantes según las guías internacionales. Asimismo, la información obtenida constituye una actualización sobre cómo la pasteurización Holder puede afectar la composición de la leche humana donada a los bancos, principalmente los niveles de ciertos nutrientes esenciales. Esto podría impulsar el desarrollo de otras tecnologías de tratamiento microbiológico, con el fin de obtener un mejor aprovechamiento de este alimento de altísimo valor nutricional para los lactantes.

## Abstract

Human milk provides various nutrients that support infant growth and protect them from several diseases. However, the loss of these nutrients can cause significant health problems. Furthermore, the chemical composition of human milk varies over time according to the infant's energy and nutritional requirements, with the volume of production varying between mothers. In this regard, human milk banks aim to support breastfeeding of newborns, whose mothers do not have enough milk for their adequate nutrition. However, this milk must be previously pasteurized to ensure the inactivation of microbial agents. The most commonly used protocol to treat donated human milk is Holder pasteurization, a process that consists of heating the sample to 62.5 °C for 30 min. This process can cause the loss of nutrients that are sensitive to heat and environmental conditions. In this context, within the framework of this thesis, the evaluation of the levels and potential losses of trace elements and vitamins in donated human milk (obtained from the Human Milk Bank of the Pereira Rossell Hospital Center) was proposed, due to the thermal pasteurization process, in a group of analytes of great implication in the nutrition and health of infants: arsenic, copper, iron, iodine, lead, selenium, zinc, retinol,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, folic acid, ascorbic acid and cobalamin. For this purpose, it was sought to develop analytical methods that were efficient for the quantitative extraction of the analytes, applying, as far as possible, multi-analyte procedures aligned with Green Analytical Chemistry.

In order to evaluate the levels and losses of vitamins after pasteurization, three extraction methods and the corresponding chromatographic conditions were optimized. For the simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene a saponification procedure was employed, whereas folic acid and ascorbic acid were extracted by simple solvent extractions, followed by analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detection. Concentrations in raw donated human milk samples were:  $1.5 \pm 0.2/0.38 \pm 0.08$  (retinol),  $12.8 \pm 2.5/2.9 \pm 0.7$  ( $\alpha$ -tocopherol),  $0.58 \pm 0.08/0.067 \pm 0.009$  ( $\beta$ -carotene),  $1.05 \pm 0.20/20.3 \pm 4.7$  (folic acid),  $55.4 \pm 4.1/36.1 \pm 5.9$  (ascorbic acid),  $0.0018 \pm 0.0004/0.00039 \pm 0.00008 \pm$  (cobalamin) (colostrum/mature, mg L<sup>-1</sup>). Statistically significant losses ( $p < 0.05$ ) were observed after pasteurization for all compounds studied, ranging from 6.4 to 14.2 %. Losses of fat-soluble vitamins were higher in colostrum, probably due to lower fat concentrations at this stage, while

the opposite trend was observed for water-soluble vitamins. Ascorbic acid was the most affected compound, with losses of 14.2 %. Concentrations of the analytes were higher in colostrum compared to mature milk, except for folic acid, as reported in the literature.

Regarding elemental determinations, a multi-element extraction method based on microwave-assisted extraction was optimized, followed by analysis using different atomic spectrometry techniques. In the case of iodine, open acid extraction was performed and subsequent analysis using the reference spectrophotometric method. Concentrations in raw donated human milk samples were:  $0.0042 \pm 0.0004/0.0036 \pm 0.0004$  (arsenic),  $0.45 \pm 0.12/0.40 \pm 0.10$  (copper),  $2.5 \pm 0.2/1.9 \pm 0.8$  (iron),  $0.1962 \pm 0.005/0.1543 \pm 0.0117$  (iodine),  $0.0030 \pm 0.0007/0.0020 \pm 0.0002$  (lead),  $0.0164 \pm 0.0017/0.0132 \pm 0.0016$  (selenium), and  $6.2 \pm 1.1/4.5 \pm 0.8$  (iron). 0.9 (zinc) (colostrum/mature, mg L<sup>-1</sup>). The levels of trace elements were in accordance with those reported in the literature for human milk. Likewise, the levels of arsenic and lead were in accordance with the values reported internationally for non-exposed mothers, guaranteeing the safety of the food against these contaminants. These data are of great relevance since they constitute the first reports on milk from Uruguayan mothers. Likewise, no statistically significant differences were found ( $p < 0.05$ ) between the levels before and after pasteurization, except for selenium, with losses of 10.8 % observed for colostrum.

In parallel, the intraday and intramonth variation in the levels of the trace elements under study was evaluated, which showed statistically significant changes ( $p < 0.05$ ) in the intraday levels of copper, iron and zinc, with the iron concentration being 44 % higher in the morning. Likewise, statistically significant decreases were observed in the levels of all trace elements studied over a month. Additionally, in order to evaluate the impact of maternal diet, trace element levels were compared between a group of vegan mothers and a group of omnivorous mothers. The results showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between both groups for all trace elements studied, with these being lower in the milk of vegan mothers. However, the same study applied to vitamins showed that the levels of these compounds were statistically equivalent between both groups. Finally, potential correlations between trace elements and vitamins were studied, observing some statistically significant correlations, highlighting the negative correlation selenium/zinc and several positive correlations such as copper/selenium, iron/ascorbic acid,

selenium/ $\alpha$ -tocopherol, retinol/ $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid/folic acid, among others. In summary, the results of this thesis provided new information regarding the composition of human milk from Uruguayan mothers, which was not available in our country until now. It should be noted that in all cases the levels of the nutrients studied were suitable to cover the needs of infants according to international guidelines. Likewise, the information obtained constitutes an update on how Holder pasteurization can affect the composition of human milk donated to banks, mainly the levels of certain essential nutrients. This could encourage the development of other microbiological treatment technologies, in order to obtain a better use of this food of high nutritional value for infants.

## Índice

|        |                                                                         |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1      | INTRODUCCIÓN.....                                                       | 17 |
| 1.1    | La leche materna humana .....                                           | 17 |
| 1.2    | Anatomía de la mama y secreción de la leche humana .....                | 18 |
| 1.3    | Nutrientes de la leche humana materna .....                             | 20 |
| 1.4    | Elementos potencialmente tóxicos en la leche humana .....               | 26 |
| 1.5    | Dinamismo de la leche humana.....                                       | 27 |
| 1.6    | Los bancos de leche humana .....                                        | 29 |
| 1.7    | La pasteurización de la leche humana y las pérdidas de nutrientes ..... | 32 |
| 1.8    | Rol de la Química Bioanalítica.....                                     | 34 |
| 1.8.1  | Métodos de análisis .....                                               | 35 |
| 1.8.2  | Desarrollo y validación de métodos de análisis .....                    | 46 |
| 1.9    | Química Analítica Verde.....                                            | 48 |
| 1.10   | Hipótesis y justificación.....                                          | 49 |
| 1.11   | Objetivos .....                                                         | 51 |
| 1.11.1 | Objetivos generales.....                                                | 51 |
| 1.11.2 | Objetivos específicos.....                                              | 51 |
| 2      | MATERIALES Y MÉTODOS .....                                              | 53 |
| 2.1    | Reactivos y materiales .....                                            | 53 |
| 2.2    | Equipos.....                                                            | 54 |
| 2.3    | Criterios de selección de las donantes por parte del BLH-CHPR .....     | 55 |
| 2.4    | Muestreo.....                                                           | 55 |
| 2.5    | Métodos analíticos.....                                                 | 57 |
| 2.5.1  | Determinación de macronutrientes.....                                   | 57 |
| 2.5.2  | Determinación de metales, semimetales y no metales.....                 | 57 |
| 2.5.3  | Determinación de vitaminas .....                                        | 61 |

|       |                                                                                         |     |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.5.4 | Análisis estadístico .....                                                              | 64  |
| 3     | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                            | 66  |
| 3.1   | Determinación de macronutrientes .....                                                  | 66  |
| 3.2   | Determinación de metales, semimetales y no metales.....                                 | 67  |
| 3.2.1 | Optimización y validación de los métodos analíticos para elementos esenciales.....      | 67  |
| 3.2.2 | Optimización y validación de los métodos analíticos para elementos tóxicos.....         | 69  |
| 3.2.3 | Determinaciones de elementos esenciales en leche humana donada.....                     | 71  |
| 3.2.4 | Evaluación de las pérdidas de oligoelementos luego de la pasteurización .....           | 75  |
| 3.2.5 | Determinaciones de elementos tóxicos en leche humana donada.....                        | 77  |
| 3.2.6 | Desarrollo y evaluación del método multielemento .....                                  | 79  |
| 3.2.7 | Comparación contra método multielemento mediante MP-AES.....                            | 84  |
| 3.2.8 | Monitoreo elemental en muestras de madres pertenecientes a distintas dietas.....        | 86  |
| 3.3   | Determinación de vitaminas .....                                                        | 92  |
| 3.3.1 | Optimización de los procedimientos de extracción.....                                   | 92  |
| 3.3.2 | Optimización de las condiciones cromatográficas.....                                    | 95  |
| 3.3.3 | Validación de los métodos analíticos.....                                               | 98  |
| 3.3.4 | Determinaciones de vitaminas en muestras de leche humana donada.....                    | 102 |
| 3.3.5 | Evaluación de las pérdidas de vitaminas luego de la pasteurización .....                | 105 |
| 3.3.6 | Monitoreo vitamínico en muestras de madres pertenecientes a distintas dietas            | 108 |
| 3.4   | Interacciones entre oligoelementos y vitaminas.....                                     | 109 |
| 3.5   | Consideraciones finales sobre la pasteurización Holder y potenciales alternativas ..... | 112 |
| 4     | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....                                                        | 117 |
| 4.1   | Conclusiones .....                                                                      | 117 |
| 4.2   | Perspectivas .....                                                                      | 119 |
| 5     | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                        | 122 |
| 6     | ANEXO .....                                                                             | 143 |

## Lista de Tablas

|                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1. Composición gruesa de la leche humana y comparación con la leche de vaca. ....                                                                       | 20  |
| Tabla 2. Parámetros instrumentales para la determinación de elementos por MP-AES. ....                                                                        | 61  |
| Tabla 3. Condiciones experimentales utilizadas para cada diseño factorial 2 <sup>2</sup> . ....                                                               | 64  |
| Tabla 4. Resultados de macronutrientes en las muestras analizadas. ....                                                                                       | 66  |
| Tabla 5. Parámetros de desempeño obtenidos para los elementos esenciales. ....                                                                                | 68  |
| Tabla 6. Parámetros de desempeño obtenidos para los elementos tóxicos. ....                                                                                   | 71  |
| Tabla 7. Concentraciones obtenidas para los analitos en las muestras crudas (C) y pasteurizadas (P). ....                                                     | 71  |
| Tabla 8. Concentraciones obtenidas para los elementos tóxicos en las muestras crudas (C) y pasteurizadas (P). ....                                            | 77  |
| Tabla 9. Efecto de la velocidad de la bomba sobre la sensibilidad analítica. ....                                                                             | 82  |
| Tabla 10. Cifra de mérito obtenidas luego de la validación del método mediante MP-AES. ....                                                                   | 83  |
| Tabla 11. Comparación estadística contra método basado en MP-AES. ....                                                                                        | 84  |
| Tabla 12. Comparación de los límites de detección de varios métodos espectrométricos para la determinación de los elementos estudiados. ....                  | 85  |
| Tabla 13. Niveles de oligoelementos en las muestras de leche humana madura de madres con marcados hábitos alimenticios. ....                                  | 86  |
| Tabla 14. Variación intrames en los niveles de oligoelementos en muestras de leche humana madura de una madre omnívora. ....                                  | 90  |
| Tabla 15. Variación intradía en los niveles de oligoelementos en muestras de leche humana madura de una madre omnívora. ....                                  | 90  |
| Tabla 16. Resultados obtenidos luego del diseño factorial 2 <sup>2</sup> utilizando el SRM. ....                                                              | 92  |
| Tabla 17. Principales cifras de mérito obtenidas para cada analito luego de la validación. ....                                                               | 99  |
| Tabla 18. Comparación de los límites de detección de varios métodos de HPLC para la determinación de los compuestos estudiados. ....                          | 101 |
| Tabla 19. Concentraciones de retinol, $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -caroteno, ácido fólico y ácido ascórbico en las muestras de leche donada analizadas. .... | 102 |
| Tabla 20. Niveles de vitaminas en las muestras de leche humana madura de madres con marcados hábitos alimenticios. ....                                       | 108 |
| Tabla 21. Coeficientes de correlación de Pearson (r) para oligoelementos y vitaminas. ....                                                                    | 110 |

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Ciclo de lactación. Extraído de: Paintal, 2011. ....                                                                                                                                                           | 18  |
| Figura 2. Anatomía de la mama humana. Extraído de: Stanford Medicine Children’s Health, 2024. ....                                                                                                                       | 20  |
| Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos analizados en esta tesis. ....                                                                                                                                          | 23  |
| Figura 4. Imágenes de los tres estadios de la leche humana materna. Extraído de: AEP, 2023. ....                                                                                                                         | 29  |
| Figura 5. Logo del Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell. ....                                                                                                                                   | 31  |
| Figura 6. Procedimiento para el procesamiento de la leche materna en bancos. Extraído de: HMBANA, 2024. ....                                                                                                             | 33  |
| Figura 7. Espectrómetro de absorción atómica de llama típico de simple haz. Extraído de: Skoog <i>et al.</i> , 2008. ....                                                                                                | 38  |
| Figura 8. Mechero de flujo laminar. Extraído de: Skoog <i>et al.</i> , 2008. ....                                                                                                                                        | 39  |
| Figura 9. Corte transversal del sistema ETAAS. Extraído de: Harvey, 2024. ....                                                                                                                                           | 40  |
| Figura 10. Esquema de un equipo de espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas. Extraído de: Yoshida <i>et al.</i> , 2012. ....                                                                 | 42  |
| Figura 11. Esquema de cámara trabajando en modo hidruro utilizando la bomba peristáltica de tres canales. Extraído de: Lorençatto <i>et al.</i> , 2020. ....                                                             | 43  |
| Figura 12. Esquema de un equipo típico de HPLC. Extraído de: Skoog <i>et al.</i> , 2008. ....                                                                                                                            | 45  |
| Figura 13. Línea analítica del cobre y potenciales interferencias espectrales. Extraído de: Software MP Expert. ....                                                                                                     | 81  |
| Figura 14. Conversión del éster de retinilo en retinol durante la saponificación. ....                                                                                                                                   | 94  |
| Figura 15. Cromatogramas superpuestos para una solución estándar de 1 mg L <sup>-1</sup> de retinol, $\alpha$ -tocoferol y 10 mg L <sup>-1</sup> de $\beta$ -caroteno, y una extracción de muestra de leche humana. .... | 96  |
| Figura 16. Cromatogramas superpuestos para una solución estándar de ácido fólico de 10 mg L <sup>-1</sup> y una extracción de muestra de leche humana. ....                                                              | 97  |
| Figura 17. Cromatogramas superpuestos para una solución estándar de ácido ascórbico de 10 mg L <sup>-1</sup> y una extracción de muestra de leche humana. ....                                                           | 98  |
| Figura 18. Curvas tiempo temperatura para método Holder (a) y método Holder modificado (b). Extraído de: Capriati <i>et al.</i> 2019. ....                                                                               | 113 |

## Lista de Abreviaturas

**As:** Arsénico.

**ASSE:** Administración de los Servicios de Salud del Estado.

**BLH-CHPR:** Banco de leche humana del centro hospitalario Pereira Rossell.

**Cu:** Cobre.

**DAD:** Detector de arreglo de diodos.

**ESPGHAN:** Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica.

**ETAAS:** Espectrometría de absorción atómica electrotérmica.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

**Fe:** Hierro.

**HG-AAS:** Generación de hidruros acoplada a espectrometría de absorción atómica.

**HG-MP-AES:** Generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica por plasma inducido por microondas.

**HPLC:** Cromatografía de líquidos de alta presión.

**I:** Yodo.

**IARC:** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.

**MAS:** Espectrofotometría de absorción molecular.

**MP-AES:** Espectrometría de emisión atómica por plasma inducido por microondas.

**NIH:** Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**Pb:** Plomo.

**Se:** Selenio.

**UNICEF:** Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia.

**Zn:** Zinc.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 La leche materna humana

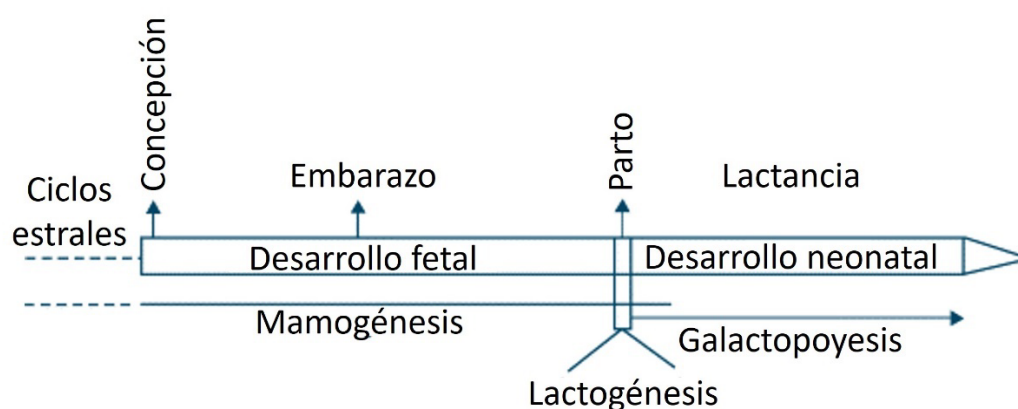
La leche humana es desde el punto de vista nutricional el alimento más valioso que puede ofrecerse a los recién nacidos. Por este motivo, la lactancia materna ha sido y continúa siendo hoy en día altamente promocionada a nivel nacional e internacional por diversas organizaciones: Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2018), Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), Convención sobre los Derechos del Niño (ONU, 1990), Declaración de Innocenti (OMS/UNICEF, 1990), Iniciativa Hospital Amigo del Niño (OMS/UNICEF, 1991). La OMS, declara que la lactancia materna es un hábito ligado íntimamente a la supervivencia de la especie humana desde tiempos inmemoriales, y que como mamífero que es, la cría humana necesita de la leche de su madre para su supervivencia (Borre *et al.*, 2014).

La alimentación exclusiva con leche humana desde el nacimiento hasta los seis meses de vida y posteriormente acompañada por alimentos complementarios hasta aproximadamente los dos años, es considerada la alimentación más simple y adecuada que puede recibir un niño, ya que cuenta con todos los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo. Asimismo, la leche materna se ha recomendado como la principal fuente de alimento para el lactante durante al menos los primeros seis meses de vida, por su calidad y economía. Su elección se basa en el aporte de nutrientes esenciales al lactante, así como al suministro de diversos compuestos de acción beneficiosa que mejoran su crecimiento y le protegen frente a enfermedades propias de la etapa neonatal y posterior (Martínez-Rojano, 2017). La leche materna es un alimento altamente complejo, y aun cuando fuese factible imitar artificial o biotecnológicamente todos sus componentes, no se podría lograr que la interacción entre ellos fuese igual que la natural, de modo que tampoco se podrían conseguir los mismos efectos sobre el organismo (Macías *et al.*, 2006). Previene al lactante de posibles enfermedades como diarrea e infecciones respiratorias, y también ayuda a prevenir otras que pueden aparecer a largo plazo, tales como ciertos tipos de cáncer, asma, trastornos gastrointestinales, obesidad y diabetes infantil. De acuerdo con González (2006), también puede prevenir al lactante de padecer leucemia, meningitis y muerte súbita. En particular, en el caso de los bebés prematuros, se han

encontrado muchos beneficios relacionados con el consumo de leche humana que ayudan a reducir significativamente el riesgo de padecer trastornos digestivos, enterocolitis necrosante, sepsis de inicio tardío, displasia broncopulmonar y retinopatía del prematuro (Picaud, 2017).

## 1.2 Anatomía de la mama y secreción de la leche humana

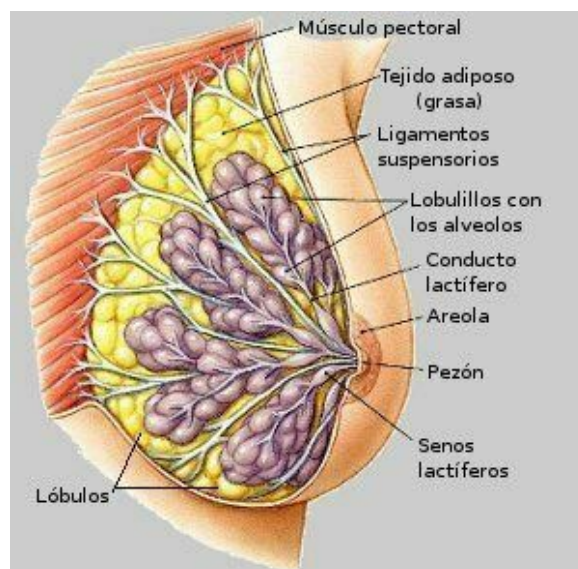
El ciclo de lactancia conlleva el crecimiento de la mama (mamogénesis), el inicio de la síntesis y secreción de leche (lactogénesis 1 y lactogénesis 2), el establecimiento de la lactancia (galactopoyesis) y la regresión de la mama durante y después del destete (involución) (Paintal, 2011). La Figura 1 presenta diferentes etapas en el ciclo de lactancia.



**Figura 1. Ciclo de lactación. Extraído de: Paintal, 2011.**

La mamogénesis es la etapa en la que la glándula mamaria desarrolla su capacidad histológica y bioquímica para sintetizar leche. Esta etapa se caracteriza por un aumento en el número y tamaño de los alvéolos, donde se secreta y almacena la leche (Paintal, 2011). Por otra parte, la lactogénesis es la etapa en la que el cuerpo produce leche para el bebé. En los seres humanos, la lactogénesis comienza unas cuarenta horas antes del nacimiento del bebé y se completa en gran medida en cinco días. Durante esta etapa, se produce una serie rápida y profunda de cambios en la actividad de las células epiteliales mamarias diferenciadas desde un estado quiescente a un estado secretor completamente activo. La lactogénesis consta de dos etapas consecutivas. La lactogénesis 1 ocurre a mediados del embarazo, cuando la glándula mamaria se vuelve competente para secretar leche. La secreción de leche, sin embargo, está controlada por los altos niveles circulantes de progesterona y estrógeno (Norman & Henry, 2015). La lactogénesis 2 ocurre alrededor del momento del parto y se define como el inicio de una secreción abundante de leche. Los cambios hormonales durante el parto y la posterior

eliminación de la placenta actúan como un desencadenante lactogénico necesario para el inicio de la secreción de leche. Para la síntesis y secreción continua de la leche humana, las señales hormonales recibidas por la glándula mamaria (debido a la estimulación del pezón y la areola) y transmitidas al sistema nervioso central son esenciales para inducir la secreción de leche. En la Figura 2 se muestra la anatomía de la mama humana, la cual está compuesta por tejido glandular, graso y conectivo. Las glándulas mamarias están formadas por lóbulos y conductos lactíferos, que producen y transportan la leche hacia el pezón durante la lactancia. El tejido adiposo rodea las glándulas y le da forma y tamaño a la mama, mientras que el tejido conectivo proporciona soporte estructural. La leche se secreta de forma continua en los alvéolos y se almacena hasta que el reflejo de bajada induce la eyección de la leche, donde sale a través de conductos hacia pequeños senos cerca de la areola y luego se abre directamente en el pezón (Paintal, 2011). Por lo tanto, la colocación de la boca del bebé durante la lactancia es importante para que estos senos lactíferos no se bloqueen y aseguren la libre secreción de leche. Por lo tanto, la anatomía de la lactancia se compone de los alvéolos (pequeñas estructuras en forma de saco donde se produce la leche), células mioepiteliales (rodean los alvéolos y se contraen bajo la influencia de la oxitocina para expulsar la leche), conductos lactíferos (canales que transportan la leche desde los alvéolos hasta el pezón), pezón y areola (facilitan la succión y la transferencia de leche al bebé.) Las sensaciones táctiles (creadas por la succión del bebé) crean impulsos que ascienden por la médula espinal, creando una vía neuronal entre el hipotálamo y la glándula pituitaria que libera oxitocina, lo que resulta en la expulsión de la leche almacenada de los alvéolos hacia los senos lactíferos a través del poro del pezón. Una vez que ha comenzado la secreción de leche, la succión por parte del recién nacido influye en el funcionamiento posterior de la mama, que está controlado conjuntamente por los sistemas nervioso/endocrino mediante la liberación de hormonas apropiadas, así como la transferencia de impulsos nerviosos (Paintal, 2011).



**Figura 2. Anatomía de la mama humana. Extraído de: Stanford Medicine Children’s Health, 2024.**

### **1.3 Nutrientes de la leche humana materna**

La leche humana se compone principalmente de agua, grasas, proteínas, lactosa y cenizas. El agua es un componente importante y constituye alrededor del 87 % del total. La grasa representa aproximadamente el 3,8 % y proporciona el 50 % de la energía bruta de la leche. El contenido de proteínas es de aproximadamente 1,0 %, proviniendo aproximadamente el 70 % de las proteínas del suero. Asimismo, contiene un 7 % de lactosa, el nivel más alto de contenido de lactosa en la leche de mamíferos, proporcionando aproximadamente el 40 % de la energía total del alimento. Por otra parte, el contenido de cenizas en la leche humana es 0,2 %, siendo este relativamente bajo en comparación con los valores de 0,7 % encontrados en la leche bovina (Guo, 2014). Los componentes principales se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Componentes principales de la leche humana.**

| <b>Componentes principales (%)</b> | <b>Leche humana</b> |
|------------------------------------|---------------------|
| Proteína                           | 1,0                 |
| Caseínas                           | 0,3                 |
| Proteínas de suero                 | 0,7                 |
| Grasa                              | 3,8                 |
| Lactosa                            | 7,0                 |
| Sólidos totales                    | 12,4                |
| Cenizas                            | 0,2                 |

Las vitaminas presentes en la leche humana cubren todas las necesidades del lactante, pero su cantidad es variable, hecho que depende del estado nutricional materno y del aporte de vitaminas que pueda haber recibido la madre durante el embarazo. Es decir, que existe una estrecha relación entre la alimentación y los depósitos de la madre, con la concentración de vitaminas en su leche (Martínez-Rojano, 2017). A su vez, las vitaminas varían ampliamente en estructura química, actividad biológica y propiedades fisicoquímicas. Debido a esta gran heterogeneidad, suelen clasificarse en base a sus características de solubilidad, en vitaminas liposolubles (A, D, E, K) y vitaminas hidrosolubles (B y C) (Ball, 2006).

La vitamina A y sus derivados son importantes en muchas funciones del organismo, incluidos el desarrollo y mantenimiento de la diferenciación normal de las células epiteliales, la respuesta inmunitaria, la hematopoyesis, el crecimiento y desarrollo osteomuscular, la fertilidad y la función normal de los fotorreceptores retinales. En la leche humana, la vitamina A se presenta en varias formas, principalmente como retinol, ésteres de retinilo, ácido retinoico y carotenoides. El  $\beta$ -caroteno, que representa el 25 % del total de carotenoides, es conocido como precursor de la síntesis de vitamina A, por lo cual también se le conoce como provitamina A. Asimismo, se sabe que el  $\beta$ -caroteno posee propiedades inmunoprotectoras y antioxidantes (Qiao *et al.*, 2022). Tanto las madres en período de lactancia, como los lactantes, son considerados grupos de riesgo para la deficiencia de vitamina A, especialmente en países en vías de desarrollo, donde esto representa un problema de salud pública. Además, si el nivel de vitamina A en las madres es bajo, los niños son susceptibles de sufrir deficiencia subclínica a los 6 meses de vida, aun en los casos de lactantes alimentados con leche materna. En el caso particular de la vitamina A, varios factores modulan su secreción en la leche humana, como la edad materna, el número de partos, la duración del embarazo, la ingesta de alimentos y el estado nutricional de la madre. Dado que la vitamina A se encuentra en la fracción lipídica de la leche como éster de retinilo, otro factor que influye en su concentración es el contenido de grasa, que varía con el grado de llenado y con el momento del día en el que se vacía el pecho (Matamoros *et al.*, 2014).

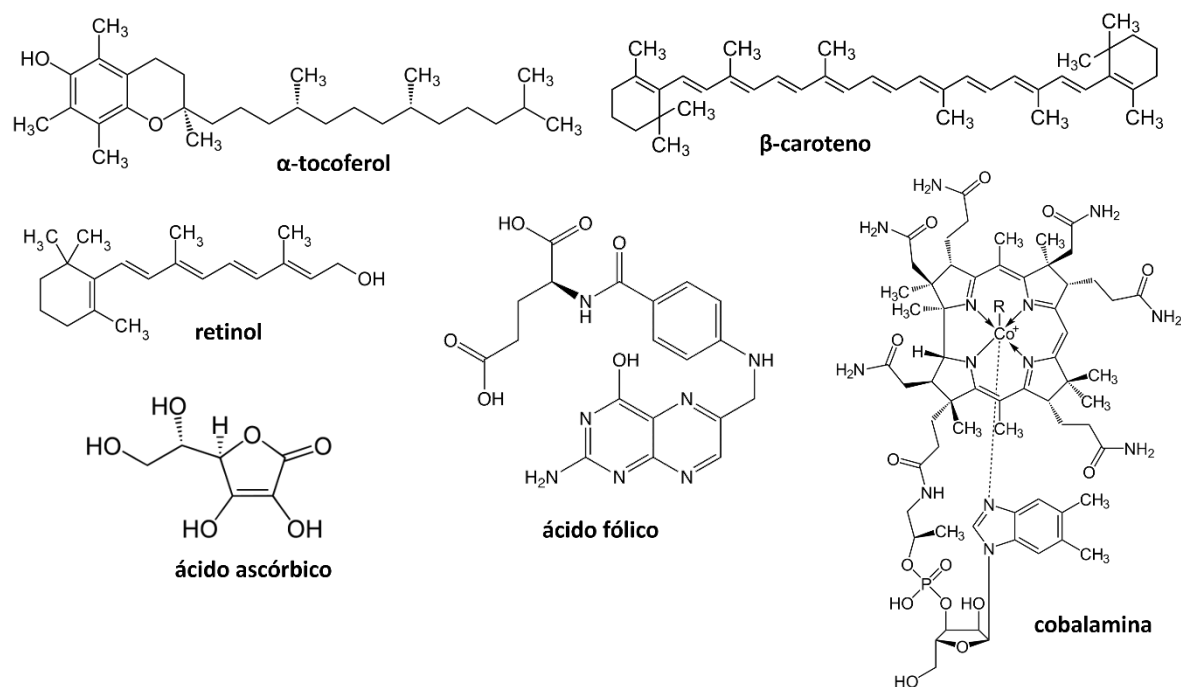
La vitamina E tiene ocho formas biológicamente activas: cuatro tocoferoles (cadena lateral de isoprenoide saturada) y cuatro tocotrienoles (cadena lateral de isoprenoide insaturada), distribuidos como  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - según el número y la posición de grupos metilo en el anillo cromanol. De estos, el  $\alpha$ -tocoferol es el compuesto más importante y biológicamente

activo (Gentili & Caretti, 2013). La vitamina E es un antioxidante natural que protege contra la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares. El transporte de vitamina E a través de la placenta es limitado y, por lo tanto, los tejidos neonatales poseen bajos niveles. La deficiencia de vitamina E en recién nacidos puede provocar anemia hemolítica. El contenido de vitamina E de la leche humana es adecuado para un bebé a término, sin embargo, puede no ser suficiente para los bebés prematuros que tienen niveles más bajos de esta vitamina al nacer (Guo, 2014). El contenido de vitamina E de la leche humana depende de muchos factores, incluyendo la variación individual y la etapa de lactancia. En poblaciones con niveles bajos de vitamina E, se ha observado un contenido adecuado en la leche humana, lo cual sugiere que las reservas maternas pueden movilizarse durante la lactancia para asegurar un suministro adecuado en la leche (Guo, 2014).

El complejo de vitaminas B ha sido muy estudiado, ya que desempeña un papel muy importante para el mantenimiento de una buena salud y prevención de diversas enfermedades. La vitamina B<sub>9</sub> (ácido fólico), así como también otras vitaminas que están relacionadas metabólicamente con ésta, como las vitaminas B<sub>6</sub> (piridoxina) y B<sub>12</sub> (cobalamina), se han vinculado a la protección contra ciertos tipos de cáncer y a las reducciones en la concentración de homocisteína en sangre (Steluti *et al.*, 2011). La deficiencia y agotamiento de vitamina B<sub>12</sub> prevalece cuando la ingesta de alimentos de origen animal es baja, porque estos alimentos contienen casi toda la vitamina B<sub>12</sub> necesaria para el ser humano, excepto para el caso de alimentos enriquecidos. Claramente, el riesgo de deficiencia no se limita estrictamente a dietas vegetarianas, pero la ingesta por parte de madres lacto-ovo vegetarianas es sustancialmente más baja que la de las madres omnívoras. Se cree que el período neonatal es un período de especial vulnerabilidad a la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>. El estado materno antes y durante el embarazo está fuertemente asociado con las concentraciones de vitamina B<sub>12</sub> y homocisteína total en sangre de cordón umbilical (Allen, 2012). La grave deficiencia materna, causada por el vegetarianismo o anemia perniciosa no diagnosticada, resulta en síntomas clínicos de deficiencia a los pocos meses de dar a luz al bebé. Se sabe que los síntomas en los niños aparecen alrededor del cuarto mes de vida, e incluyen retraso severo en el crecimiento (longitud, peso y circunferencia de la cabeza), atrofia cerebral y en una gran cantidad de músculos, y otros problemas de desarrollo, algunos de los cuales no son revertidos por tratamiento en muchos de los casos. Estas deficiencias fueron encontradas en niños

amamantados exclusivamente con leche materna, lo que sugiere que la baja concentración de vitamina B<sub>12</sub> de la leche materna fue un factor contribuyente (Picciano, 2001).

La Vitamina C se presenta en la naturaleza como vitámeros, los dos principales son el ácido L-ascórbico y el ácido L-deshidroascórbico, siendo el primero la forma más común y biológicamente activa de la vitamina C (Gentili & Caretti, 2013). Las principales funciones del ácido ascórbico se relacionan con su poder antioxidante y reductor, su participación como cofactor en reacciones enzimáticas que intervienen en la síntesis de colágeno y el desarrollo normal de cartílagos y huesos, así como su rol en el metabolismo de las proteínas. Además, estimula la absorción de hierro y actúa en el metabolismo de los depósitos de este elemento. La leche humana normalmente es rica en vitamina C y su concentración media es mayor que la de vaca (Guo, 2014).



**Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos analizados en esta tesis.**

Los oligoelementos actúan como elementos estructurales del esqueleto y otros órganos, transportadores de sustancias en el organismo, activadores o facilitadores de reacciones metabólicas, elementos constituyentes de moléculas con funciones esenciales y cofactores en sistemas enzimáticos (Hernan *et al.*, 1997). La determinación del contenido de diferentes oligoelementos en órganos, tejidos y fluidos biológicos como la leche materna,

permite disponer de indicadores bioquímicos para la evaluación del estado nutricional tanto en individuos normales y en varios estados patológicos (Treche *et al*, 1996). En particular son de gran interés los elementos cobre, hierro y zinc, entre otros, debido a los procesos metabólicos cruciales en los que participan (Mahan *et al.*, 1998).

La concentración de oligoelementos está adaptada a los requerimientos nutricionales y a la capacidad metabólica del lactante. En comparación con las fórmulas infantiles, la leche materna presenta alta biodisponibilidad de oligoelementos, en especial de cobre, hierro y zinc. Los oligoelementos se encuentran presentes principalmente ligados a las proteínas del suero, al citrato o a la membrana proteica del glóbulo de grasa, a diferencia de la leche bovina, donde la caseína presenta la mayor proporción de oligoelementos. Estas particularidades serían las principales causas de la mejor absorción de estos nutrientes.

El cobre es necesario para la utilización del hierro debido a que juega un papel clave en varios procesos metabólicos relacionados con el transporte y el almacenamiento de este elemento. La proteína ceruloplasmina, dependiente de cobre, es crítica para la movilización de hierro desde los depósitos de almacenamiento en el hígado y otros tejidos hacia el torrente sanguíneo. Asimismo, el cobre facilita la absorción intestinal de hierro, influyendo en la actividad de proteínas transportadoras que regulan su paso desde el intestino (Guo, 2014). También es un cofactor de las enzimas implicadas en el metabolismo de glucosa, así como en la síntesis de hemoglobina, fosfolípidos y tejido conectivo. La deficiencia de cobre es rara excepto en condiciones de desnutrición severa. La leche materna madura contiene una concentración media de cobre de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ , no existiendo una correlación significativa con la ingesta dietética de cobre de la madre. Este elemento se encuentra unido a la albúmina sérica y al citrato. También se ha encontrado en la membrana del glóbulo graso, aunque aún no se ha identificado el ligando exacto (Guo, 2014).

El hierro es un nutriente esencial para el óptimo desarrollo mental, motor y conductual, que se encuentra presente en todas las células corporales y resulta fundamental para procesos fisiológicos como la producción de hemoglobina y la función enzimática (Puente Perpiñán *et al.*, 2014). Generalmente, la deficiencia ferropénica se produce cuando el hierro ingerido a través de la dieta no basta para cubrir las necesidades orgánicas de este nutriente y, en consecuencia, se carece de reservas en los depósitos corporales. Debido a que las demandas de este elemento se incrementan durante los períodos de rápido crecimiento o frecuentes pérdidas de sangre

(por ejemplo, durante la menstruación o el sangrado intestinal), tanto los lactantes, como los niños, las embarazadas y las mujeres en edad reproductiva, presentan un alto riesgo de padecer déficit (Puente Perpiñán *et al.*, 2014). Algunos autores atribuyen la extraordinaria biodisponibilidad del hierro en la leche materna a la elevada cantidad de lactoferrina presente en ella. Otros mencionan una conjunción de factores, como la baja concentración de proteínas, calcio y fósforo (potenciales inhibidores de la absorción) y las elevadas concentraciones de lactosa y ascorbatos (potenciadores) (Macias *et al.*, 2006).

El zinc es un oligoelemento de gran importancia para el desarrollo humano tanto prenatal como postnatal. Sus funciones más reconocidas en relación con el crecimiento y el desarrollo se relacionan con la síntesis de ARN y ADN, críticos para el crecimiento celular, la diferenciación y el metabolismo (Castillo-Durán *et al.*, 2001). La deficiencia de este elemento puede producir disminución en el tamaño del timo y del bazo. A su vez es muy importante en el desarrollo cognoscitivo y para el funcionamiento del sistema nervioso central. Se sabe que posee acciones bioquímicas catalíticas y reguladoras en más de 200 enzimas y está contenido en muchas metaloenzimas que son las que participan en la mayoría de las vías metabólicas en la producción de proteínas, carbohidratos y grasas, es decir, que se encuentra involucrado prácticamente en todas las funciones del organismo. Los pacientes que están en riesgo de presentar deficiencias de zinc son los recién nacidos con bajo peso, bien sean prematuros, desnutridos in útero o hijos de madres desnutridas, en los cuales sus depósitos están reducidos (Rivera Echeverry, 2012).

El yodo es un elemento esencial para la producción de hormonas tiroideas, triyodotironina (T3) y tiroxina (T4). Estas hormonas tienen un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo temprano de la mayoría de los órganos, en particular del cerebro durante las etapas embrionaria, fetal y postnatal (Zoeller & Rovet, 2004). La deficiencia de yodo ocasiona una serie de trastornos, entre los que destacan bocio endémico, hipotiroidismo, cretinismo y anomalías congénitas. Una adecuada ingesta de este elemento es particularmente importante para los niños que reciben lactancia materna exclusiva, ya que en ellos la leche materna es su única fuente. La carencia de yodo durante el embarazo y el postparto conduce a déficits neurológicos en los niños, y es la principal causa de retardo mental prevenible en el mundo. Los requerimientos maternos de yodo durante el periodo de lactancia se incrementan

para lograr un adecuado aporte tanto a la madre, como al niño lactante en desarrollo a través de la leche materna (Caballero, 2017).

El selenio es un componente importante de la enzima glutatión peroxidasa, que trabaja con la vitamina E, la enzima catalasa y la enzima superóxido dismutasa como antioxidante, protegiendo las células contra el daño oxidativo (Guo, 2014). La leche materna es la única fuente de este elemento para los lactantes. Este es un elemento esencial para el correcto funcionamiento de una serie de mecanismos de defensa, por lo cual es muy importante que los infantes cuenten con los niveles necesarios para mantener su salud. La concentración de selenio en la leche humana varía de 2 a 50 ng mL<sup>-1</sup> dependiendo de variaciones geográficas y diferencias en la ingesta dietética, así como también de la etapa de lactancia (Mazej *et al.*, 2004).

Cabe destacar que los elementos esenciales yodo y selenio se encuentran entre los que son dependientes de la dieta materna, mientras que elementos como cobre, hierro y zinc no se verían afectados por ésta. Sin embargo, se ha observado que las concentraciones lácteas de cobre, hierro y zinc podrían variar según el área geográfica (Macias *et al.*, 2006).

## **1.4 Elementos potencialmente tóxicos en la leche humana**

La leche materna no sólo proporciona diversos compuestos con función nutricional y bioactiva, también puede transmitir xenobióticos que se acumularon en el tejido de la mama materna como plomo y arsénico (Hennet y Borsig, 2016).

El plomo es un elemento muy tóxico para el ser humano. Estudios realizados en poblaciones infantiles han demostrado que produce daño aún a bajas concentraciones en sangre debido a ciertas condiciones especiales, como ser menor masa corporal, sistema nervioso en desarrollo, mayor tasa de absorción intestinal y menor tasa de eliminación. El Pb cruza la barrera placentaria y se acumula en los tejidos fetales durante la gestación (Mc Michael *et al.*, 1986). El sistema nervioso es el principal tejido dañado, incluso a concentraciones bajas, encontrando los mayores niveles de plomo principalmente en la sustancia gris y los núcleos basales. La neurotoxicidad que produce la intoxicación plúmbica crónica conlleva a severos trastornos de las funciones cognitivas, que se expresan en problemas de aprendizaje y conducta, y problemas neurológicos como cefalea, disminución de la agudeza visual, alteraciones del lenguaje y retraso

mental (Goodman *et al.*, 1998). El plomo se absorbe principalmente en el intestino, viéndose incrementada su absorción en presencia de hierro y zinc. Existen pocos estudios que traten los factores dietéticos que regulan el metabolismo de este elemento, aunque se sabe que el calcio influye sobre la retención y absorción de plomo en los huesos. La incorporación de plomo por parte de la madre depende no solamente del metal y de su forma química, sino también de los factores ambientales relacionados con el alimento y la nutrición. La contaminación industrial y urbana aumentan los niveles ambientales de plomo, afectando en última instancia la concentración del elemento en leche humana.

El arsénico es un elemento potencialmente tóxico para el ser humano, que puede llevar a un desarrollo deficiente del lactante, provocando problemas cardíacos, diabetes, alteraciones de la piel y daños en el sistema nervioso (Gürbay *et al.*, 2012). Asimismo, ha sido declarado carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS, clasificado como Grupo 1 (IARC, 2022). Los lactantes son especialmente vulnerables a los efectos tóxicos del arsénico debido a su rápido desarrollo y mayor absorción relativa de nutrientes y contaminantes. La concentración de arsénico en la leche materna puede depender de varios factores como ser la exposición materna (agua, alimentos, aire), el tipo de dieta materna y la zona geográfica. En este sentido, su monitoreo es primordial para garantizar la inocuidad de la leche materna como alimento.

## **1.5 Dinamismo de la leche humana**

La leche materna es un fluido complejo y altamente dinámico. Su composición varía de una madre a otra, en el transcurso del día para una misma madre, e incluso durante una misma lactada, siendo la fracción más estable la fracción proteica y la de mayor variabilidad la fracción de grasa. La composición de la leche humana se ve afectada por varios factores, incluyendo la etapa de lactancia (que tiene el mayor efecto sobre las clases individuales de componentes), la nutrición materna, el medio ambiente, las condiciones de vida y el estado individual de la madre (Zhang, 2014). Existen evidencias de que la ingesta de la madre influye en la concentración de vitaminas en su leche. Los niveles de oligoelementos esenciales en la leche también pueden verse afectados por la ingesta y el estado de oligoelementos maternos, aunque otros factores juegan un papel, incluyendo la edad materna, paridad, área de residencia, ingreso familiar,

duración de la gestación y peso corporal del bebé. Sin embargo, existen controversias sobre el impacto de estos factores (Leotsinidis *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la composición de la leche presenta una gran variabilidad interindividual y evoluciona a lo largo de la lactancia, adaptándose al crecimiento del niño y su fisiología. Por este motivo, la leche se clasifica en: i) calostro (primera semana postparto), ii) leche de transición (segunda semana postparto), y iii) leche madura (posterior a la segunda semana postparto, hasta el final de la lactancia) (Guo, 2014). Esta clasificación se basa en los cambios en la producción de leche y el contenido de macronutrientes presentes en ella. En este sentido, el volumen de leche producida es bajo durante el calostro, pero aumenta rápidamente en la etapa de transición para adaptarse a las necesidades del lactante (Guo, 2014).

El calostro se caracteriza por tener color amarillento debido a la alta presencia de  $\beta$ -carotenos, es de consistencia pegajosa, es espeso debido a su alta densidad y posee un pH promedio de 7,45 el cual favorece el vaciamiento gástrico (Guo, 2014). Asimismo, posee mayor cantidad de proteínas (97 % en forma de inmunoglobulina A-IgA-), vitaminas liposolubles, lactoferrina, factor de crecimiento, lactobacilos *bifidus*, sodio y zinc. En menores concentraciones se encuentran grasas, lactosa y vitaminas hidrosolubles. El calostro le confiere al recién nacido la condición protectora contra infecciones, ya que transfiere inmunidad pasiva por absorción intestinal de inmunoglobulinas, altas concentraciones de lisozima y grandes cantidades de macrófagos y linfocitos (Lawrence & Lawrence, 2007).

En la leche de transición progresivamente se elevan las concentraciones de lactosa y grasas, por aumento de colesterol y fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles. Paralelamente, disminuyen los niveles de proteínas, inmunoglobulinas y vitaminas liposolubles debido a que se diluyen por el incremento en el volumen de producción. Su color blanco se debe a la emulsificación de grasas y a la presencia de caseinato de calcio (Sala-Vila *et al.*, 2005; Suarez-Villa *et al.*, 2019).

Por su parte, la leche materna madura es producida a partir de los 15 días de vida del lactante. Se trata de una fracción de muy buena calidad nutricional, que contiene un 88 % de agua y una osmolaridad semejante a la del plasma, lo cual permite al niño mantener un perfecto

equilibrio electrolítico. Asimismo, es rica en macronutrientes destacándose el alto contenido de carbohidratos (7 % m/v), grasas (3,8 % m/v) y proteínas (0,9 % m/v) (Guo, 2014).



**Figura 4. Imágenes de los tres estadios de la leche humana materna. Extraído de: AEP, 2023.**

## **1.6 Los bancos de leche humana**

De acuerdo con la reunión conjunta OMS/UNICEF, el mejor alimento para el recién nacido que no puede ser alimentado directamente con el pecho de su madre, es la leche extraída de su propia madre (leche materna) o la extraída de otra madre sana (leche humana). Por ello es necesaria la existencia de bancos de leche humana (BLH) (Wight, 2001). Asimismo, se promueve cada vez más la alimentación con la leche humana donada en los servicios de neonatología como un recurso beneficioso para una mayor salud y economía (Underwood, 2013).

Existen circunstancias en las cuales la lactancia está limitada. De ellas el nacimiento pretérmino es una de las más frecuentes; además, la restricción de la lactancia ocurre también en los neonatos de madres que cursan ciertas infecciones (ej.: Virus de Inmunodeficiencia Humana – VIH), que están bajo tratamiento farmacológico (ej.: antirretrovirales o quimioterápicos), o que consumen drogas de abuso (ej.: cocaína o heroína). Los recién nacidos más vulnerables son los prematuros severos (nacidos con menos de 28 semanas) que poseen inmadurez en todos sus órganos y gran riesgo de desarrollar infecciones y enterocolitis necrotizante, que es una enfermedad inflamatoria grave (Chatterton, 2013). Es frecuente que las madres de bebés prematuros y hospitalizados tengan una disponibilidad limitada de leche por diversas circunstancias, en estos casos se recomienda la alimentación con leche donada por

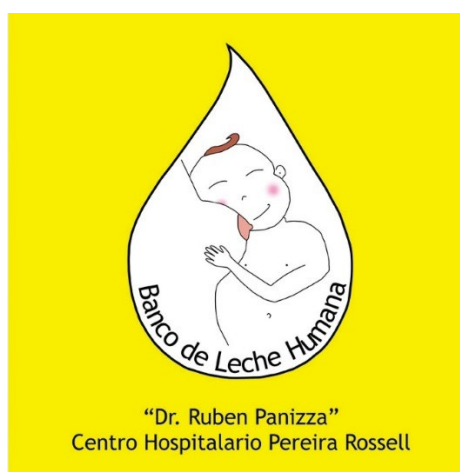
otra madre, pero procesada en bancos de leche humana lo cual permite cubrir las necesidades nutricionales de esos bebés (Almeida & Dórea, 2006). Estas instituciones tienen como función primaria promover la lactancia y apoyar la extracción de leche a las madres con hijos hospitalizados, para que puedan recibir leche fresca. Por otra parte, reciben donaciones de madres que tienen una sobreproducción de leche en relación con las necesidades de su hijo. La leche es congelada por la madre y transportada a los bancos de leche manteniendo la cadena de frío, donde es analizada y tratada antes de ser conservada para su posterior liberación según solicitud médica. En la etapa inicial de análisis se evalúan las propiedades organolépticas (olor, color), la acidez y el contenido energético. La acidez de la leche está determinada por su acidez natural y la desarrollada como consecuencia del consumo de lactosa por bacterias que generan ácido láctico y otros productos orgánicos ácidos. Por este motivo, la acidez es un indicador de la calidad de la leche recibida por los BLH, considerándose aceptables valores de hasta 8 °Dornic (Mac *et al.*, 2017). El contenido calórico de la leche se determina por el método del crematocrito o mediante equipos automatizados calibrados para leche humana, que cuantifican los niveles de lactosa, proteínas totales y grasas (Almeida & Dórea, 2006).

Por lo tanto, la leche humana proveniente de bancos se ha convertido en una excelente alternativa nutricional para niños prematuros, de bajo peso, que padezcan enfermedades infecciosas, diarreas e inmunosupresión, cuando la leche de sus madres no está disponible. De hecho, el aporte de nutrientes y componentes bioactivos que suministra la leche humana es muy ventajoso respecto a la alimentación con fórmulas. Sin embargo, la leche de las donantes debe ser pasteurizada antes de suministrarse a los niños para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas (Lawrence, 1999; Moreno-Villares & Germán-Díaz, 2019).

Uruguay cuenta con cuatro bancos de leche humana ubicados en el Centro Hospitalario Pereira Rossell – Banco de leche Humana “Dr. Rubén Panizza” (Montevideo) desde 2003, en el Hospital Regional de Tacuarembó – Banco de Leche Humana “Crecer” (Tacuarembó) desde 2004, en el Hospital Regional de Salto – Banco de Leche Humana (Salto) desde 2007 y en el Hemocentro Regional de Maldonado – Banco de Leche Materna (Maldonado) desde 2023 (ASSE, 2024). Así mismo también dispone de centros de recolección, a saber, el Centro de Recolección de Leche Humana del Sanatorio Canzani – BPS (Montevideo), el Centro de Recolección de Leche Humana del Centro de Salud de Paysandú (Paysandú), el Centro de

Recolección de Leche Humana del Hospital de Bella Unión (Artigas) y el Centro de Recolección de Leche Materna del Hospital de Rivera (Rivera) (ASSE, 2022).

En Uruguay nacen cerca de 47.000 niños cada año, de los cuales aproximadamente el 10 % son prematuros. El 17 % de los niños nacen en el Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR) donde la cifra de prematuridad se eleva al 15 % y se relaciona directamente con un seguimiento prenatal insuficiente. El 12 % de los niños nacidos en CHPR en 2009 pesaron menos 2,5 kg y el 19,6 % de ellos pesó menos de 1.5 kg (ASSE, 2009; MSP, 2023). Esta población de niños es asistida por el Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell (BLH-CHPR), siendo su función promover la lactancia y cuidar la salud de los niños prematuros de nuestro país lo cual es una prioridad del Programa Nacional de Salud de la Niñez del Ministerio de Salud Pública. Es el referente nacional de la Red Uruguaya de BLH que incluye a los ubicados en Salto y Tacuarembó e integra a su vez junto a otros países de Ibero América la Red Iberoamericana de BLH. Una vez recibida en el Laboratorio del BLH-CHPR la leche donada es pasteurizada y sometida a controles microbiológicos, organolépticos y fisicoquímicos. Esta caracterización preliminar de los lotes de leche permite evaluar el aporte de energía suministrado y adecuarlo a las necesidades de cada niño. Pero no solo es necesario que el aporte energético y proteico sea el adecuado, sino que también se debe considerar el aporte de oligoelementos, vitaminas y componentes bioactivos que también inciden marcadamente en un desarrollo saludable del neonato. Esto es aún más crucial en los casos de niños prematuros dada su alta vulnerabilidad.



**Figura 5. Logo del Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell.**

## 1.7 La pasteurización de la leche humana y las pérdidas de nutrientes

Debido a la posible contaminación de la leche desde su extracción hasta el momento del consumo, así como por la posible transferencia de patógenos de la donante, la misma es pasteurizada para evitar riesgos de infecciones en lactantes vulnerables. Para ello, el método actualmente recomendado a nivel mundial es la pasteurización Holder, a través del cual la leche es sometida a 62,5 °C durante 30 minutos (Matamoros *et al.*, 2014). La pasteurización representa una alternativa eficaz, practicada desde hace mucho tiempo en el campo de la Tecnología de Alimentos. Se trata de un tratamiento térmico aplicable a la leche humana que adopta como referencia la inactividad térmica del microorganismo más termorresistente: *Coxiella burnetti* (Cerf & Condron, 2006). Una vez observado el binomio temperatura de inactividad y tiempo de exposición capaz de desactivar ese microorganismo, se puede asegurar que los demás patógenos también estarán térmicamente inactivos (Unger & O'Connor, 2024). Si bien dicho método presenta un buen compromiso entre la seguridad microbiológica y la calidad nutricional, también es conocido el efecto deletéreo que posee sobre algunos componentes esenciales de la leche (Hartmann *et al.*, 2007). Los principales componentes que pueden verse afectados en la leche son: proteínas (lactoalbúmina, lactoglobulina, lactoferrina), enzimas (lisozima, lactoperoxidasa, lipasa), anticuerpos (inmunoglobulina A), ácidos grasos, oligosacáridos, vitaminas (A, B, C, E) y oligoelementos (Peila *et al.*, 2016). Asimismo, el tratamiento influye sobre la flora normal y destruye en gran medida plasmocitos y linfocitos T de la leche (Lawrence, 1999).

En términos generales, la pasteurización puede afectar negativamente algunas vitaminas sensibles al calor en los alimentos. Las vitaminas hidrosolubles como la vitamina C y la vitamina B9 son particularmente vulnerables, mientras que las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) suelen ser más estables. Asimismo, debe considerarse que las vitaminas son, en mayor o menor grado, sensibles a la luz y al oxígeno atmosférico, lo cual puede afectar su estabilidad y actividad biológica. Si bien la pasteurización reduce el contenido de algunas vitaminas en los alimentos, el impacto es generalmente mínimo y el proceso es crucial para la seguridad alimentaria (Belitz *et al.*, 2009).

En particular, las pérdidas de vitaminas han recibido poca atención en la leche humana, lo cual motivó, en parte, el presente trabajo de tesis. Las vitaminas A, B, C y E son sensibles al calor y, por lo tanto, sus concentraciones en la leche humana pueden verse disminuidas luego de la pasteurización (Matamoros *et al.*, 2014; Romeu-Nadal *et al.*, 2008). Asimismo, la vitamina C y algunas del complejo B son particularmente susceptibles a la oxidación cuando se exponen al oxígeno del aire, mientras que la vitamina A es susceptible a la luz (Guo, 2014). En cuanto a la pérdida de oligoelementos, de acuerdo con Mohd-Taufek *et al.* (2016) la pasteurización suele tener efectos mínimos a leves sobre oligoelementos tales como cobre, hierro, iodo, selenio y zinc en la leche humana donada. Dado que la pasteurización de las muestras de leche es necesaria desde el punto de vista microbiológico, es muy importante considerar si el proceso térmico involucrado fuera capaz de generar pérdidas sustanciales de algunos de esos componentes, repercutiendo negativamente sobre la salud de los niños (Adhisivam *et al.*, 2019; Da Costa, et al., 2003; Peila et al., 2016). A continuación, en la Figura 6, se muestra un esquema del procedimiento para el procesamiento de leche humana en bancos.



**Figura 6. Procedimiento para el procesamiento de la leche materna en bancos. Extraído de: HMBANA, 2024.**

En Uruguay hasta el momento, no se encuentran datos reportados en literatura acerca de si la pasteurización estuviera afectando de forma negativa el valor nutricional de la leche materna humana donada a los bancos de leche.

## 1.8 Rol de la Química Bioanalítica

La Química Bioanalítica es una subdisciplina de la Química Analítica que implica la separación, detección, identificación y cuantificación de distintos analitos en muestras biológicas en diferentes entornos. A menudo implica el estudio de moléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y vitaminas. Disciplinas tales como la Biología, la Bioquímica, la Medicina y la Toxicología se nutren con los avances de la Química Bioanalítica. El desarrollo en materia de análisis bioanalítico tuvo un gran impulso a partir de 1970, donde la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue introducida y ganó rápidamente la aceptación inicial en los laboratorios bioanalíticos. La capacidad para analizar una amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes sin la necesidad de la derivatización química ofreció ventajas significativas sobre la cromatografía de gases (GC), e incluso a su acople con espectrometría de masas (GC-MS). Con el tiempo, el desarrollo de esta técnica permitió la progresiva disminución de los tiempos de análisis y su acople con la espectrometría de masas (LC-MS), dotando a los químicos bioanalíticos con una herramienta de análisis altamente poderosa (Powel & Unger, 2004). Esta técnica permite desarrollar métodos que pueden diferenciar a los compuestos en base a propiedades fisicoquímicas a través de su interacción con la fase estacionaria utilizada, siendo muy útil para investigación y desarrollo. De igual forma, los avances tecnológicos relacionados con técnicas de espectrometría atómica, tales como la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), la espectrometría de emisión atómica por plasma inducido por microondas (MP-AES) y la espectrometría de masas mediante plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), permiten la determinación elemental en diversas matrices complejas de interés (Evans *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024).

En particular, dentro de las herramientas de trabajo en Química Bioanalítica, se encuentran las estrategias para la optimización y validación de los métodos de análisis previo a su implementación como método de rutina para el monitoreo de analitos en matrices biológicas de interés. Estas estrategias juegan un rol fundamental en el marco de esta tesis ya que se requiere de métodos bioanalíticos optimizados y validados de forma de asegurar la obtención de resultados confiables. En este sentido, es imprescindible la

confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos necesarios para poder aplicar los métodos a las determinaciones analíticas previstas.

### **1.8.1 Métodos de análisis**

#### **1.8.1.1 Preparación de las muestras**

Una de las etapas fundamentales del proceso analítico, además del muestreo, es el tratamiento o preparación de las muestras. En esta etapa, la muestra debe ser sometida a ciertos tratamientos, debido a que la mayoría de las técnicas utilizadas para las determinaciones analíticas de metales, semimetales y no metales requieren que el analito se encuentre en una disolución. Este proceso, consiste en la realización de operaciones físicas y/o químicas, que permitan la introducción de la muestra al instrumento de medida y de esta forma lograr una correcta determinación de los analitos de interés. Uno de los principales problemas es contar con un método que logre liberar cuantitativamente los analitos cuando se encuentran unidos a moléculas orgánicas (Krug & Piovezani Rocha, 2016).

Para la extracción de metales y semimetales se utilizan generalmente tratamientos drásticos con ácidos concentrados en presencia de calor, para lograr la oxidación total de la materia orgánica. El uso de las ondas de microondas para asistir la digestión de muestras es muy frecuente. Actualmente, las digestiones asistidas por microondas son de las más utilizados, con amplias aplicaciones. En esta digestión el calentamiento que se produce dentro de los vasos de reacción se debe a dos fenómenos: la migración iónica y la rotación de dipolos. Estos dos procesos son estimulados por la frecuencia de las microondas, donde el calentamiento del medio que contiene la muestra y un disolvente apropiado favorece la descomposición de la matriz donde se encuentra el analito (Krug & Piovezani Rocha, 2016; Mitra, 2003). Una de las ventajas de la digestión asistida por microondas radica en la posibilidad que poseen algunos equipos, de controlar las condiciones de temperatura y presión en todas las muestras por igual, ya que se trabaja con sistemas cerrados. Esto permite una mejor reproducibilidad del tratamiento y de los resultados. La rapidez, sencillez

y seguridad de los equipos digestores de microondas, hace que sean de los más utilizados y preferidos a la hora de realizar el tratamiento de muestras complejas para la posterior determinación de oligoelementos (Krug & Piovezani Rocha, 2016; Mitra, 2003).

En el caso de la extracción de vitaminas, es aconsejable adoptar algunas medidas preventivas para impedir las pérdidas por inestabilidad química, previo al análisis mediante cromatografía de líquidos. Los factores más importantes para tener en cuenta son la luz, el aire, la temperatura, el pH, algunos metales traza y la fuerza iónica. Dado que la mayoría de las vitaminas son fotosensibles, se recomienda el uso de material de vidrio de color ámbar y trabajar bajo luz tenue durante todo el análisis (Pawliszyn & Lord, 2010). Otra precaución es la adición de un antioxidante adecuado para los procedimientos de extracción. Asimismo, cuando la determinación de vitaminas se aplica a matrices biológicas, es necesario abordar otros problemas tales como: i) heterogeneidad química, ii) bajos niveles de concentración en las muestras, iii) complejidad de la matriz y iv) interacciones con otros constituyentes de la matriz. Respecto al primer punto, las sutiles diferencias estructurales entre las vitaminas de un grupo específico pueden dificultar su separación cromatográfica. En consecuencia, se prefiere analizar cada vitamina individualmente, aplicando condiciones de extracción capaces de liberar todas las formas unidas (mediante digestión ácida, alcalina o enzimática) o de convertir las diversas formas en una forma más estable (Gentili & Caretti, 2013).

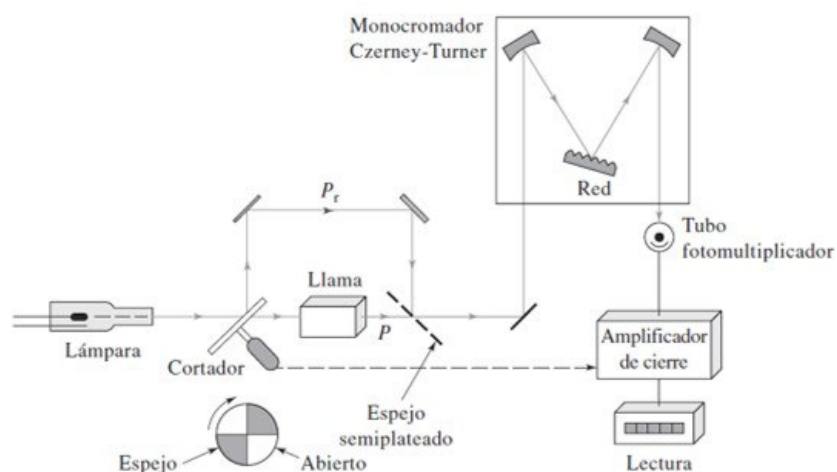
El procedimiento de extracción para el análisis de vitaminas hidrosolubles como las vitaminas del complejo B y la vitamina C depende de la forma química a cuantificar. Siendo estas altamente solubles en agua se suele utilizar soluciones acuosas como ser ácidos diluidos o disoluciones buffer con ajuste de pH dependiendo de las necesidades. Asimismo, se pueden llevar a cabo digestiones enzimáticas dependiendo de la forma en que se encuentra unida la vitamina a la matriz (Gentili & Caretti, 2013; Hyun & Tamura, 2005). En el caso de la vitamina B12 se suele recurrir a la aplicación de inmunoensayos debido a la baja concentración en alimentos no fortificados. El protocolo general de extracción para esta vitamina consiste en liberar los vitámeros unidos a proteínas y convertir todas las cobalaminas naturales en una forma única y estable, conocida como cianocobalamina (Kumar *et al.*, 2010).

Las vitaminas liposolubles se encuentran en la fracción lipídica de los alimentos, compuestas principalmente de triglicéridos y en parte de esteroides, fosfolípidos y otros constituyentes lipídicos. Estas sustancias, al tener una solubilidad análoga a la de las vitaminas liposolubles, complican el aislamiento de las vitaminas liposolubles y constituyen una fuente de interferencias durante los siguientes análisis (Ball, 2006; Blake, 2007; Gentili & Caretti, 2013). En este sentido, la saponificación en caliente es la herramienta más eficaz para eliminar la mayor parte del material graso, hidrolizando los enlaces éster de glicéridos, fosfolípidos, esteroides esterificados y carotenoides (Heudi *et al.*, 2004; Indyk, 1988). Además, la hidrólisis alcalina libera formas unidas de vitaminas (ej.: formas esterificadas y unidas a proteínas). Normalmente, la saponificación se lleva a cabo con una mezcla de metanol y una solución acuosa de KOH 50 % (m/v) en presencia de un antioxidante (ej.: ácido ascórbico) durante 30 min a aproximadamente 80 °C (Gentili & Caretti, 2013). La fracción insaponificable (vitaminas liposolubles, carotenoides, esteroides, etc.) se extrae de la digestión alcalina mediante extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (hexano, éter de petróleo). El hexano tiene la ventaja de proporcionar extractos que no contienen jabones y son casi neutros. Sin embargo, a la hora de utilizarlo, es aconsejable mantener el porcentaje de metanol por debajo del 40 % (v/v) para evitar pérdidas de vitaminas ligeramente polares, como retinoides y tocoferoles. La saponificación es una estrategia muy útil para la extracción de vitaminas A y E (Ball, 2006; Blake, 2007).

#### **1.8.1.2 Espectrometría de absorción atómica**

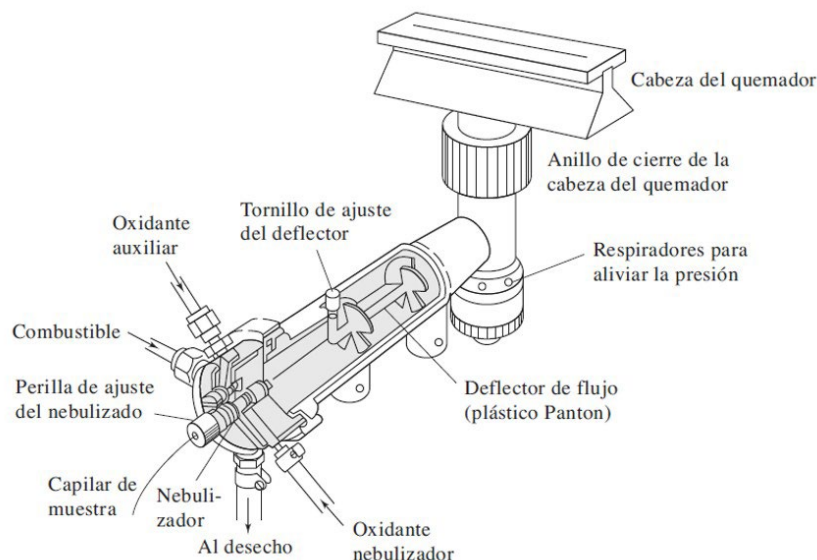
La absorción atómica es una técnica espectroscópica de análisis elemental que requiere la atomización del elemento de interés. Para la determinación cualitativa y cuantitativa de uno o varios elementos presentes en una muestra, es necesario volatilizar los analitos en cuestión y transformarlos en átomos gaseosos. De esta forma, cuando la radiación atraviesa la zona donde se encuentran los átomos en estado gaseoso, se produce la absorción en frecuencias definidas. Estas frecuencias están relacionadas con el tipo de átomo, y la absorción de la radiación se corresponde mediante un modelo matemático, con

la cantidad del elemento presente (Welz & Sperling, 1999). En la Figura 7 se muestra, a modo de ejemplo, un esquema de un espectrómetro de absorción atómica de llama típico.



**Figura 7. Espectrómetro de absorción atómica de llama típico de simple haz. Extraído de: Skoog *et al.*, 2008.**

Una de las etapas más críticas de esta técnica es la atomización, por lo cual se desarrollaron distintas formas a lo largo de los años con el fin de mejorarla. La forma más sencilla, y por lo tanto la primera en ser utilizada, fue la atomización por llama (FAAS). Aquí la muestra es nebulizada por el flujo de un gas oxidante y la mezcla con un gas combustible, para ser transportada hasta la llama (Welz & Sperling, 1999). En la Figura 8 se muestra, a modo de ejemplo, un mechero típico de flujo laminar utilizado para estas determinaciones.

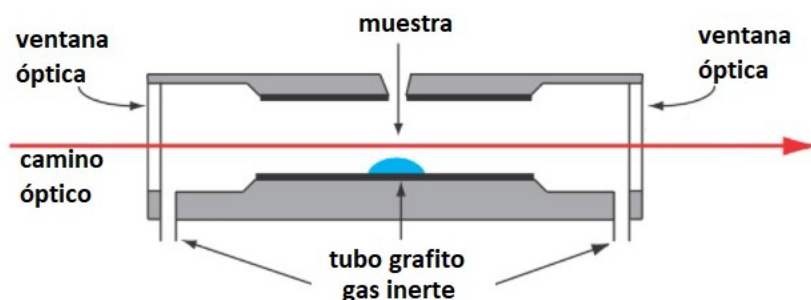


**Figura 8. Mechero de flujo laminar. Extraído de: Skoog *et al.*, 2008.**

La llama debe ser lo suficientemente energética para poder volatilizar y atomizar la muestra. Por este motivo, su composición es de suma importancia. Se deben optimizar flujo, proporción y tipo de gases a utilizar en las determinaciones. Las llamas más utilizadas contienen una mezcla de aire-acetileno, pero existen otras mezclas. La técnica FAAS posee límites de detección y cuantificación en el orden de  $\text{mg kg}^{-1}$ . Por su sencillez y bajo costo, suele ser la técnica más utilizada, siempre que se trabaje con elementos que se encuentran en ese nivel de concentración, lo cual dependerá de la muestra en cuestión (Welz & Sperling, 1999).

Otra forma ampliamente utilizada es la atomización electrotérmica (ETAAS). Esta consiste en colocar un volumen pequeño de muestra en un tubo de grafito, que se calienta eléctricamente, y someterla a un programa de temperaturas que depende del analito y de la matriz a analizar. Los programas de temperatura consisten en varias etapas en las que esta va en aumento. Primeramente, se efectúa el secado de la muestra, pasando luego por la pirólisis o calcinación, etapa donde se elimina la materia orgánica que se encuentra presente en la matriz, terminando con la atomización, etapa de mayor temperatura. Se destaca por su alta sensibilidad, debida a la capacidad de confinamiento de los átomos gaseosos en el tubo de grafito, el cual se encuentra perfectamente alineado con el haz de

luz (Welz & Sperling, 1999). En la Figura 9 se muestra, a modo de ejemplo, un atomizador de horno de grafito utilizado para estas determinaciones.



**Figura 9. Corte transversal del sistema ETAAS. Extraído de: Harvey, 2024.**

Al trabajar con ETAAS se deben tener en cuenta varias condiciones. Aquí, es crítico el volumen de inyección de la muestra, la optimización de los programas de temperatura, los tiempos de mantenimiento de cada etapa del programa, el gas portador utilizado y su flujo. Todas estas variables deben ser optimizadas, para lograr una correcta determinación de los elementos en estudio (Welz & Sperling, 1999). En el proceso de atomización electrotérmico, muchas veces es necesaria la incorporación de modificadores químicos. Estos son sustancias químicas que no afectan la determinación de la concentración del analito, y que permiten utilizar mayores temperaturas de pirólisis y/o de atomización, o la estabilización térmica de los analitos volátiles. La adición de estos, cuáles utilizar y en qué concentración, también forman parte de la optimización del método (Tsalev & Slaveykova, 1992).

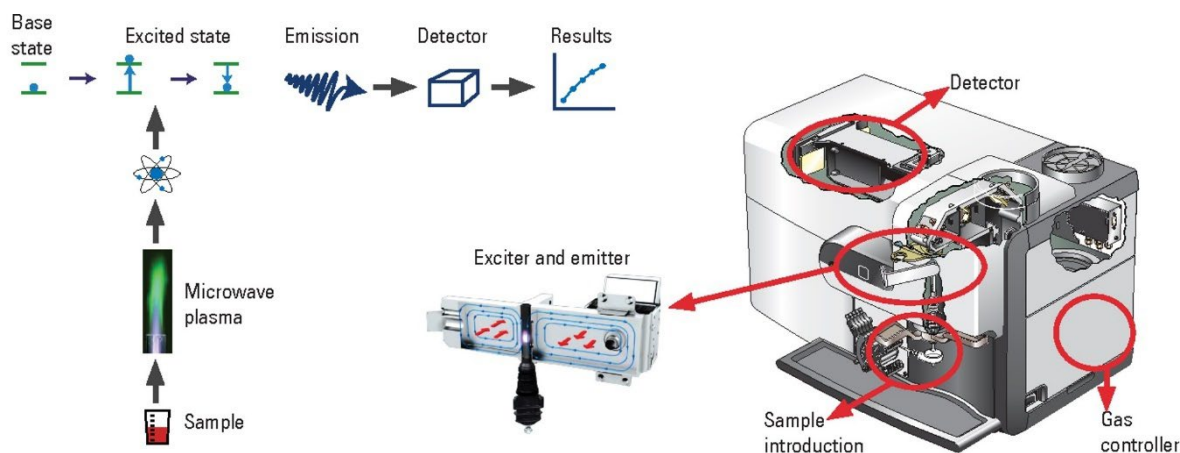
Un modificador ampliamente utilizado es el nitrato de paladio ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ ), que actúa en la estabilización térmica de los elementos y permite el aumento de la temperatura y/o del tiempo de volatilización (Welz & Sperling, 1999). Sin embargo, para incrementar la volatilidad de especies concomitantes, es decir, componentes individuales de la matriz distintos del analito, se pueden efectuar mezclas con otros modificadores, lo cual disminuye las interferencias que pueden provenir de la matriz (Dobrowolski *et al.*, 2010). La combinación de dos o más modificadores constituye un modificador mixto, que ha

resultado una estrategia eficiente para reducir los efectos causados por matrices biológicas complejas.

### **1.8.1.3 Espectrometría de emisión atómica**

En las técnicas de espectrometría de emisión atómica se relaciona la energía emitida por un determinado analito, al volver a su estado fundamental los electrones que fueron previamente excitados. La excitación puede ser térmica, eléctrica o inclusive mediante una reacción química. Finalmente, la energía emitida a una determinada longitud de onda característica del elemento medido brinda información sobre la identidad y cantidad del analito presente en la muestra.

Una fuente de excitación alternativa al reconocido plasma de argón ampliamente utilizado en plasma de acoplamiento inductivo (ICP) la constituye el plasma inducido por microondas (MP-AES). Este plasma se genera debido a la interacción con un campo magnético y eléctrico utilizando nitrógeno. La antorcha es igual a la que utiliza un ICP, pero la inducción del plasma está dada por un magnetrón. Las temperaturas que alcanza un plasma de nitrógeno son menores a las de las fuentes de ICP, unos 5000 K en la zona de medición. Dado que las temperaturas alcanzadas son menores, los espectros suelen ser menos complejos, ya que contienen muy pocas líneas iónicas, aunque a veces esto puede ser una desventaja durante la determinación de elementos con un elevado potencial de ionización. Sin embargo, en general, la sensibilidad obtenida suele ser mejor a la de FAAS para un mismo elemento, pudiendo compararse en algunos casos con la sensibilidad de ICP-OES (Pozebon *et al.*, 2020). Asimismo, se trata de una técnica multielemental con la cual se pueden obtener amplios rangos lineales.



**Figura 10. Esquema de un equipo de espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas. Extraído de: Yoshida *et al.*, 2012.**

Una característica importante de MP-AES es que puede acoplarse fácilmente a la técnica de generación de hidruros (HG), dando lugar al acoplamiento HG-MP-AES. Esta técnica permite la introducción de la muestra directamente en forma gaseosa, lo cual es útil para la determinación de elementos volátiles. Aquí, se generan hidruros volátiles a partir de algunos elementos por la acción de un agente reductor, generalmente tetrahidrobórato de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), en medio ácido. Una vez generado el hidruro, es transportado hasta la antorcha mediante un gas inerte. Una vez en la antorcha se atomizan los analitos de interés mediante una reacción radicalaria. Esta técnica suele ser muy utilizada para elementos volátiles como arsénico (As) y selenio (Se). Al generarse las especies volátiles de los analitos, éstos se separan del medio, disminuyendo de esta forma la probabilidad de interferencias debidas a la matriz, al momento de realizar las determinaciones (Welz & Sperling, 1999).

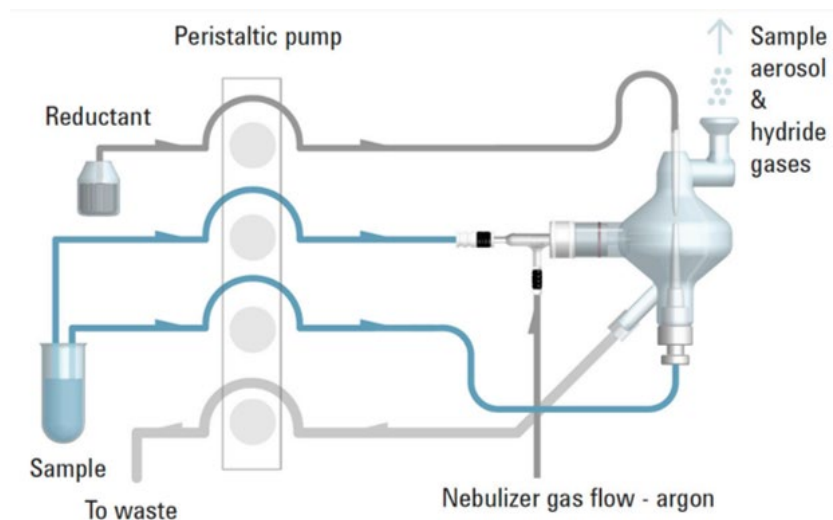


Figura 11. Esquema de cámara trabajando en modo hidruro utilizando la bomba peristáltica de tres canales. Extraído de: Lorençatto *et al.*, 2020.

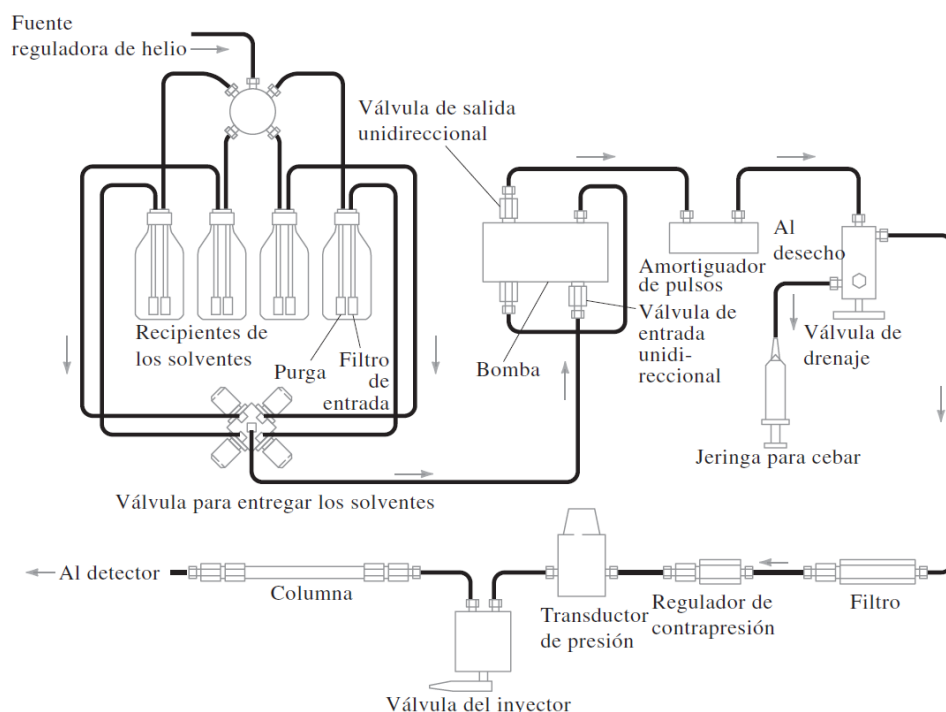
#### 1.8.1.4 Cromatografía de líquidos de alta presión

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su alta sensibilidad, su fácil adaptación a diversas determinaciones cuantitativas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en muchos campos de la ciencia. Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, vitaminas, entre otros. Existen varios tipos básicos de cromatografía donde la fase móvil es un líquido. A menudo, estos tipos se clasifican de acuerdo con el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria. Entre estos tipos se encuentran: cromatografía de reparto, cromatografía de adsorción o líquido-sólido, cromatografía de intercambio de iones o iónica, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía por afinidad y cromatografía quiral. El tipo más usado de HPLC es la cromatografía de reparto y puede dividirse en variantes líquido-líquido y líquido-fase enlazada. La diferencia entre estas dos radica en la forma de mantener la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del empaquetamiento. En la cromatografía líquido-líquido, el líquido se mantiene por adsorción física, mientras que en la de fase enlazada se enlaza químicamente. Muchos rellenos de fase estacionaria ligada se

preparan por reacción de un organoclorosilano con los grupos OH formados en la superficie de partículas de gel de sílice por hidrólisis en ácido clorhídrico diluido caliente, siendo el producto un organosiloxano. Los empaquetamientos más frecuentes son octil-siloxano (C8) u octadecil-siloxano (C18). Los empaquetamientos de fase enlazada tienen la ventaja de una estabilidad mucho mayor que las fases estacionarias que se mantienen inmóviles físicamente y la desventaja principal es su capacidad de muestra limitada. Según la polaridad relativa de las fases móvil y estacionaria se pueden distinguir dos tipos de cromatografía de reparto: fase normal (fase estacionaria polar y fase móvil apolar) y fase reversa (fase estacionaria apolar y fase móvil polar). Se estima que más de tres cuartas partes de las separaciones con HPLC se realizan actualmente con una fase estacionaria reversa y ligada de C8 o C18 (Harvey, 2024; Skoog *et al.*, 2008).

Con el objetivo de alcanzar flujos razonables con rellenos de tamaño de partícula de entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , que por otra parte son comunes en la cromatografía de líquidos moderna, se requieren presiones de bombeo del orden de los cientos de atmósferas. Un equipo moderno para cromatografía de líquidos está equipado con varios reservorios de fase móvil. A menudo están equipados con un sistema para eliminar los gases disueltos y el polvo de los líquidos. Los gases disueltos ocasionan flujos inestables y ensanchamiento de bandas, mientras que las burbujas y el polvo interfieren con el funcionamiento de la mayoría de los detectores. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse el sistema de bombeo para que tome disolventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo disolvente, se denomina isocrática, sin embargo, es común realizar un gradiente de composición de la fase móvil a lo largo del tiempo para una óptima eficiencia y acortar la duración del proceso. La bomba envía el disolvente a través de tubos de diámetro pequeño, generalmente de acero inoxidable, hacia la válvula inyectora. Esta consiste en una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de disolvente, la muestra contenida en un aro o loop de volumen conocido. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el sistema de detección. Este produce una señal

eléctrica proporcional a la concentración y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo denominado cromatograma. Dentro de los detectores más utilizados se encuentran los detectores de arreglo de diodos (DAD). Con una configuración de arreglo de diodos en serie se puede obtener un espectro mediante un barrido electrónico en forma muy rápida. Todos los datos puntuales necesarios para definir un espectro se pueden recoger de manera simultánea. Este concepto es atractivo por la velocidad potencial a la que se pueden obtener los espectros, así como por la posibilidad de utilizarlos en las determinaciones simultáneas de varios componentes. El escaneo múltiples longitudes de onda simultáneamente, permite el análisis de múltiples componentes en una sola pasada, lo cual es especialmente útil para la identificación y cuantificación de compuestos en mezclas complejas (Harvey, 2024; Skoog *et al.*, 2008).



**Figura 12. Esquema de un equipo típico de HPLC. Extraído de: Skoog *et al.*, 2008.**

#### 1.8.1.5 Inmunoensayos

Aunque la cromatografía de líquidos es una técnica muy eficiente para el análisis cuantitativo de vitaminas, muchos de los métodos internacionales actuales se basan en inmunoensayos, debido a la creciente necesidad de métodos más rápidos y específicos. En

este sentido, existen métodos bioespecíficos basados en la interacción de un anticuerpo con su antígeno como ser el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Existen varios kits comerciales para radioinmunoensayo disponibles para la determinación de vitaminas en muestras biológicas, pero su aplicación al análisis de alimentos es limitada. Por su parte, el ensayo ELISA realizado en pocillos de plástico de placas de microtitulación tiene la ventaja de utilizar reactivos estables que pueden almacenarse por períodos más prolongados y puede llevarse a cabo con equipos económicos. El tipo de sistema ELISA que se utiliza comúnmente para las vitaminas es el tipo indirecto, donde el antígeno se inmoviliza en la placa, se une un anticuerpo primario específico, y luego se añade un anticuerpo secundario conjugado con una enzima. La placa se incuba durante un tiempo determinado para permitir la unión competitiva entre el antígeno marcado y la vitamina en la muestra, luego se realiza un lavado para eliminar cualquier sustancia no unida y finalmente se añade un sustrato para la enzima conjugada. La reacción enzimática produce un cambio de color proporcional a la cantidad de antígeno marcado unido que puede monitorearse espectrofotométricamente (Kumar *et al.*, 2010).

### **1.8.2 Desarrollo y validación de métodos de análisis**

La validación de un método analítico es un proceso indispensable ya que confirma que el método posee las capacidades requeridas para la aplicación. Es importante no solo la evaluación de la performance del método sino también evaluar que sea adecuado para el objetivo (Eurachem, 2014).

Varios organismos internacionales han establecido guías para la validación de métodos analíticos. Una de las guías más utilizadas para validación de métodos de análisis inorgánicos es la Guía de la Eurachem (Eurachem, 2014). Esta guía establece una serie de características que deben ser estudiadas para evaluar la performance de un método. A continuación, se detallan las principales características de este listado:

**Selectividad:** Capacidad de un método para determinar un analito en particular, dentro de una mezcla o matriz, sin interferencia de otros componentes de comportamiento similar.

Límites de detección y cuantificación: Mínima concentración a la cual el analito puede ser detectado y cuantificado, respectivamente, con un cierto grado de confianza.

Rango de trabajo: Rango en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable.

Sensibilidad analítica: Cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito.

Veracidad: Evaluación de qué tan cercano es el resultado arrojado por el método al respecto del valor de referencia. Es generalmente evaluado mediante el cálculo del porcentaje de recuperación  $\% R = (\text{Valor promedio obtenido} / \text{valor de referencia}) \times 100$ . El valor de referencia puede ser el correspondiente a un material de referencia certificado o el obtenido por un método de referencia. De no contar con las opciones anteriores es posible preparar una muestra artificial y realizar el método de adiciones estándar o fortificaciones sobre la muestra.

Precisión: Es una medida de qué tan cercanos son los resultados obtenidos por el método. Se evalúa a través de la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad, mediante el cálculo de la desviación estándar relativa porcentual (% RSD). Como criterio de aceptación, generalmente se toma en cuenta que la desviación estándar ( $\sigma$ ) es función de la concentración medida y por tanto el valor de RSD considerado aceptable está relacionado con la concentración de cada analito en particular. Para estimar este valor aceptable, una opción es utilizar la ecuación de Horwitz la cual es una ecuación empírica llamada trompeta de Horwitz por su forma. Esta ecuación es aceptada por los principales organismos internacionales y permite estimar el valor de RSD para una dada concentración (Horwitz & Albert, 2006; Miller & Miller, 2010).

Incetidumbre: Intervalo, asociado con el resultado de medida que expresa el rango de valores que pueden ser atribuidos a la cantidad medida.

Robustez: Medida de la capacidad de no verse afectado por pequeñas variaciones de los parámetros del método.

En la guía Eurachem se presentan pautas y recomendaciones para realizar la evaluación de los diferentes parámetros y lograr la validación completa de un método. Sin embargo, también se pone énfasis en que, si se trata de métodos ya validados, es importante tomar en cuenta qué tan confiable es la información que se brinda sobre la validación. Generalmente, si se trata de métodos normalizados o presentados por organismos internacionales o donde la validación se realizó en estudios colaborativos, se puede tener cierta seguridad de los resultados. Además, debe ser corroborado que la información obtenida en la validación es adecuada para el propósito que se le pretende dar, así como verificar la performance del método en el laboratorio (Eurachem, 2014).

## **1.9 Química Analítica Verde**

En la actualidad, el conocimiento de aspectos ecológicos ha llevado a muchos químicos analíticos a revisar mejor determinados parámetros críticos en el desarrollo de nuevos métodos, por ejemplo, el tiempo de operación, la seguridad, la relación volumen/concentración de disolventes y el consumo de energía, entre otros. En este sentido, la Química Analítica Verde es un concepto de desarrollo sostenible que intenta eliminar o minimizar el impacto ambiental causado por la ejecución de los procesos analíticos (Bendicho *et al.*, 2012).

Los 12 principios de la Química Analítica Verde se describen a continuación (Gałuszka *et al.*, 2012):

1. Aplicación de técnicas analíticas directas de forma de evitar el tratamiento de muestra.
2. Utilización de tamaño reducido y número mínimo de muestras.
3. Realización de mediciones in situ, de ser posible.
4. Integración de operaciones y procesos analíticos para la reducción de uso de reactivos y ahorro de energía.
5. Selección de métodos automatizados y miniaturizados.
6. No utilización de la derivatización.

7. Realización de una correcta gestión de residuos generados, en lo posible disminuirlos.
8. Realización de análisis multielemental o multiparamétrico.
9. Reducción del uso de energía.
10. Selección de reactivos obtenidos de fuentes renovables, de ser posible.
11. Eliminación o remplazo de reactivos tóxicos.
12. Minimización del potencial de accidentes químicos, garantizando la seguridad del analista.

De acuerdo con el grado de cumplimiento de estos 12 principios, se podrá determinar cuán alineada se encuentra la metodología en cuestión respecto a la Química Analítica Verde. Con este fin se pueden utilizar distintos protocolos de evaluación (Pena-Pereira *et al.*, 2020).

### **1.10 Hipótesis y justificación**

En esta tesis se planteó la evaluación de potenciales pérdidas de elementos esenciales y vitaminas en leche humana donada, debido al proceso térmico de pasteurización Holder, en un grupo de analitos de gran implicancia en la nutrición y salud de los lactantes.

Con este fin se buscó desarrollar métodos que fueran eficientes para la extracción cuantitativa de los analitos en estudio, aplicando, en lo posible, procedimientos multi analito y alineados en mayor o menor grado con los principios de la Química Analítica Verde. En este sentido, el trabajo se enmarcó en las líneas de investigación del grupo Bioanalítica y Especiación (BIOESP) del Área Química Analítica (DEC) y el Área de Química de Alimentos (CYTAL). Estos grupos cuentan con vasta experiencia en el tema de preparación de muestras complejas y la determinación de elementos traza y compuestos esenciales en alimentos. Asimismo, parte del trabajo se enmarcó en las actividades llevadas a cabo en el marco de un proyecto de investigación financiado por CSIC en la modalidad Vinculación Universidad – Sociedad y Producción (CSIC-VUSP). El mismo se tituló “Estudio de la composición de oligosacáridos, vitaminas, elementos indispensables y elementos potencialmente tóxicos en leche donada al Banco de Leche Humana – Centro Hospitalario Pereira Rossell” (responsable Dr. Luis Panizzolo).

En este contexto, se planteó el estudio de cuatro elementos esenciales, dos elementos potencialmente tóxicos y cinco vitaminas, con el fin de establecer valores basales en Uruguay, monitorear potenciales pérdidas debido al tratamiento térmico y finalmente evaluar la calidad e inocuidad de la leche humana donada. De esta forma se buscó aportar información para el sector salud y para la sociedad en general. En forma complementaria, se realizó un monitoreo de la leche de madres con distintos hábitos alimenticios, con el fin de estudiar las potenciales variaciones en los niveles de algunos nutrientes esenciales al cambiar el tipo de dieta materna y las variaciones de concentración a lo largo del tiempo.

Los resultados de este trabajo constituirán información inédita muy importante para la retroalimentación del Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell, mediante la generación de nuevo conocimiento sobre los posibles efectos de la pasteurización sobre la pérdida de nutrientes en la leche humana, producto del proceso de conservación involucrado. Estos resultados serán de gran relevancia para futuras evaluaciones por parte de los referentes del Banco de Leche Humana, donde se pueda discutir los pros y los contras de la tecnología utilizada actualmente y las potenciales repercusiones sobre la salud de los lactantes. Asimismo, los resultados serán difundidos a la sociedad en general, de forma de brindar información funcional y nutricional acerca del contenido de vitaminas y elementos esenciales en la leche humana de madres uruguayas, así como de establecer la inocuidad relacionada con la presencia de los elementos tóxicos estudiados. Se considera que la información obtenida en este trabajo de tesis será de gran utilidad para el sector, ya que se espera poder correlacionar los niveles de los nutrimentos encontrados en las muestras de leche, con la alimentación de las madres donantes.

## **1.11 Objetivos**

### **1.11.1 Objetivos generales**

Realizar la determinación y comparación de los niveles de vitaminas (A, B9, B12, C y E), elementos esenciales (Cu, Fe, I, Se y Zn) y elementos potencialmente tóxicos (As y Pb) en leche humana, antes y después del proceso de pasteurización, para evaluar pérdidas luego del tratamiento térmico. Asimismo, evaluar las variaciones composicionales en los distintos estadios de la leche, a lo largo del tiempo y debidas a diferentes dietas maternas.

### **1.11.2 Objetivos específicos**

- Optimizar y validar los procedimientos para la extracción de vitaminas liposolubles (A y E) e hidrosolubles (B9, B12 y C) en leche materna humana donada por el Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell, para su posterior determinación mediante HPLC-DAD o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
- Optimizar y validar los procedimientos para la extracción de elementos esenciales (Cu, Fe, I, Se y Zn) y elementos potencialmente tóxicos (As y Pb) en leche materna humana donada por el Banco de Leche Humana del Centro Hospitalario Pereira Rossell, para su posterior determinación mediante diferentes técnicas espectrométricas.
- Determinar vitaminas liposolubles (A y E) e hidrosolubles (B9, B12 y C) y elementos esenciales (Cu, Fe, I, Se y Zn) en muestras de leche materna humana en sus estadios de calostro y leche madura, y evaluar diferencias entre ambos.
- Evaluar si existen pérdidas estadísticas significativas en los niveles de vitaminas y oligoelementos estudiados luego del proceso de pasteurización Holder.
- Determinar elementos esenciales (Cu, Fe, I, Se y Zn) en la leche materna humana a lo largo de un período de 24 horas y un periodo de 1 mes, para una misma madre, de forma de evaluar potenciales variaciones intradía e intrames, respectivamente.
- Evaluar variaciones en los niveles de nutrientes esenciales al cambiar el tipo de dieta materna, según se trate de madres omnívoras o veganas.

# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los materiales, reactivos, equipos e insumos utilizados en este trabajo de tesis. Se describen también los métodos de muestreo, las operaciones preliminares y los tratamientos de muestra evaluados y desarrollados, así como las condiciones instrumentales y procedimientos de validación de los métodos estudiadas.

### 2.1 Reactivos y materiales

- Agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩ cm (ASTM Tipo I) obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore™ DirectQ3 UV.
- Materiales de referencia estándar NIST 1549 *Whole Milk Powder*, NIST 1846 *Infant Formula* y NIST 1849a *Infant/Adult Nutritional Formula I (milk-based)* (NIST, Gaithersburg, MD, EUA).
- Estándares para absorción atómica de 1000 mg L<sup>-1</sup> de As, Cu, Fe, Pb, Se y Zn (Fluka, EUA).
- ICP Multi Element Standard Solution VI Merck CertiPUR (Darmstadt, Alemania).
- Ácido ascórbico (99 %, Merck, Darmstadt, Alemania), retinol (95 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA), betacaroteno (93 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA), α-tocoferol (98 %, Acros Organics, EUA) y Ácido fólico (99 %, Merck, Darmstadt, Alemania).
- Tetrahidrobórato de sodio (NaBH<sub>4</sub>, 99,99 %) (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EUA).
- Hidróxido de sodio (NaOH, 99 %) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácidos minerales: ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, 65 %), ácido clorhídrico (HCl, 37 %), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 98 %) y ácido orto-fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 85 %) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Disolventes grado HPLC: acetonitrilo, metanol, éter de petróleo, hexano, trietilamina, ácido acético glacial (Carlo Erba, Milán, Italia).
- Kit «SENSISpec ELISA Vitamin B12» (Eurofins Technologies, Budapest, Hungría).

- Yodato de potasio ( $\text{KIO}_3$ ), persulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), sulfato de amonio y cerio(IV) dihidrato ( $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de PVDF (Thermo, Shanghai, China) y de nylon (Sartorius, Göttingen, Alemania).
- Gases comprimidos: acetileno 99,99 %, argón 99,998 % y nitrógeno 99,99 % (Linde, Montevideo, Uruguay).

## 2.2 Equipos

- Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200 (Norwalk, CT, EUA).
- Sistema de generación de hidruros Perkin Elmer MHS-15 (Norwalk, CT, EUA).
- Espectrómetro de absorción atómica Thermo Scientific iCE 3500 (Cambridge, Reino Unido).
- Espectrómetro de emisión atómica por plasma inducido por microondas Agilent 4210 (Santa Clara, CA, EUA).
- Analizador de leche Milkotronic Lactoscan SP (Nova Zagora, Bulgaria).
- Digestor de microondas CEM Mars 6 (Matthews, NC, EUA) provisto con vasos de reacción Easy Prep Plus® (Matthews, NC, EUA).
- Espectrofotómetro Unico 1205 (Dayton, NJ, EUA).
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu LC-20AT Prominence (Osaka, Japón).
- Lector de microplacas BioTekSynergy HT (Winooski, VT, EUA).
- Baño de agua termostatzado Daihan Scientific WB-11 (Seúl, Corea del Sur).
- Balanza analítica Shimadzu AUX220 (Osaka, Japón).
- Centrifuga Unico Power Spin DX C8706E (Dayton, NJ, EUA).
- Agitador vórtex Qilinbeier-5 (Hangzhou, China).
- Plancha agitadora y calefactora Thermolyne Cimarec® 2 (Dubuque, IA, EUA).

## 2.3 Criterios de selección de las donantes por parte del BLH-CHPR

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Madres saludables en período de lactancia, con edades comprendidas entre 18 y 38 años.
- Madres sanas amamantando o extrayendo leche con secreción láctea superior a las exigencias de su hijo, dispuestas a donar el excedente en forma voluntaria.
- Madres con exámenes serológicos negativos para VIH, hepatitis B y sífilis, que no consumían alcohol ni medicamentos contraindicados para la lactancia, no fumadoras y que cumplían con las normas de higiene requeridas para la extracción y conservación de la leche.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Muestras de leche que cumplían con los criterios de rechazo organoléptico (aspecto, color, olor), muestras con valor de acidez igual o mayor a 8 °D, donantes que no cumplían con las especificaciones dadas por la Red Global de Bancos de Leche Humana (rBLH, 2024).

## 2.4 Muestreo

El BLH-CHPR recomienda a las madres donantes como cuidado previo al ordeño almacenar las muestras únicamente en frascos de vidrio con tapas de plástico, retirar el cartón que llevan dentro las tapas, lavar los frascos y luego hervirlos por 15 minutos, dejar escurrir y tapar hasta su utilización. En cuanto al lugar para la recolección, debe realizarse, de ser posible, junto al recién nacido en un área limpia y tranquila. Respecto a la técnica de ordeño, se aconseja el lavado previo de manos con agua y jabón, masajear circularmente la mama y luego desde la base hasta el pezón durante varios minutos, y finalmente realizar la extracción cuando las mamas se encuentran cargadas de leche, aproximadamente cada 3 horas. Para la extracción, en la unión de la piel y la areola, se debe colocar el pulgar por encima y los otros dedos por debajo, realizando presión hacia atrás (en dirección hacia el

cuerpo) y soltando en forma rítmica, siendo este el método más higiénico. En caso de realizar la extracción con pezoneras u ordeñadoras eléctricas, se debe seguir una higiene estricta de todo el circuito de extracción según normas del fabricante. En todos los casos, se debe descartar las primeras gotas, luego destapar el frasco y colocar en éste la leche. No se debe llenar más de tres cuartos del frasco. Se debe rotular el frasco con la fecha de la extracción y nombre completo de la madre y colocarlo en freezer o congelador. Se puede juntar leche de más de un día (máximo 48 horas). Una vez extraída la leche y colocada en el frasco, guardar en la heladera hasta enfriar para luego colocar sobre la leche ya congelada. Nunca se debe colocar leche recién ordeñada sobre la congelada (ASSE, 2019).

En este trabajo se analizó un total de 40 muestras (10 calostros y 30 leches maduras) provenientes de madres saludables con gestación a término, proporcionadas por el BLH-CHPR, el cual cuenta con protocolos de muestreo estandarizados y con un sistema informático que garantiza la trazabilidad de todo el proceso. Las donantes brindaron su excedente de producción de acuerdo con los criterios de inclusión del BLH y mediante consentimiento informado accedieron a que una fracción fuera destinada al presente estudio de investigación, aprobado previamente por el Comité de Ética del CHPR. Cada muestra correspondió a un *pool* de 3 extracciones realizadas durante un mismo día, conservadas a -20 °C hasta su procesamiento. Se utilizó un volumen total de 12 mL para cada fracción, cruda y pasteurizada. La pasteurización tipo Holder fue realizada a una temperatura de 62,5 °C durante 30 minutos en baño de agua, con el objetivo de inactivar la totalidad de los organismos patógenos. Culminado el proceso las muestras se enfriaron rápidamente para volver a entrar en la cadena de frío. Finalmente, las mismas fueron trasladadas y almacenadas en tubos de polipropileno a -18 °C en el laboratorio de Química Analítica. Cabe destacar que este trabajo cuenta también con el aval de la Comisión de Ética en la Investigación en Seres Humanos de Facultad de Química, UdelAR (Resolución número 18 del CFQ del 16 de abril de 2020, Exp. Nº 101900-000832-19).

## **2.5 Métodos analíticos**

### **2.5.1 Determinación de macronutrientes**

#### **2.5.1.1 Determinación de los porcentajes de grasa, lactosa y proteína**

Para la determinación de estos importantes parámetros de calidad, se utilizó el analizador ultrasónico Lactoscan SP, el cual fue específicamente calibrado para este trabajo con leche humana. Las medidas se realizaron directamente sobre las muestras, sin la necesidad de tratamiento previo. Estas medidas se realizaron en el BLH-CHPR con apoyo del Lic. Arturo Puyol.

### **2.5.2 Determinación de metales, semimetales y no metales**

#### **2.5.2.1 Determinación de As, Cu, Fe, Se, Pb y Zn**

Para la determinación analítica de estos elementos, fue necesario un pretratamiento de las muestras, debido al alto contenido de materia orgánica. Se buscó contar con un método que lograra liberar cuantitativamente todos los analitos en estudio, con una única extracción. Se debe tener especial cuidado de no perder los elementos volátiles como arsénico y selenio (Krug & Piovezani Rocha, 2016). Se desarrolló con este fin un método de preparación de la muestra mediante digestión ácida asistida por microondas, que permitió mediante un procedimiento único, obtener una disolución en la que se pudo determinar directamente cobre, hierro y zinc mediante espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), arsénico y plomo mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) y selenio mediante espectrometría de absorción atómica de llama acoplada a generación de hidruros (HG-AAS) (luego de una prerreducción adecuada).

Para la preparación de la muestra se colocó 1,00 mL de leche en los vasos de reacción y se agregó 9,00 mL de  $\text{HNO}_3$  4,2 mol  $\text{L}^{-1}$ . Para la programación de temperatura se utilizó una rampa de 15 min hasta alcanzar 200 °C y luego 10 min a 200 °C, a una presión de 500 psi, variando la potencia entre 400 y 1800 W. Se realizaron blancos de reactivos junto con las muestras.

Las determinaciones analíticas de cobre, hierro y zinc se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS). Las líneas analíticas fueron 324,75 nm (Cu), 248,33 nm (Fe) y 213,86 nm (Zn). Se utilizaron lámparas de cátodo hueco Perkin Elmer Lumina™ (Norwalk, CT, EUA). La composición de la llama fue acetileno (2,5 L min<sup>-1</sup>) – aire (10,0 L min<sup>-1</sup>) (Machado *et al.*, 2016).

Las determinaciones analíticas de arsénico y plomo fueron realizadas mediante espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS) con corrección de fondo de deuterio. Se utilizaron lámparas de cátodo hueco Photron (Narre Warren, Australia) siendo las líneas analíticas 193,7 nm (As) y 283,3 nm (Pb). La absorbancia integrada (área de pico) fue utilizada para la evaluación de las señales y la cuantificación. Se utilizaron tubos de electrografito (Thermo Scientific, EUA). Se utilizó argón 99,998 % (Linde, Uruguay) como gas de purga y protector. Las temperaturas de pirólisis y atomización para As fueron 1100 °C y 2400 °C, mientras que las temperaturas de pirólisis y atomización para plomo fueron 900 °C y 1400 °C, respectivamente. El modificador empleado para arsénico fue paladio (5 µg) (Gürbay *et al.*, 2012), mientras que para plomo se utilizó una mezcla paladio + ácido cítrico (27 µg + 5 µg) (Turan *et al.*, 2001).

En el caso del selenio, una vez concluida la digestión previamente descrita, se realizó una etapa de prerreducción para convertir cuantitativamente todo el elemento al estado de oxidación IV para la formación del hidruro correspondiente (Dedina & Tsalev, 1996). Para esta etapa se tomaron 5,00 mL del digesto y se agregó 1 mL de HCl 37 % (m/v) en matraz Erlenmeyer. La mezcla se colocó en plancha calefactora, y se mantuvo a ebullición controlada durante 1 hora. Posteriormente se dejó enfriar y se completó el volumen con agua ultrapura. La reducción en línea para la generación del hidruro H<sub>2</sub>Se fue realizada con NaBH<sub>4</sub> 2 % (m/v) en NaOH 0,5 % (m/v). Las determinaciones se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) utilizando el sistema Perkin Elmer MHS-15 acoplado al espectrómetro Perkin Elmer AAnalyst 200. Las condiciones operativas fueron: longitud de onda 196,0 nm, corriente de la lámpara de descarga sin electrodos Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA) de 400 mA, ancho de rendija de 0,5 nm y llama acetileno (2,5 L min<sup>-1</sup>) – aire (10,0 L min<sup>-1</sup>) y flujo de nitrógeno (gas portador)

de 60 mL min<sup>-1</sup>. El atomizador consistió en una celda tubo de cuarzo en forma de “T” con un camino óptico de 165 mm y un diámetro de 12 mm, calentada aproximadamente a 900 °C mediante la llama.

#### **2.5.2.2 Determinación de I**

La determinación de yodo se realizó mediante espectrometría de absorción molecular (MAS) según la modificación descrita por Ohashi *et al.* (2000) del método original de referencia de Sandell & Kolthoff (1937). El método se basa en el fuerte efecto catalítico del yoduro sobre la reacción entre el sulfato cérico y un exceso de ácido arsenioso en ácido sulfúrico diluido. Para esto se preparó previamente una solución de persulfato de amonio 1,3 M en agua, una solución de ácido arsenioso 0,05 M a partir de trióxido de arsénico disuelto en NaOH 0,875 M a la cual se agregó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (concentración final 3,2 % v/v) y NaCl (concentración final 25 g L<sup>-1</sup>), y una solución de sulfato de amonio y cerio (IV) 0,019 M en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,75 M. Para la curva de calibración se preparó una solución stock de yodo de 1000 mg L<sup>-1</sup> a partir de KIO<sub>3</sub>. El procedimiento consistió en una digestión de 0,50 mL de muestra con 1,00 mL de persulfato de amonio 1,3 M en baño de agua a 90 °C durante una hora. Luego se dejó enfriar y se transfirió 0,50 mL del digesto (o estándar) a un tubo de polipropileno, junto con 1,00 mL de ácido arsenioso 0,05 M y 0,50 mL de sulfato de amonio cérico 0,019 M. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Unico 1205 a 405 nm. Se utilizó una celda semimicro de poliestireno de 1 cm de camino óptico.

#### **2.5.2.3 Determinación multielemento de As, Cu, Fe, Pb, Se y Zn mediante MP-AES**

Con el fin de contar con un método multielemento más alineado con los principios de la Química Analítica Verde se desarrolló un método alternativo mediante MP-AES que permitió la determinación secuencial de arsénico, cobre, hierro, plomo, selenio y zinc. En esta etapa no se pudo incorporar el yodo debido a la incompatibilidad con la técnica analítica. Con este fin, se utilizaron los mismos digestos de leche descriptos anteriormente en la sección 2.5.2.1 para las determinaciones analíticas.

Las determinaciones totales de cobre, hierro, plomo y zinc se realizaron mediante MP-AES utilizando el espectrómetro Agilent 4210 equipado con un nebulizador inerte Agilent One Neb (Santa Clara, CA, EUA) con una cámara de pulverización ciclónica de vidrio de doble paso y una antorcha estándar. El espectrómetro utilizó nitrógeno generado en línea por el generador Agilent 4107, que toma aire del ambiente a través de un compresor Dürr Technik KK70 TA-200 K (Bietigheim-Bissingen, Alemania). El flujo de gas de plasma se fijó en  $20 \text{ L min}^{-1}$  y el caudal de gas auxiliar en  $1,5 \text{ L min}^{-1}$ . Se aplicaron los siguientes ajustes operativos: velocidad de la bomba de 30 rpm, tiempo de captación de 15 s, tiempo de estabilización de plasma con aspiración de muestra de 5 s y tiempo de lectura de 3 s (por triplicado). Se utilizó la corrección de fondo automática provista por el equipo.

Para las determinaciones de arsénico mediante HG-MP-AES se realizó una etapa de prerreducción para convertir cuantitativamente todo el elemento al estado de oxidación III para la formación del hidruro correspondiente (Dedina & Tsalev, 1995). Para esta etapa se tomaron 5,00 mL del digesto y se agregó 1 mL de HCl 37 % (m/v) en matraz Erlenmeyer. La mezcla se colocó en plancha calefactora, y se mantuvo a ebullición controlada durante 1 hora. Posteriormente se dejó enfriar, se completó el volumen con agua ultrapura, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de solución de KI 20 % (m/v) y se dejó reposar durante 1 hora. La reducción en línea para la generación de la arsina ( $\text{H}_3\text{As}$ ) fue realizada con  $\text{NaBH}_4$  2 % (m/v) en NaOH 0,5 % (m/v) utilizando la línea analítica correspondiente a 193, 695 nm (Mikheev *et al.*, 2017; Tanabe *et al.*, 2016). Se utilizó un espectrómetro Agilent 4210 con generador de nitrógeno en línea Agilent 4107 alimentado con el compresor de aire Dürr Technik, una antorcha estándar y una cámara de nebulización multimodo para la generación de hidruros. Esta cámara posee dos canales, uno para la muestra y otro para el agente reductor. Todas las muestras y blancos fueron analizados por triplicado (Tissot *et al.*, 2020).

Para las determinaciones de selenio mediante HG-MP-AES se llevó a cabo la misma prerreducción descrita en la sección 2.5.2.1, mientras que la reducción en línea para la generación del hidruro correspondiente ( $\text{H}_2\text{Se}$ ) fue realizada con  $\text{NaBH}_4$  2 % (m/v) en NaOH 0,5 % (m/v). Los parámetros instrumentales para cada elemento se detallan a continuación

en la Tabla 2. Las condiciones operativas fueron las mismas que se describieron en el párrafo anterior para la determinación de arsénico.

**Tabla 2. Parámetros instrumentales para la determinación de elementos por MP-AES.**

| Parámetro                                       | As      | Cu      | Fe      | Pb      | Se      | Zinc    |
|-------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Longitud de onda<br>(nm)                        | 193,695 | 324,754 | 371,993 | 405,781 | 196,026 | 213,857 |
| Posición de<br>visualización                    | 10      | 0       | 0       | 0       | -70     | 40      |
| Flujo del nebulizador<br>(L min <sup>-1</sup> ) | 0,70    | 0,70    | 0,85    | 0,80    | 0,45    | 0,40    |

Para la cuantificación se prepararon curvas de calibración por dilución en serie de una disolución estándar multielemento de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Para la evaluación de la veracidad y la precisión del método analítico se utilizó el material de referencia estándar NIST 1846.

### 2.5.3 Determinación de vitaminas

#### 2.5.3.1 Determinación de retinol, β-caroteno y α-tocoferol

En este caso fue necesario llevar adelante un procedimiento de extracción que incluyó una etapa de saponificación y de preconcentración previo a la cuantificación, dado que estas vitaminas se encuentran en relativas bajas concentraciones, asociadas a lipoproteínas, membranas celulares y otras estructuras. Asimismo, se degradan fácilmente con la luz, el oxígeno y elevadas temperaturas, por lo cual se tuvieron varios cuidados. El procedimiento optimizado consistió en mezclar 3,00 mL de leche con 0,15 g de ácido ascórbico (como agente antioxidante) y 6,00 mL de una disolución de KOH 16 % (m/v) en metanol, y calentar durante 30 minutos a 40 °C. Luego se dejó enfriar y se adicionaron 3,00 mL de hexano, se homogeneizó en vórtex y se dejó reposar por otros 30 minutos. La fase orgánica fue retirada con pipeta Pasteur y colocada en un tubo limpio. El disolvente se evaporó mediante corriente de nitrógeno y en ausencia de luz. El residuo se reconstituyó en 1 mL de metanol. Finalmente, las disoluciones obtenidas fueron filtradas mediante filtros

de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y colocadas en viales ámbar. Las determinaciones analíticas se realizaron mediante cromatografía líquida de fase reversa con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD), empleando una columna Thermo BDS HYPERSIL C-18 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Las condiciones del sistema fueron: fase móvil acetonitrilo:metanol (65:35 v/v), velocidad de flujo de 1,5 mL min<sup>-1</sup> y volumen de inyección de 100  $\mu\text{L}$ . Las longitudes de onda de medida fueron 210 ( $\alpha$ -tocoferol), 325 nm (retinol) y 450 nm ( $\beta$ -caroteno) (Martínez-Rojano, 2016; Xavier *et al.*, 2018).

### **2.5.3.2 Determinación de ácido ascórbico**

Se llevaron a cabo extracciones con un ácido diluido. Para ello se tomó 1,00 mL de muestra y se agregó 1,00 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 % (v/v) a pH=2,8. Las mezclas obtenidas fueron agitadas en vórtex durante 1 minuto y luego centrifugadas a 3700 rpm durante 15 minutos. Para las determinaciones analíticas se empleó cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), utilizando como fase móvil una mezcla de ácido acético 0,1 % (v/v): metanol (95:5) a un flujo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> en modo isocrático. Como fase estacionaria se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, EUA). La longitud de onda de trabajo fue de 254 nm (Romeu-Nadal *et al.*, 2006).

### **2.5.3.3 Determinación de ácido fólico**

Para la extracción de ácido fólico se colocó 1,0 mL de muestra en un tubo cónico de polipropileno, se añadió 0,1 g de ácido tricloroacético (TCA) y la mezcla se agitó durante 10 min en agitador mecánico. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 2000 g y se recuperó el primer sobrenadante. Al precipitado obtenido se le añadió 1 mL de TCA 4 % m/v, se mezcló durante 10 min y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. Luego de la centrifugación, se combinaron ambos sobrenadantes y se llevaron a un volumen final de 5,0 mL con TCA 4 % m/v. La solución resultante se filtró con filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, previo al análisis mediante HPLC-DAD. La configuración del sistema cromatográfico fue de fase reversa. Se utilizó una columna C18 (100 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). La masa móvil estuvo compuesta por metanol: solución de trietilamina 0,5 % v/v + ácido acético glacial 2,4 % v/v (85:15). Los análisis se realizaron en modo isocrático a un

flujo de  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ . El volumen de inyección fue de  $50 \text{ }\mu\text{L}$ . Las determinaciones se realizaron a  $283 \text{ nm}$  (Vincenzetti *et al.*, 2020).

#### **2.5.3.4 Determinación de cobalamina**

Para la determinación de cobalamina se utilizó un kit comercial basado en un inmunoensayo enzimático «SENSISpec ELISA Vitamin B12» (Eurofins Technologies, Budapest, Hungría). Este ensayo consiste en la utilización de una microplaca de 96 pocillos que tiene adherida en su superficie un anticuerpo dirigido contra la vitamina B12 (Eurofins, 2020). Las muestras o patrones que contienen vitamina B12 y un conjugado de peroxidasa de vitamina B12 se introducen en los pocillos de la placa. La vitamina B12 marcada con la enzima y la vitamina libre compiten por los sitios de unión de anticuerpos. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavan con una solución de lavado (buffer PBS) diluida para eliminar el material no adherido. Luego se agrega una solución conteniendo sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y se incuba durante 20 minutos, lo que resulta en el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color se inhibe mediante la adición de una solución de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M), y el color se vuelve amarillo. El color amarillo se mide espectrofotométricamente a  $450 \text{ nm}$  en un lector de microplacas. Se utilizó un lector BioTek Synergy HT. La concentración de vitamina B12 es inversamente proporcional a la intensidad del color de la muestra. Para la preparación de la muestra, previamente se colocó  $1,0 \text{ mL}$  de ésta en un tubo cónico de polipropileno y se centrifugó durante  $10 \text{ min}$  a  $2000 g$ . La capa de grasa superior fue aspirada y descartada, y se realizó una toma de  $50 \text{ }\mu\text{L}$  de la capa acuosa remanente para colocar en los pocillos de la microplaca.

#### **2.5.3.5 Optimización de las condiciones de extracción de vitaminas**

Para la optimización de las condiciones de extracción se realizaron diseños factoriales multivariados (dos variables y dos niveles). Para cada uno de los tres procedimientos de extracción se ensayaron diferentes variables: temperatura y tiempo de saponificación (extracción conjunta de retinol,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol), tiempo de agitación y número de extracciones (extracción de ácido fólico), volumen de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y tiempo

de centrifugación (extracción de ácido ascórbico). La respuesta evaluada fue el porcentaje de recuperación %R comparándolo con los valores certificados del SRM correspondiente. Las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 3. Las condiciones seleccionadas fueron elegidas después de una revisión exhaustiva de la literatura científica existente sobre el tema, con el objetivo de encontrar las condiciones de tratamiento de muestras más simples, utilizando la menor cantidad posible de solventes y los tiempos de extracción más cortos que proporcionaran resultados cuantitativos de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde.

**Tabla 3. Condiciones experimentales utilizadas para cada diseño factorial 2<sup>2</sup>.**

| Experimento | Retinol, $\beta$ -caroteno, $\alpha$ -tocoferol |                                | Ácido fólico              |                        | Ácido ascórbico                                |                                |
|-------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
|             | Temperatura de saponificación (°C)              | Tiempo de saponificación (min) | Tiempo de agitación (min) | Número de extracciones | Volumen de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mL) | Tiempo de centrifugación (min) |
| 1           | 30                                              | 20                             | 5                         | 1                      | 1                                              | 10                             |
| 2           | 40                                              | 20                             | 10                        | 1                      | 2                                              | 10                             |
| 3           | 30                                              | 30                             | 5                         | 2                      | 1                                              | 15                             |
| 4           | 40                                              | 30                             | 10                        | 2                      | 2                                              | 15                             |

Utilizando SRM NIST 1849a.

#### 2.5.4 Análisis estadístico

La distribución normal de los datos obtenidos se verificó mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las diferencias entre las concentraciones de analitos en las muestras se probaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba *t* de Student. Además, se utilizó la prueba *t* de Student para comparar las medias experimentales obtenidas para el material de referencia estándar con los valores certificados correspondientes durante la evaluación de veracidad. Las diferencias entre las concentraciones medias a un nivel de significancia del 5 % ( $p < 0,05$ ) se consideraron estadísticamente significativas (Miller & Miller, 2010). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando MS Excel®.

# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se describen y discuten los principales resultados obtenidos a lo largo del trabajo de tesis, comparando contra reportes de la literatura internacional y resaltando la importancia de la información generada en cada caso.

#### 3.1 Determinación de macronutrientes

Previo al traslado de las muestras a Facultad de Química, se realizó la determinación del porcentaje de grasas, lactosa y proteínas en las mismas utilizando el equipo Lactoscan SP. Los resultados se resumen en la Tabla 4, estando en acuerdo con los reportes de Picciano (2001) para estos parámetros.

**Tabla 4. Resultados de macronutrientes en las muestras analizadas.**

| Parámetro | Calostro (% m/v) | Madura (% m/v) |
|-----------|------------------|----------------|
| Grasa     | 4,5 ± 1,1        | 7,0 ± 0,5      |
| Lactosa   | 8,5 ± 0,4        | 7,8 ± 0,5      |
| Proteínas | 1,7 ± 0,3        | 1,3 ± 0,2      |

Valores expresados como: promedio ± desviación estándar, n = 10 (calostro), n=30 (madura), crudas.

El contenido de grasa en la leche materna aumenta significativamente desde el calostro hasta la leche madura, y este contenido es esencial para proporcionar la energía y los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del bebé. El calostro tiene un contenido de grasa más bajo en comparación con la leche madura, el cual puede variar entre 2 – 5 % m/v. Es rico en proteínas, vitaminas, oligoelementos y anticuerpos, lo que es crucial para el recién nacido en términos de inmunidad y desarrollo. Por su parte, la leche madura tiene un contenido graso más alto que el calostro, generalmente entre 3,5 – 4,5 % m/v. Sin embargo, este contenido puede variar ampliamente dependiendo de varios factores como la dieta de la madre, el tiempo del día y la etapa de la alimentación (inicio, mitad o final de la toma). La leche madura es equilibrada en cuanto a grasas, proteínas y carbohidratos, proporcionando la nutrición necesaria para el crecimiento y desarrollo del bebé (Guo, 2014).

## 3.2 Determinación de metales, semimetales y no metales

### 3.2.1 Optimización y validación de los métodos analíticos para elementos esenciales

En esta etapa del trabajo, se evaluó el efecto de la pasteurización sobre los niveles de los elementos cobre, hierro, selenio, yodo y zinc. Para ello, fue necesaria la optimización y validación de los métodos analíticos correspondientes.

Es importante la composición de la llama en las determinaciones mediante FAAS, ya que de ésta dependerá el grado de atomización de los analitos. La mezcla aire (oxidante) – acetileno (combustible) permite alcanzar temperaturas entre 2100 – 2400 °C (Welz & Sperling, 1999). La composición de esta llama es lo suficientemente energética como para atomizar en forma eficiente los elementos cobre, hierro y zinc, permitiendo su determinación cuantitativa en las muestras de leche humana. En este trabajo se utilizaron las condiciones recomendadas por el software WinLab32, con llama acetileno (2,5 L min<sup>-1</sup>) – aire (10,0 L min<sup>-1</sup>), trabajando a las líneas de resonancia de cada elemento, las cuales condujeron a resultados cuantitativos, de acuerdo con la evaluación del SRM correspondiente.

Los métodos más comunes para la determinación de yodo se basan en la reacción de Sandell – Kolthoff (Sandel & Kolthoff, 1937). Sin embargo, las sustancias que interfieren con esta reacción suelen afectar el rendimiento analítico. En este sentido, se recomienda realizar una digestión previa de la muestra con ácido clórico, que, si bien proporciona una medición veraz, también genera fuga de cloro gaseoso y riesgos para el analista (Ohashi *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha reportado un método alternativo que utiliza digestión con persulfato de amonio el cual constituye un método no peligroso, no explosivo y fácil de usar (Pino *et al.*, 1996). La digestión con persulfato hace posible una determinación comparativamente no peligrosa, sin presencia de cloro gaseoso, por lo cual fue seleccionada en este trabajo, con el objetivo de alinearse en mejor medida a los principios de la Química Analítica Verde. Tratándose de un método de referencia con altísima aplicabilidad, no fue necesario realizar una gran optimización de las condiciones experimentales, sino apenas una adecuación al uso. Si se optimizó la concentración y el volumen de la disolución de

persulfato de amonio utilizada durante la digestión, de forma de obtener una extracción cuantitativa con extractos lípidos. El método de Sandell – Kolthoff se basa en el fuerte efecto catalítico del yoduro sobre la reacción entre el sulfato cérico y un exceso de ácido arsenioso en ácido sulfúrico diluido. Midiendo el efecto catalítico del yoduro sobre la reacción  $\text{Ce(IV)} + \text{As(III)} \rightarrow \text{As(V)} + \text{Ce(III)}$  se pueden determinar cuantitativamente el analito, debido a que este decolora la solución, inicialmente amarilla, en pocos minutos. De esta forma, la variación de color se puede monitorear espectrofotométricamente. Finalmente, luego de la construcción de una curva de calibración adecuada, y asumiendo que la actividad catalítica del yodo presente es directamente proporcional a su concentración en la muestra, se puede calcular dicha concentración.

La evaluación del desempeño de las extracciones se realizó mediante estudios de veracidad, comparando la concentración obtenida para cada analito con el método propuesto y la certificada en el material de referencia estándar. Esta comparación se expresó como porcentaje de recuperación R (%). Una vez optimizado el método analítico de extracción, se continuó con la etapa de validación. Los parámetros de desempeño evaluados fueron: linealidad, límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), precisión y veracidad, utilizando como referencia la Guía Eurachem de la Unión Europea (Eurachem, 2014). En la Tabla 5 se resumen los parámetros de desempeño de los métodos desarrollados para los elementos estudiados.

**Tabla 5. Parámetros de desempeño obtenidos para los elementos esenciales.**

| Parámetro                                      | Cu        | Fe        | I           | Se           | Zn        |
|------------------------------------------------|-----------|-----------|-------------|--------------|-----------|
| Rango lineal ( $\text{mg L}^{-1}$ )            | 0,010-2,0 | 0,018-1,0 | 0,002-0,600 | 0,0012-0,015 | 0,013-1,0 |
| LD ( $\text{mg L}^{-1}$ ) ( $3\sigma$ , n=10)  | 0,0030    | 0,0054    | 0,005       | 0,00036      | 0,0040    |
| LC ( $\text{mg L}^{-1}$ ) ( $10\sigma$ , n=10) | 0,010     | 0,018     | 0,002       | 0,0012       | 0,013     |
| Precisión (RSD%, n=6)                          | 2,5*      | 4,7*      | 5,2         | 7,3*         | 3,2*      |
| Veracidad (Rec%, n=6)                          | 101*      | 99*       | 99          | 98*          | 102*      |
| Técnica                                        | FAAS      | FAAS      | MAS         | HG-AAS       | FAAS      |

LD: Límite de Detección, LC: Límite de cuantificación.

\* Utilizando CRM NIST 1549a.

### 3.2.2 Optimización y validación de los métodos analíticos para elementos tóxicos

En esta segunda etapa del trabajo, se evaluó el efecto de la pasteurización sobre los niveles de los elementos arsénico y plomo. Para ello, fue necesaria la optimización y validación de los métodos analíticos involucrados.

Se seleccionó la técnica ETAAS para las determinaciones de As y Pb debido a los bajos niveles esperados de estos contaminantes en leche humana. Esta tecnología requiere el uso de modificadores químicos para disminuir la volatilización del analito y eliminar las interferencias de la fase gaseosa. Estos modificadores permiten la estabilización térmica de analitos volátiles, como los estudiados en este trabajo, permitiendo la aplicación de temperaturas de pirólisis más altas y así la conversión de interferencias de la matriz en especies más volátiles. En la literatura se han descrito muchos modificadores químicos para las determinaciones de As y Pb (Welz & Sperling, 1999).

El modificador de níquel ha sido ampliamente utilizado para las determinaciones de arsénico por ETAAS, sin embargo, no siempre produce resultados óptimos. En cambio, el modificador de paladio o paladio – magnesio permite el uso de temperaturas de pirólisis de hasta 1200 – 1400 °C y una temperatura de atomización óptima de hasta 2200 – 2500 °C, estabilizando especies de As tanto orgánicas como inorgánicas. En el caso del plomo, el modificador paladio – magnesio se ha aplicado exitosamente en una amplia variedad de muestras. Con este modificador se pueden emplear temperaturas de pirólisis de hasta 1100 – 1400 °C, lo cual permite la separación de especies concomitantes que pueden interferir en gran medida. El efecto estabilizador de este modificador también permite una temperatura de atomización relativamente alta de hasta 2000 °C (Machado *et al.*, 2016b; Tissot & Machado, 2020; Welz & Sperling, 1999).

Por lo tanto, se comenzó evaluando el modificador paladio – magnesio para ambos analitos en estudio, utilizando 5 µg de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 3 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Sin embargo, se observaron en ambos casos bajas recuperaciones al analizar el SRM. En segunda instancia se evaluó el modificador de paladio, utilizando 5 µg de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Este modificador fue muy eficiente para la determinación de arsénico, pero no para la determinación de plomo,

observándose nuevamente bajas recuperaciones. En este contexto, se decidió probar la mezcla paladio – ácido cítrico para las determinaciones de plomo, utilizando 27 µg de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  y 5 µg de ácido cítrico, de acuerdo con lo reportado por Turan *et al.* (2001), la cual resultó muy eficiente para este analito. El ácido cítrico actúa como un agente quelante, que puede formar complejos solubles con el plomo, lo cual ayuda a minimizar las pérdidas de analito y las interferencias químicas que podrían afectar la precisión de la medida. El paladio facilita la descomposición de la matriz de la muestra y la liberación del plomo en forma atómica, lo que resulta en señales más intensas y estrechas (Acar *et al.*, 1996). El uso del modificador de paladio – ácido cítrico puede aumentar la sensibilidad en la determinación de plomo al reducir las pérdidas durante el calentamiento y mejorar la eficiencia de la atomización; (Tsalev & Slaveykova, 1992). Una vez seleccionados los modificadores químicos se optimizaron exhaustivamente las temperaturas de pirólisis y atomización mediante la construcción de curvas de pirólisis/atomización en el rango 600 – 3000 °C, utilizando intervalos de 200 °C. Posteriormente, se realizó un ajuste fino que condujo a las condiciones descritas en previamente en la sección 2.5.2.1. No hubo diferencias significativas en las temperaturas óptimas de pirólisis utilizando las disoluciones estándar o las disoluciones de muestra, mientras que las temperaturas necesarias para alcanzar una atomización cuantitativa fueron las mismas para ambas disoluciones, lo cual demostró la ausencia de efectos matriz en las determinaciones.

La evaluación del desempeño de las extracciones se realizó mediante estudios de veracidad, comparando la concentración obtenida para cada analito con el método propuesto y la certificada en el material de referencia estándar. Esta comparación se expresó como R (%). Una vez optimizado el método analítico de extracción, se continuó con la etapa de validación. Los parámetros de desempeño evaluados fueron: rango lineal, LD y LC, precisión y veracidad, utilizando como referencia la Guía Eurachem de la Unión Europea (Eurachem, 2014). En la Tabla 6 se resumen los parámetros de desempeño de los métodos desarrollados para estos elementos.

**Tabla 6. Parámetros de desempeño obtenidos para los elementos tóxicos.**

| Parámetro                            | As           | Pb           |
|--------------------------------------|--------------|--------------|
| Rango lineal (mg L <sup>-1</sup> )   | 0,0012-0,030 | 0,0008-0,040 |
| LD (mg L <sup>-1</sup> ) (3σ, n=10)  | 0,00036      | 0,00024      |
| LC (mg L <sup>-1</sup> ) (10σ, n=10) | 0,0012       | 0,00080      |
| Precisión (RSD%, n=6)                | 7,3*         | 6,7*         |
| Veracidad (Rec%, n=6)                | 98*          | 97*          |
| Técnica                              | ETAAS        | ETAAS        |

LD: Límite de Detección, LC: Límite de cuantificación.

\* Utilizando CRM NIST 1549a.

### 3.2.3 Determinaciones de elementos esenciales en leche humana donada

Luego de las validaciones correspondientes, se analizaron muestras proporcionadas por el Banco de leche humana. Se ha generado, hasta el momento, una base de datos conteniendo las concentraciones de los analitos en estudio en 40 madres (10 calostros y 30 leches maduras), antes y después de la pasteurización.

En la Tabla 7 se presentan las concentraciones promedio obtenidas para cada uno de los analitos evaluados, separadas por calostro y leche madura, así como el porcentaje de pérdida luego de la pasteurización.

**Tabla 7. Concentraciones obtenidas para los analitos en las muestras crudas (C) y pasteurizadas (P).**

| Analito | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) |                 | Pérdida promedio (%) | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) |                 | Pérdida promedio (%) |
|---------|-------------------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------------|
|         | Calostro (C)                        | Calostro (P)    |                      | Madura (C)                          | Madura (P)      |                      |
| Cu      | 0,45 ± 0,12                         | 0,44 ± 0,10     | 2,2                  | 0,40 ± 0,10                         | 0,39 ± 0,09     | 2,5                  |
| Fe      | 2,5 ± 0,2                           | 2,4 ± 0,8       | 4,0                  | 1,9 ± 0,8                           | 1,8 ± 0,8       | 5,2                  |
| I       | 0,1962 ± 0,005                      | 0,1866 ± 0,0042 | 4,8                  | 0,1543 ± 0,0117                     | 0,1479 ± 0,0104 | 4,1                  |
| Se      | 0,0164 ± 0,0017                     | 0,0146 ± 0,0016 | <b>10,4*</b>         | 0,0132 ± 0,0016                     | 0,0121 ± 0,0015 | <b>8,8*</b>          |
| Zn      | 6,2 ± 1,1                           | 6,1 ± 0,9       | 1,6                  | 4,5 ± 0,9                           | 4,4 ± 0,9       | 2,2                  |

Valores expresados como: promedio ± desviación estándar, n = 10 (calostro), n=30 (madura).

Pérdida (%) = [(Concentración (C) – Concentración (P)) / Concentración (C)] × 100.

\*Pérdidas estadísticamente significativas según la prueba *t* de Student (*p*<0,05).

Los valores obtenidos para cobre, hierro y zinc se encontraron dentro lo reportado por Alves Peixoto *et al.* (2019) y Picciano (2001) quienes analizaron muestras de leche

humana, que, si bien no pertenecen a madres uruguayas, sirven como valores de referencia. En lo que respecta a estos elementos, generalmente se acepta que el lactante se encuentra bien protegido por los procesos homeostáticos maternos (Almeida *et al.*, 2008). La glándula mamaria parece haber desarrollado mecanismos para regular las concentraciones de estos elementos en la leche con el fin de realizar un suministro adecuado al lactante independientemente del estado materno (Lönnerdal, 2000). Se supone que el paso de estos oligoelementos de la sangre a la leche no se produce por difusión pasiva sino por transporte regulado a través del epitelio de la glándula mamaria. Por lo tanto, no se esperan correlaciones positivas entre los niveles en la sangre y la leche materna (Domellöf *et al.* 2004).

En cuanto a las determinaciones de selenio, los valores obtenidos concuerdan con los niveles reportados por Mazej *et al.* (2004) para madres provenientes de varios países europeos, así como con los niveles reportados por Alves Peixoto *et al.* (2019) para madres brasileñas y Torres *et al.* (1999) para madres españolas. Al igual que para los otros oligoelementos, los niveles de selenio fueron mayores en el calostro respecto a la leche madura. De acuerdo con Picciano (2001), la concentración de selenio es mayor al inicio de la lactancia (0,010 a 0,040 mg L<sup>-1</sup>), asociada con varias fracciones de proteínas, mientras que los valores medios en la leche maduras son ligeramente más bajos (0,007 – 0,030 mg L<sup>-1</sup>), presentando gran variabilidad en ambas etapas dependiendo de la distribución geográfica y de la dieta materna (Alves Peixoto *et al.*, 2019).

El yodo en la leche humana se encuentra predominantemente en forma de yoduro, que constituye la forma de yodo más comúnmente transportada en los fluidos corporales. Esta forma es fácilmente absorbida por el cuerpo del lactante y es crucial para el desarrollo adecuado del cerebro y del sistema nervioso. Asimismo, una pequeña fracción del yodo total puede encontrarse unido a proteínas y lípidos en la leche. Sin embargo, el yoduro es la forma mayoritaria y más biodisponible de yodo en la leche humana (Guo, 2014). El yodo en la leche humana varía ampliamente según la región geográfica y la ingesta materna. En áreas donde prevalecen los trastornos por deficiencia de yodo, el contenido en la leche humana es de aproximadamente 15 µg L<sup>-1</sup> y en áreas con suficiente yodo, de

aproximadamente  $150 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores obtenidos en este trabajo se encontraron dentro de lo reportado por Chen *et al.* (2020) para madres chinas y Fernández-Sánchez *et al.* (2007) para madres españolas, que, si bien no pertenecen a madres uruguayas, son de utilidad como valores de referencia. Se considera que valores en el rango  $100 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$  cumplen con la suficiencia de yodo. Por lo tanto, las medias obtenidas de  $196,2 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $154,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , para calostro y leche madura, respectivamente, se corresponderían con madres con suficiencia de este elemento. De igual forma, se observó un descenso significativo de los niveles entre el calostro y la leche madura, lo cual está de acuerdo con la literatura, ya que se pueden esperar pérdidas de hasta un 50 % en un período de aproximadamente 6 meses (Chen *et al.* 2020).

En base a diversas publicaciones se ha podido constatar que todos los oligoelementos estudiados, con excepción del cobre, se encontrarían en concentraciones más bajas en la leche madura (Almeida *et al.*, 2008; Leotsinidis *et al.*, 2005; Mazej *et al.*, 2004; Rossipal & Krachler, 1998; Yamawaki *et al.*, 2005). La concentración de cobre parecería estar influenciada por el tabaquismo, siendo mayor en los no fumadores (Leotsinidis *et al.*, 2005). Asimismo, todos los elementos estudiados mostraron una tendencia a la disminución de la concentración en la leche durante el primer mes de lactancia. Esta tendencia fue más pronunciada para selenio y zinc, cuyos niveles disminuyeron a aproximadamente 23 % y 44 % de sus concentraciones medias iniciales, respectivamente (Almeida *et al.*, 2008). En este trabajo de tesis, el descenso más pronunciado al pasar de calostro a leche madura fue para el zinc, equivalente al 27 %. Asimismo, Rossipal & Krachler (1998) también informaron la ocurrencia de cambios en la concentración de los oligoelementos estudiados en la leche humana en diferentes etapas de la lactancia, destacando una disminución en la concentración durante el curso de ésta.

La disminución de la concentración de oligoelementos en la leche humana durante el curso de la lactancia se ha considerado consecuencia de una disminución de la capacidad de unión de la leche, debido a la disminución de la concentración de proteínas y otros ligandos (Rossipal & Krachler, 1998). En la leche humana, los oligoelementos están unidos principalmente a proteínas, y las proteínas principales de la leche disminuyen durante el

primer mes de lactancia. La regulación de la homeostasis de los oligoelementos en la leche humana ha sido bastante estudiada, evaluando los procesos moleculares mediante los cuales la glándula mamaria regula el transporte de oligoelementos a la leche. Estos mecanismos incluyen la captación de metales en las células epiteliales mamarias secretoras y su posterior secreción en la luz alveolar de la glándula mamaria para su secuestro en la leche (Kelleher & Lönnerdal, 2005). Mediante el uso de modelos animales, estos autores encontraron evidencia experimental de que los cambios temporales en las concentraciones de cobre, hierro y zinc en la leche están regulados mediante cambios coordinados en la expresión genética, los niveles de proteínas y la localización de varios transportadores específicos (Kelleher & Lönnerdal, 2005).

La información obtenida en esta etapa, en cuanto a composición y variabilidad de oligoelementos en la leche de madres donantes, es de gran relevancia ya que los principales demandantes del servicio del BLH-CHPR son recién nacidos prematuros y vulnerables. Contar con esta información es muy importante puesto que la leche humana es potencialmente modificable siendo la intervención factible tanto por modificación de la dieta materna (Allen, 2012), como mediante la fortificación con multicomponentes (Moro *et al.*, 2015). En el primer caso para cualquiera de las madres que estuvieran amamantando, y en el segundo caso considerando a los bebés prematuros ya que la leche materna no fortificada no les proporciona cantidades suficientes de nutrimentos cuando se los alimenta con los volúmenes de alimentación habituales (Arslanoglu *et al.*, 2019). Asimismo, la información generada en este trabajo permite tener datos sobre la composición de oligoelementos en la leche humana en Uruguay. Si bien existe proficua información a nivel internacional es necesario considerar los múltiples factores que influyen en la composición de la leche materna, entre ellos la geográfica, que algunos investigadores consideran la más determinante (Zhang, 2014). Es cierto que las madres donantes al BLH-CHPR poseen un sesgo estadístico considerable, pues son madres con excedentes en su producción de leche y seguramente con un estado nutricional adecuado, y no representan adecuadamente a la media de las madres uruguayas. Pero ante una carencia total de datos, esta iniciativa constituye un buen comienzo para la consecución de datos con mayor representatividad.

### 3.2.4 Evaluación de las pérdidas de oligoelementos luego de la pasteurización

En lo que respecta a las determinaciones de cobre, hierro y zinc no se observaron pérdidas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para estos elementos luego de la pasteurización, tal como fuera previamente reportado por Alves Peixoto *et al.* (2019), lo cual es muy importante, debido a las innumerables funciones biológicas previamente mencionadas, como la producción de enzimas y la regulación del crecimiento. Es importante señalar que, si bien la concentración total de estos oligoelementos no varió luego de la pasteurización, no significa que las propiedades nutricionales de la leche humana donada se mantuvieron inalteradas, puesto que la biodisponibilidad de estos elementos está profundamente relacionada con sus especies químicas. En particular, en el caso de la leche materna humana, algunos elementos esenciales se encuentran principalmente asociados a la fracción proteica de la leche y las proteínas son propensas a la desnaturalización con el aumento de la temperatura (Alves Peixoto *et al.*, 2019).

En el caso del yodo tampoco se observaron pérdidas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) luego de la pasteurización, lo cual es muy importante debido a sus innumerables funciones biológicas. Estos datos están de acuerdo con los reportados por Walther *et al.* (2018) para leche vacuna. La pasteurización Holder presenta efectos mínimos sobre la estabilidad del yodo en la leche, no generando pérdidas significativas luego del tratamiento (Guo, 2014). Para los bebés amamantados exclusivamente, la leche materna es la única fuente de yodo. Por lo tanto, una concentración óptima en la leche es esencial para que el bebé sintetice hormonas tiroideas y mantenga un desarrollo físico y neurológico normal.

En lo que respecta a las determinaciones de selenio, se encontraron pérdidas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), si bien bajas, del 10,8 % para el calostro y del 8,8 % para la leche madura, lo cual concuerda con los reportes de Da Costa *et al.* (2003). A pesar de estas pérdidas, los niveles serían aptos para los requerimientos del lactante de acuerdo con los niveles de referencia internacionales (NIH, 2024). Las pérdidas de selenio en la leche luego de la pasteurización pueden deberse a varios factores. En primer lugar, por sensibilidad al calor. Si bien el selenio es generalmente estable, el proceso de pasteurización Holder puede afectar su forma química en la leche y su volatilidad. En segundo lugar, la

exposición al oxígeno durante la pasteurización puede contribuir a la pérdida del elemento, especialmente si se encuentra en formas orgánicas sensibles a la oxidación. En tercer lugar, puede ocurrir la adsorción del elemento sobre la superficie del recipiente contenedor. Finalmente, el selenio en la leche humana se encuentra asociado a proteínas, como la selenoproteína, cuyas estructuras pueden verse afectadas por el tratamiento térmico, afectando la capacidad de retención de selenio. Esto a su vez puede afectar la biodisponibilidad del oligoelemento (Cole, 2021; Guo, 2014).

En lo que respecta a las pérdidas por pasteurización a nivel internacional, de acuerdo con Mohd-Taufek *et al.* (2016) la pasteurización tuvo un efecto mínimo en varios oligoelementos como cobre, hierro, iodo, selenio y zinc en la leche de las madres donantes. Sin embargo, Codo *et al.* (2018) observaron una reducción significativa en los niveles de otros elementos no abordados en esta tesis, luego de la pasteurización, tales como calcio, fósforo y potasio, lo cual justifica la importancia de realizar este tipo de monitoreos.

Es importante destacar que, a pesar de las pérdidas debidas a la pasteurización observadas para el selenio, los niveles de todos los oligoelementos son adecuados y se encuentran en el rango de valores reportados en otros estudios. De hecho, los resultados obtenidos se encuentran dentro, o incluso por encima, de los rangos reportados por Kim & Yi (2020), quienes recopilaron datos de la literatura internacional. Las ingestas adecuadas para los elementos evaluados son: 0,2 mg/día (0 – 6 meses) y 0,22 mg/día (6 – 12 meses) (cobre), 0,27 mg/día (0 – 6 meses) y 11 mg/día (6 – 12 meses) (hierro), 0,11 mg/día (0 – 6 meses) y 0,13 mg/día (6 – 12 meses) (iodo), 0,015 mg/día (0 – 6 meses) y 0,020 mg/día (6 – 12 meses) (selenio), 2 mg/día (0 – 6 meses) y 3 mg/día (6 – 12 meses) (zinc) (NIH, 2024). En este sentido, considerando un consumo diario de calostro en el rango de 40 a 300 mL y un consumo diario de leche madura en el rango 600 a 1000 mL, podría decirse que la leche donada por el BLH-CHPR estaría aportando las cantidades necesarias de los mencionados oligoelementos, aún a pesar de las pérdidas observadas para el selenio. Cabe destacar que, entre los 6 y 12 meses, la dieta se complementa con alimentos sólidos.

### 3.2.5 Determinaciones de elementos tóxicos en leche humana donada

Luego de las validaciones correspondientes, se analizaron las mismas 40 muestras proporcionadas por el Banco de Leche Humana analizadas en la etapa anterior. En la Tabla 8 se presentan las concentraciones promedio obtenidas para cada uno de los analitos evaluados, separadas por calostro y leche madura, así como el porcentaje de pérdida luego de la pasteurización. En ambos casos se pudo aplicar exitosamente la técnica ETAAS, la cual ofrece una combinación de relativamente alta sensibilidad, especificidad, eficiencia, y costo-efectividad, que la convierte en una técnica adecuada para la determinación de trazas de contaminantes inorgánicos en una variedad de matrices biológicas.

**Tabla 8. Concentraciones obtenidas para los elementos tóxicos en las muestras crudas (C) y pasteurizadas (P).**

| Analito | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) |                 | Pérdida promedio (%) | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) |                 | Pérdida promedio (%) |
|---------|-------------------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------------|
|         | Calostro (C)                        | Calostro (P)    |                      | Madura (C)                          | Madura (P)      |                      |
| As      | 0,0042 ± 0,0004                     | 0,0041 ± 0,0005 | 1,7                  | 0,0036 ± 0,0004                     | 0,0034 ± 0,0006 | 4,1                  |
| Pb      | 0,0030 ± 0,0007                     | 0,0029 ± 0,0002 | 3,3                  | 0,0020 ± 0,0002                     | 0,0020 ± 0,0003 | 0,3                  |

Valores expresados como: promedio ± desviación estándar, n = 10 (calostro), n=30 (madura).

Pérdida (%) = [(Concentración (C) – Concentración (P)) / Concentración (C)] × 100.

Las pérdidas no son estadísticamente significativas según la prueba t de Student (p<0,05).

Todas las muestras analizadas presentaron valores de concentración de plomo por debajo del límite máximo aceptado por la Organización Mundial de la Salud de 0,005 mg L<sup>-1</sup>, si bien no existe un nivel de exposición seguro (Bartmess, 1990). Los niveles obtenidos están de acuerdo con los niveles reportados para madres noruegas por Vollset *et al.* (2019) y para madres turcas por Turan *et al.* (2001) y Kirel *et al.* (2005). Estos resultados son muy valiosos y se consideran como información novedosa para nuestro país, ya que no hay reportes en la literatura disponible sobre leche humana, constituyendo los primeros datos en madres uruguayas. Este elemento afecta la calidad de la leche y puede generar un riesgo para la salud de los lactantes. Garantizar la inocuidad del alimento con respecto a este elemento, es primordial, debido a los riesgos asociados con el desarrollo a largo plazo de ciertas patologías en humanos.

A nivel mundial las concentraciones de plomo en la leche humana varían en rangos muy amplios. Estas grandes variaciones en los niveles de plomo pueden deberse a condiciones ambientales, geográficas, nutricionales, ocupacionales y hábitos individuales, incluidos los cosméticos utilizados. Se ha informado que la exposición prolongada de una madre a ambientes contaminados provoca la movilización de plomo desde las reservas esqueléticas (Gulson *et al.*, 1998). Sin embargo, como el plomo tiene propiedades de unión a proteínas, las concentraciones de plomo en sangre son más altas que las de la leche materna (Koyashiki *et al.*, 2010). Por lo tanto, se recomienda continuar con la lactancia materna en los casos de madres cuyos niveles de plomo en sangre se encuentren por debajo de  $40 \mu\text{g dL}^{-1}$  (CDC, 2024). Suponiendo que la ingesta diaria de leche de un lactante es de 750 mL y considerando las concentraciones promedio de plomo obtenidas en el presente estudio, los lactantes estuvieron expuestos a un promedio de  $2,25 \mu\text{g Pb/día}$ , lo que equivale a  $15,75 \mu\text{g Pb/semana}$ . Estos valores se encuentran por debajo de la ingesta semanal tolerable permitida de plomo de  $25 \mu\text{g/kg-peso corporal/semana}$  aceptada antiguamente por la OMS, si bien en la actualidad se concluyó que no puede establecerse un nivel seguro de exposición a plomo y se reconoció que cualquier exposición a este elemento debe ser lo más baja posible debido a sus efectos perjudiciales acumulativos y su impacto significativo en la salud, especialmente de los niños (Comisión de *Codex Alimentarius*, 2019).

En cuanto a las determinaciones de arsénico, los niveles promedio encontrados en las muestras analizadas se encontraron por debajo de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estos resultados estuvieron de acuerdo con los datos de la literatura internacional. A modo de ejemplo, Concha *et al.* (1998) informaron un rango para As de  $0,83 - 7,6 \mu\text{g L}^{-1}$  en leche humana. Asimismo, en un estudio realizado en Bangladesh se obtuvieron niveles de As en el rango  $0,25 - 19 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fangstrom *et al.*, 2008). Todas las muestras analizadas en este trabajo presentaron valores de concentración de As muy por debajo del límite máximo recomendado por la OMS de  $15 \mu\text{g/kg-peso corporal/semana}$ , considerando las condiciones normales de consumo y peso corporal de lactantes típicos durante la primera semana de vida (Bhattacharya *et al.*, 2012). Cabe destacar que los niveles de arsénico fueron mayores en el calostro respecto a la leche

madura. Estos resultados son muy valiosos y se consideran como información novedosa para nuestro país, ya que no hay reportes en la literatura disponible sobre leche humana, constituyendo los primeros datos en madres uruguayas. La presencia de este elemento afecta la calidad de la leche y puede generar un riesgo para la salud de los lactantes. Se ha reportado que los metales pesados en la leche materna representan alrededor del 20 % del nivel que se encuentra en la sangre de la misma madre, debido a la baja solubilidad en lípidos y la alta unión a eritrocitos. En consecuencia, es probable que los lactantes se vean expuestos a niveles más altos de estos elementos antes del nacimiento que durante la lactancia propiamente dicha. De todas formas, es primordial garantizar la inocuidad del alimento con respecto a estos contaminantes debido a los riesgos asociados con el desarrollo de patologías a largo plazo. Asimismo, se debe limitar la ingesta de alimentos contaminados por parte de la madre en lugar de restringir la lactancia materna (Gürbay *et al.*, 2012).

### **3.2.6 Desarrollo y evaluación del método multielemento**

Con el fin de contar con un método multielemento más alineado con los principios de la Química Analítica Verde, que fuera eficiente para el monitoreo del contenido de los elementos de interés en leche humana, se optimizó y validó un método analítico secuencial utilizando la técnica MP-AES. En los comienzos de esta tesis no se contaba con la mencionada tecnología, la cual fue adquirida por Facultad de Química en el año 2019, gracias a un proyecto CSIC de fortalecimiento del equipamiento para investigación. Se trata de una tecnología novedosa y ecológica, aún poco difundida, por lo cual se consideró de interés para incorporar en el trabajo experimental. Cabe destacar que esta técnica fue reportada como una herramienta para realizar determinaciones elementales en leche humana, por primera vez en este trabajo de tesis, poniendo de manifiesto la novedad del trabajo creativo en este sentido.

En general, las técnicas de determinación basadas en espectrometría de absorción atómica son ampliamente utilizadas para el análisis cuantitativo de metales y semimetales. Estas se basan en detectar la energía absorbida o emitida por los átomos, previamente aislados tras un proceso de atomización, al ser irradiados por energía. La energía absorbida

es característica para cada ion presente en una determinada muestra. Sin embargo, estos métodos pueden presentar problemas de baja sensibilidad, mala reproducibilidad de los resultados e interferencias químicas, al tiempo que presentan la gran desventaja de ser monoelementales. Actualmente, las técnicas más utilizadas para determinaciones elementales son ICP-OES e ICP-MS que, a pesar de su gran poder, tienen como desventaja un alto costo operativo. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, es que se decidió buscar una herramienta alternativa, lo cual condujo a la optimización y validación de un nuevo método bioanalítico basado en la técnica MP-AES.

Los elementos inorgánicos a nivel de trazas pueden ser determinados en diversas matrices mediante varios métodos, que consisten generalmente en una digestión asistida por microondas utilizando ácidos minerales y la posterior determinación mediante alguna técnica de espectrometría atómica. Es importante destacar que una tendencia en Química Analítica es evitar tratamientos drásticos y buscar procedimientos de extracción eficientes que utilicen condiciones suaves, de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde (Machado *et al.*, 2016). En este contexto, se debe destacar el actual resurgimiento con varias mejoras de la técnica MP-AES, la cual emplea el concepto de “funcionamiento con aire”, trabajando con un plasma de nitrógeno que opera a alrededor de 5000 K, lo que resulta en un ahorro de costos y en la eliminación de cilindros de gases caros e inflamables del laboratorio (São Bernardo Carvalho *et al.*, 2020; Williams *et al.*, 2019). Esta alta temperatura del plasma proporciona una tolerancia de matriz de muestra más alta, límites de detección más bajos y un rango de concentración de trabajo ampliado, si se compara con la técnica FAAS. Sin embargo, no es la primera opción para la determinación de elementos a nivel de trazas, ya que los límites de detección no son tan bajos como los que se logran con otras técnicas como ETAAS o ICP-MS (Balaram, 2020; Pistón *et al.*, 2020). Sin embargo, se demostró en el marco de este trabajo por primera vez, que la técnica MP-AES puede utilizarse como una herramienta eficiente y confiable para realizar análisis elemental de arsénico, cobre, hierro, plomo, selenio y zinc en leche humana.

Una de las ventajas de utilizar MP-AES es el reducido número de variables instrumentales que se deben optimizar, como la velocidad de la bomba, el flujo de

nitrógeno, la posición de visualización, la línea espectral y el tiempo de lectura. El tiempo de estabilización también puede ser un parámetro crítico cuando se trabaja con elementos volátiles. Sin embargo, el software es capaz de realizar un screening para establecer las mejores condiciones analíticas para cada caso particular. La tasa de atomización y la intensidad de las emisiones dependen en gran medida de los parámetros antes mencionados (Jung *et al.*, 2019).

En este trabajo se evaluaron minuciosamente la velocidad de la bomba, el flujo de nitrógeno y la posición de observación como parte de la optimización del método. No se evaluaron líneas espectrales ya que fue posible utilizar las líneas recomendadas de mayor intensidad sin interferencias significativas de líneas vecinas de otros elementos. Esto se ejemplifica en la Figura 13 donde una captura del software MP Expert proporciona las posibles interferencias espectrales para la línea analítica de cobre a 324,754 nm. Aunque el hierro podría considerarse una interferencia potencial, su intensidad sería demasiado baja en comparación con la intensidad del cobre. De este modo, las líneas analíticas se pueden seleccionar fácilmente con la ayuda de las herramientas de software.

| Symbol | Wavelength (nm) | Ion | Intensity |
|--------|-----------------|-----|-----------|
| Sm     | 324.469         | II  | 538.2     |
| La     | 324.513         | II  | 8590.1    |
| Tb     | 324.517         | II  | 450.3     |
| Pr     | 324.548         | II  | 107.7     |
| Tm     | 324.586         | II  | 108.0     |
| Fe     | 324.596         | I   | 27.0      |
| Fe     | 324.696         | I   | 9.8       |
| Eu     | 324.732         | II  | 1588.6    |
| Tm     | 324.746         | II  | 223.0     |
| Nb     | 324.747         | II  | 152.9     |
| Cu     | 324.754         | I   | 477458.5  |
| Hf     | 324.766         | I   | 821.5     |
| Fe     | 324.820         | I   | 17.9      |
| Ti     | 324.860         | II  | 5629.4    |
| Nb     | 324.894         | II  | 130.0     |
| Er     | 324.934         | II  | 2351.9    |

**Figura 13. Línea analítica del cobre y potenciales interferencias espectrales. Extraído de: Software MP Expert.**

Para evaluar las condiciones analíticas óptimas para cada elemento se utilizó una solución estándar de 20 mg L<sup>-1</sup> de cada elemento en estudio. Las señales máximas para cada elemento se lograron con los flujos de nitrógeno y las posiciones de visualización previamente descritos en la Tabla 2. También se evaluó para cada elemento el efecto de la velocidad de la bomba sobre la sensibilidad analítica (pendiente de la curva de calibración) y los resultados se presentan en la Tabla 9 para cobre, hierro y zinc. La velocidad de la bomba se evaluó a 15, 30 y 45 rpm (correspondientes a flujos de 0,45, 0,90 y 1,35 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente), siendo el R<sup>2</sup> de cada curva de calibración superior a 0,99 para todos los elementos estudiados. Se pudo observar una mejora en la sensibilidad para todos los elementos a 30 rpm, por lo que se seleccionó esta velocidad de bomba como velocidad de trabajo. En resumen, gracias a estos pasos de optimización, y considerando que todas las determinaciones se realizan de forma secuencial, cada analito se determinó en condiciones optimizadas en lugar de condiciones de adquisición comprometidas.

**Tabla 9. Efecto de la velocidad de la bomba sobre la sensibilidad analítica.**

| Velocidad de la bomba (rpm) | Cu        | Fe      | Zn       |
|-----------------------------|-----------|---------|----------|
| 15                          | 105229,78 | 6435,70 | 15443,70 |
| 30                          | 118256,40 | 8743,19 | 18484,64 |
| 45                          | 111219,29 | 7650,80 | 16356,98 |

El método analítico para la determinación de arsénico, cobre, hierro, plomo, selenio y zinc mediante MP-AES o HG-MP-AES fue validado siguiendo las recomendaciones de la guía Eurachem (Eurachem, 2014). Se realizó la validación utilizando calibración directa. Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron cinco niveles de concentración. La linealidad se verificó en un rango adecuado para esta aplicación hasta 20,0 mg L<sup>-1</sup>, utilizando la prueba de bondad de ajuste (Miller & Miller, 2010). Para todas las funciones de calibración, el valor del coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) fue superior a 0,999. Para la evaluación de la veracidad, se realizó una prueba *t* de Student para comparar el valor obtenido con el valor certificado de concentración del SRM. El valor *t*<sub>experimental</sub> se encontró por debajo del *t* (0,05; 5) = 2,57, lo cual indicó que a un nivel de confianza del 95 %, la

concentración obtenida no difería significativamente del valor certificado (Miller & Miller, 2010). La recuperación promedio fue de 98 %. La precisión fue estimada como repetibilidad y expresada como RSD para el análisis del SRM (n = 6). Esta fue menor al 5 %, la cual se consideró adecuada para esta aplicación, considerando que las determinaciones analíticas se realizaron a niveles de trazas. Los resultados de veracidad y precisión confirmaron entonces la exactitud de los resultados obtenidos. De manera de estimar los límites de detección y cuantificación, se utilizaron los criterios establecidos por la guía Eurachem, a saber, 3s y 10s, siendo “s” la desviación estándar del blanco (Eurachem, 2014). Los límites resultaron ser adecuados para el objetivo de este trabajo, estando el LC al menos dos veces por debajo del menor valor obtenido en las muestras, suficiente para poder cuantificar todos los elementos con un nivel de confianza adecuado.

En suma, este método puede ser considerado como una alternativa confiable para realizar estudios de tipo elemental sobre leche materna. Además, la técnica MP-AES presenta varias ventajas sobre otras técnicas de espectrometría atómica ampliamente utilizadas, como se mencionó anteriormente.

En la Tabla 10 se resumen las cifras de mérito obtenidas durante la validación del método.

**Tabla 10. Cifra de mérito obtenidas luego de la validación del método mediante MP-AES**

| Analito                                  | As          | Cu          | Fe         | Pb          | Se          | Zn         |
|------------------------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|
| Rango lineal<br>(mg L <sup>-1</sup> )    | 0,0030-20,0 | 0,0035-20,0 | 0,007-20,0 | 0,0048-20,0 | 0,0039-20,0 | 0,014-20,0 |
| LD (mg L <sup>-1</sup> )<br>(3s, n=10)   | 0,0009      | 0,0011      | 0,0021     | 0,00046     | 0,00097     | 0,0042     |
| LC (mg Lg <sup>-1</sup> )<br>(10s, n=10) | 0,0030      | 0,0035      | 0,0070     | 0,0015      | 0,0032      | 0,0141     |
| Precisión<br>(%RSD, n=6) *               | 8,7         | 5,8         | 6,1        | 5,9         | 7,2         | 4,7        |
| Veracidad<br>(%R, n=6) *                 | 98          | 98          | 99         | 101         | 99          | 102        |
| <i>t</i> experimental                    | 1,45        | 2,37        | 0,40       | 1,29        | 2,03        | 2,19       |
| <i>t</i> (0,05, 5)                       | 2,57        | 2,57        | 2,57       | 2,57        | 2,57        | 2,57       |

\*SRM NIST 1849.

### 3.2.7 Comparación contra método multielemento mediante MP-AES

Se llevó a cabo una comparación estadística entre los métodos desarrollados inicialmente y el método mediante MP-AES, excepto para yodo, ya que no es compatible con esta técnica. Para ello, se empleó la prueba  $t$  de Student de comparación de medias (Miller y Miller, 2010). En el caso de cobre, hierro y zinc la comparación fue contra FAAS, en el caso de arsénico y plomo la comparación fue contra ETAAS, mientras que en el caso de selenio la comparación fue contra HG-AAS. El experimento se realizó para diez muestras de calostro y diez muestras de leche madura. En la Tabla 11 se muestran los resultados de la comparación estadística para cada elemento. Todos los valores  $t_{experimental}$  fueron menores al respectivo valor  $t(0,05, 9) = 2,26$ . Por lo tanto, se pudo concluir que a un nivel de significancia del 95 %, los resultados obtenidos utilizando los métodos desarrollados inicialmente y el correspondiente método mediante MP-AES eran estadísticamente equivalentes. De esta forma, se logró el desarrollo de un método alternativo multielemento de alta eficiencia, que proporciona resultados confiables y que se encuentra más alineado con los principios de la Química Analítica Verde respecto a los métodos iniciales.

**Tabla 11. Comparación estadística contra método basado en MP-AES.**

| Elemento | Técnica   | Promedio $\pm$ DE (mg L <sup>-1</sup> ) |                     | $t_{experimental}$ |        | $t(0,05, 9)$ |
|----------|-----------|-----------------------------------------|---------------------|--------------------|--------|--------------|
|          |           | Calostro                                | Madura              | Calostro           | Madura |              |
| As       | ETAAS     | 0,0044 $\pm$ 0,0005                     | 0,0035 $\pm$ 0,006  | 1,28               | 1,07   | 2,26         |
|          | MP-AES    | 0,0042 $\pm$ 0,0004                     | 0,0036 $\pm$ 0,005  |                    |        |              |
| Cu       | FAAS      | 0,45 $\pm$ 0,12                         | 0,42 $\pm$ 0,14     | 1,07               | 0,93   | 2,26         |
|          | MP-AES    | 0,47 $\pm$ 0,10                         | 0,42 $\pm$ 0,10     |                    |        |              |
| Fe       | FAAS      | 2,4 $\pm$ 0,2                           | 1,5 $\pm$ 0,9       | 0,28               | 0,37   | 2,26         |
|          | MP-AES    | 2,4 $\pm$ 0,4                           | 1,6 $\pm$ 0,7       |                    |        |              |
| Pb       | ETAAS     | 0,0030 $\pm$ 0,0007                     | 0,0022 $\pm$ 0,0006 | 1,31               | 1,47   | 2,26         |
|          | MP-AES    | 0,0032 $\pm$ 0,0005                     | 0,0021 $\pm$ 0,0003 |                    |        |              |
| Se       | HG-AAS    | 0,0164 $\pm$ 0,0017                     | 0,0138 $\pm$ 0,0019 | 1,44               | 1,59   | 2,26         |
|          | HG-MP-AES | 0,0159 $\pm$ 0,0016                     | 0,0135 $\pm$ 0,0015 |                    |        |              |
| Zn       | FAAS      | 6,2 $\pm$ 1,1                           | 4,2 $\pm$ 0,7       | 0,34               | 0,55   | 2,26         |
|          | MP-AES    | 6,4 $\pm$ 1,0                           | 4,1 $\pm$ 0,8       |                    |        |              |

En la Tabla 12 se muestra una comparación de los límites de detección obtenidos en este trabajo, con los límites reportados por otros autores luego del análisis utilizando diversas técnicas. En primer lugar, cabe destacar que los valores de LD obtenidos en este trabajo, tanto por los métodos iniciales como por el método mediante MP-AES, son del mismo orden. Asimismo, como se puede observar en la Tabla 12, los valores de LD obtenidos utilizando FAAS son del mismo orden que los reportados por Luo *et al.* (2010) para cobre, hierro y zinc, mientras que los LD utilizando ETAAS son un orden menor que los reportados por Gürbay *et al.* (2012) para arsénico y plomo. El caso donde se pueden apreciar importantes mejoras respecto a los LD obtenidos en este trabajo, como era de esperarse, es al comparar contra los resultados de Almeida *et al.* (2008) mediante ICP-MS, los cuales fueron un orden menor para todos los analitos en estudio. Como se comentó anteriormente, ICP-MS es una tecnología muy poderosa en lo que se refiere a la detectabilidad. Sin embargo, los LD obtenidos en este trabajo son más que suficientes para los objetivos del trabajo, siendo ésta una técnica muy económica y amigable con el ambiente como se comentara anteriormente.

**Tabla 12. Comparación de los límites de detección de varios métodos espectrométricos para la determinación de los elementos estudiados.**

| Técnica    | Muestra      | LD (mg L <sup>-1</sup> ) |         |        |         |         |         | Referencia                         |
|------------|--------------|--------------------------|---------|--------|---------|---------|---------|------------------------------------|
|            |              | As                       | Cu      | Fe     | Pb      | Se      | Zn      |                                    |
| ICP-MS     | Leche humana | 0,00001                  | 0,00011 | -      | 0,00003 | 0,00020 | 0,00021 | Almeida <i>et al.</i> , 2008       |
| ICP-MS     | Leche humana | -                        | 0,0012  | 0,0054 | -       | 0,00009 | 0,0064  | Alves Peixoto <i>et al.</i> , 2019 |
| ETAAS      | Leche humana | 0,0025                   | -       | -      | 0,00109 | -       | -       | Gürbay <i>et al.</i> 2012          |
| FAAS       | Leche humana | -                        | 0,0030  | 0,0018 | -       | -       | 0,0013  | Luo <i>et al.</i> , 2010           |
| HG-AFS     | Leche humana | -                        | -       | -      | -       | 0,00025 | -       | Mazej <i>et al.</i> , 2004         |
| ETAAS      | Leche humana | -                        | 0,00071 | -      | 0,00092 | -       | -       | Turan <i>et al.</i> , 2001         |
| FAAS/ETAAS | Leche humana | 0,00036                  | 0,0030  | 0,0054 | 0,00024 | 0,00036 | 0,0040  | Este trabajo                       |
| MP-AES     | Leche humana | 0,00090                  | 0,0011  | 0,0021 | 0,00048 | 0,00097 | 0,0042  | Este trabajo                       |

### 3.2.8 Monitoreo elemental en muestras de madres pertenecientes a distintas dietas

Como se comentó previamente la composición de la leche humana no es constante a lo largo del tiempo y se ve afectada por varios factores, incluyendo la etapa de la lactancia, la nutrición materna, el medio ambiente, las condiciones de vida y el estado individual de la madre (Zhang, 2014). Los niveles de oligoelementos en la leche pueden verse afectados por la ingesta y el estado de oligoelementos maternos, aunque también influyen otros factores como ser la edad materna, paridad, área de residencia, ingreso familiar, duración de la gestación y peso corporal del bebé (Leotsinidis *et al.*, 2005).

En este contexto, se evaluó si el contenido de los oligoelementos estudiados estaba relacionado con el tipo de alimentación de las madres donantes. Con este fin se analizaron grupos de muestras pertenecientes a madres con marcados hábitos alimenticios, a saber, omnívoras y veganas. Se analizaron muestras de leche madura cruda (sin pasteurizar) de seis madres en cada grupo. Estas madres no pertenecían al BLH-CHPR, sino que fueron donantes externas, sanas y con edades entre 22 y 38 años. De esta forma, se evaluó si existían diferencias significativas en los niveles de oligoelementos según el tipo de dieta. Paralelamente, a modo de ejemplo, se estudió la variación en los niveles de oligoelementos para una de las madres omnívoras a lo largo de un período de 1 día (variación intradía) y a lo largo de un período de 1 mes (variación intrames). Los resultados de los experimentos relacionados con distintas dietas maternas se resumen en la Tabla 13.

**Tabla 13. Niveles de oligoelementos en las muestras de leche humana madura de madres con marcados hábitos alimenticios.**

| Tipo de dieta  | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) (n = 6) |             |               |                 |             |
|----------------|---------------------------------------------|-------------|---------------|-----------------|-------------|
|                | Cu                                          | Fe          | I             | Se              | Zn          |
| Omnívora       | 0,42 ± 0,10                                 | 1,10 ± 0,71 | 0,122 ± 0,011 | 0,0140 ± 0,0012 | 4,02 ± 0,82 |
| Vegana         | 0,28 ± 0,05                                 | 0,79 ± 0,04 | 0,097 ± 0,009 | 0,0119 ± 0,0010 | 2,51 ± 0,09 |
| Diferencia (%) | 33,3*                                       | 28,2*       | 20,5*         | 15,0*           | 37,5*       |

\*Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

La dieta vegana es un tipo de alimentación que excluye todos los productos de origen animal. Esto incluye no solo carne y pescado, sino también productos derivados de animales como lácteos, huevos, miel y gelatina. En su lugar, la dieta vegana se basa

únicamente en alimentos de origen vegetal. Este tipo de dieta sólo debe llevarse a cabo bajo supervisión médica o de un profesional en nutrición, ya que se debe garantizar una ingesta adecuada de nutrientes durante la alimentación complementaria (Scholz-Ahrens *et al.*, 2020). El número de nutrientes que pueden resultar insuficientes aumenta a medida que la dieta se vuelve más restringida. En este sentido, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) advierte contra el riesgo de deficiencias de hierro, zinc, vitamina D, proteínas y ácidos grasos de cadena larga en el caso de dietas vegetarianas y adicionalmente calcio, yodo, vitamina A y vitamina B12 en el caso de dietas veganas (Fewtrell *et al.*, 2017). Asimismo, no se recomienda llevar adelante una dieta vegana durante el embarazo, la infancia, la niñez, la adolescencia y la lactancia debido al mayor riesgo de deficiencias de nutrientes, retraso del crecimiento, menor densidad ósea y alteración del metabolismo óseo (Ambroszkiewicz *et al.*, 2019; Richter *et al.*, 2016). En este contexto, las muestras de leche humana analizadas en este trabajo, provenientes de madres omnívoras y veganas, demostraron un claro descenso estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en los niveles de concentración de todos los oligoelementos de la leche de madres veganas.

En el caso del cobre hubo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del 33,3 % en la leche de madres veganas, lo cual está de acuerdo con los reportes de Specker *et al.* (1988) para madres con dietas macrobióticas similares a las dietas veganas. Asimismo, se alinea con los reportes de Perrin *et al.* (2023) donde se reportó un descenso del 27 % en madres veganas respecto a las omnívoras.

En el caso del hierro hubo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del 28,2 % lo cual estuvo de acuerdo con lo reportado por Perrin *et al.* (2023). En Alemania se observó deficiencia de hierro en el 40 % de las mujeres jóvenes con hábitos alimentarios veganos, aunque su ingesta media de hierro estaba por encima del nivel recomendado (Waldmann *et al.*, 2004). Sin embargo, la biodisponibilidad de los nutrientes es muy relevante y debe considerarse en el contexto de los alimentos, así como el patrón dietético y la presencia o ausencia de inhibidores o potenciadores de la absorción (Weaver & Heaney, 2006). En el caso del hierro, su biodisponibilidad se ve perjudicada por la presencia de calcio (Hallberg

*et al.*, 1993) pero aumentada por la carne (Kristensen *et al.*, 2005) o la presencia de vitamina C (Hallberg *et al.*, 1987). En este sentido, se ha observado que el consumo de leche enriquecida con hierro y vitamina C mejora el nivel de hierro de mujeres jóvenes con reservas bajas de este elemento a pesar de su alto contenido en calcio (Scholz-Ahrens *et al.*, 2004; Redecilla Ferreiro *et al.*, 2020).

En el caso del yodo se observó un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del 20,5 % que concuerda con lo reportado por Ureta-Velasco *et al.* (2023) y Perrin *et al.* (2023). Los niveles de yodo pueden verse influenciados por varios factores. Por ejemplo, el perclorato, un contaminante ubicuo, es un inhibidor competitivo del simportador de sodio/yodo en la tiroides y la mama lactante. En concentraciones elevadas, el perclorato disminuye el transporte activo de yodo tiroideo y puede disminuir el yodo de la leche materna. Se ha detectado perclorato en el agua potable y en múltiples alimentos. La exposición al perclorato entre vegetarianos y veganos, cuyo consumo de yodo puede ser bajo, puede exponerlos a un riesgo aún mayor de sufrir deficiencia de yodo. Asimismo, el alto consumo de soja en dietas veganas, que contiene las isoflavonas genesteína y daidzeína, puede estar asociado con la deficiencia de yodo y el hipotiroidismo (Leung *et al.*, 2011).

En el caso del selenio se observó también un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del 15,0 % lo cual está de acuerdo con los reportes de Ureta-Velasco *et al.* (2023). Esto puede deberse a que las principales fuentes de selenio en la dieta omnívora incluyen carnes, mariscos, huevos y productos lácteos, mientras que las madres veganas no consumen estos alimentos, por lo que deben depender de fuentes vegetales, que pueden tener variaciones en el contenido de selenio dependiendo del suelo en el que se cultivan, el cual depende a su vez de la zona geográfica. Asimismo, el selenio presente en alimentos de origen vegetal puede no estar tan biodisponible como el selenio en alimentos de origen animal. Estos resultados contrastan con los reportados por Perrin *et al.* (2023) quienes encontraron un mayor contenido de selenio en la leche de madres veganas en comparación con las madres omnívoras, hecho que pone de manifiesto la importancia de realizar este tipo de monitoreos en distintas regiones.

Finalmente, el zinc fue el elemento que presentó mayor diferencia entre grupos dietarios, observándose un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del 37,5 % en la leche de madres veganas, lo cual está en consonancia con el descenso reportado por Perrin *et al.* (2023) de 30 %. El bajo contenido de zinc en la leche de madres veganas puede deberse a la baja biodisponibilidad del elemento en este tipo de dietas, ya que los alimentos vegetales ricos en zinc, como legumbres, cereales integrales, nueces y semillas, también poseen un alto contenido de ácido fítico, el cual actúa como inhibidor (Hunt, 2003).

A pesar del marcado descenso observado para los oligoelementos estudiados en la leche de madres veganas, si se considera la ingesta adecuada para infantes entre 0 y 6 meses establecida por la Junta de Alimentos y Nutrición de las Academias Nacionales de Ciencias de la Ingeniería de EUA de 0,20 mg/día (Cu), 0,27 mg/día (Fe), 0,11 mg/día (I), 0,015 mg/día (Se) y 2,0 mg/día (Zn), respectivamente, y asumiendo un consumo diario de 0,75 mL de leche, que sería el consumo mínimo de leche madura por los lactantes en ese estadio, se podría decir que se estaría suministrando una correcta cantidad de estos nutrientes, excepto de yodo y selenio, donde el consumo diario de leche debería ser ligeramente superior a 1,0 L para alcanzar los requerimientos mínimos (NIH, 2024).

En general, durante la deficiencia de oligoelementos, el cuerpo de la madre prioriza las necesidades del bebé. Por lo tanto, estos nutrientes continúan excretándose en la leche materna en cantidades suficientes a expensas de las reservas maternas. En consecuencia, el lactante está comparativamente bien protegido contra la deficiencia materna, pero la madre corre un mayor riesgo de sufrir deficiencias nutricionales durante la lactancia si su ingesta no cumple con las recomendaciones mínimas (Allen & Dror, 2018; Carretero-Krug *et al.*, 2024). En regiones de bajos ingresos, el uso de suplementos dietéticos ha demostrado ser eficaz para abordar las deficiencias nutricionales (Salam *et al.*, 2014). En la mayoría de los casos, estas deficiencias nutricionales pueden corregirse con una planificación dietética adecuada y el uso de suplementos (Segura *et al.*, 2016).

De forma de complementar estos estudios se realizó, a modo de ejemplo, el monitoreo de los niveles de oligoelementos en leche madura de una madre omnívora a lo

largo de un período de un mes, comenzando a partir de dos meses postparto. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 14.

**Tabla 14. Variación intrames en los niveles de oligoelementos en muestras de leche humana madura de una madre omnívora.**

| Fecha                        | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) (n = 6) |             |                 |                 |             |
|------------------------------|---------------------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|
|                              | Cu                                          | Fe          | I               | Se              | Zn          |
| 15/11/2022                   | 0,42 ± 0,02                                 | 1,30 ± 0,02 | 0,0131 ± 0,0009 | 0,0159 ± 0,0008 | 3,96 ± 0,09 |
| 22/11/2022                   | 0,27 ± 0,01                                 | 1,00 ± 0,01 | 0,0132 ± 0,0008 | 0,0151 ± 0,0009 | 2,67 ± 0,07 |
| 29/11/2022                   | 0,27 ± 0,01                                 | 1,00 ± 0,02 | 0,0127 ± 0,0006 | 0,0149 ± 0,0007 | 2,36 ± 0,05 |
| 06/12/2022                   | 0,26 ± 0,01                                 | 0,95 ± 0,01 | 0,0122 ± 0,0007 | 0,0138 ± 0,0007 | 1,89 ± 0,03 |
| 13/12/2022                   | 0,24 ± 0,01                                 | 0,48 ± 0,01 | 0,0115 ± 0,0006 | 0,0127 ± 0,0005 | 1,36 ± 0,03 |
| Diferencia en el período (%) | 42,8*                                       | 63,1*       | 12,2*           | 20,1*           | 65,6*       |

\*Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

Como se puede observar en la Tabla 14 los descensos en los niveles de los oligoelementos estudiados fueron estadísticamente significativos (p < 0,05) entre el primer y el último día de monitoreo. Estos descensos están de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde se han reportado descensos más abruptos para cobre, hierro y zinc, mientras que los descensos para yodo y selenio serían más lentos (Guo, 2014).

Finalmente, se monitoreó la variación de oligoelementos intradía para la misma madre omnívora de la etapa anterior. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 15.

**Tabla 15. Variación intradía en los niveles de oligoelementos en muestras de leche humana madura de una madre omnívora.**

| Fecha           | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) (n = 6) |             |                 |                 |             |
|-----------------|---------------------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|
|                 | Cu                                          | Fe          | I               | Se              | Zn          |
| Mañana (5:00 h) | 0,42 ± 0,02                                 | 1,30 ± 0,02 | 0,0131 ± 0,0009 | 0,0159 ± 0,0008 | 3,96 ± 0,09 |
| Tarde (14:00 h) | 0,34 ± 0,01                                 | 0,73 ± 0,01 | 0,0129 ± 0,0007 | 0,0151 ± 0,0009 | 3,24 ± 0,08 |
| Noche (23:00 h) | 0,35 ± 0,01                                 | 0,75 ± 0,02 | 0,0132 ± 0,0005 | 0,0157 ± 0,0007 | 3,21 ± 0,06 |

Tal como se puede apreciar en la Tabla 15 hubo diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en las concentraciones de cobre, hierro y zinc entre la mañana y la tarde, siendo las concentraciones mayores en la mañana. Por el contrario, no se observaron

diferencias significativas en los niveles de yodo y selenio a lo largo del día. Los valores obtenidos en la mañana fueron 19 % (Cu), 44 % (Fe) y 18 % (Zn) mayores a los respectivos valores vespertinos.

Las concentraciones de oligoelementos en la leche humana pueden variar a lo largo del día debido a varios factores (Guo, 2014; Jensen, 1995; Keikha *et al.*, 2021):

- Ciclo circadiano materno: El cuerpo humano sigue un ritmo circadiano, un ciclo de 24 horas que regula muchas funciones biológicas, el cual puede influir en la producción y secreción de ciertos oligoelementos (Hampel *et al.*, 2017).
- Dieta materna: Lo que una madre consume a lo largo del día puede afectar la composición de su leche, mientras que las fluctuaciones en la ingesta de alimentos pueden provocar variaciones en los niveles de oligoelementos.
- Estado de hidratación materno: La deshidratación puede aumentar la concentración de ciertos oligoelementos en la leche, mientras que una buena hidratación puede diluirlos.
- Estado fisiológico materno: Las situaciones de estrés y el grado de cansancio de la madre pueden afectar la producción y composición de su leche.
- Factores hormonales maternos: Las hormonas juegan un papel crucial en la producción de leche y pueden afectar la composición de esta a lo largo del día.
- Frecuencia y volumen de lactancia: La frecuencia con la que un bebé se alimenta y el volumen de leche extraído pueden influir en la concentración de oligoelementos.

La composición de la leche humana cambia durante una toma, durante el transcurso del día, con la duración de la lactancia y con los cambios en la dieta materna. También existen importantes variaciones interindividuales en la composición de la leche humana que pueden referirse a factores genéticos. Incluso cuando las proporciones de ciertos componentes de la leche humana están muy conservadas de una madre a otra, las grandes variaciones en los volúmenes de leche materna observadas incluso en poblaciones bien alimentadas también dan lugar a una amplia variabilidad en el suministro de nutrientes del lactante (Rodríguez-Palmero *et al.*, 1999).

### 3.3 Determinación de vitaminas

#### 3.3.1 Optimización de los procedimientos de extracción

Antes de su aplicación al análisis de muestras de leche humana, los métodos analíticos fueron optimizados y validados para la determinación de las vitaminas estudiadas (retinol,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol, ácido fólico y ácido ascórbico) basándose en las recomendaciones de la Guía Eurachem (Eurachem, 2014).

La optimización de las preparaciones de muestras se realizó mediante estudios de recuperación comparando la concentración experimental obtenida para cada analito luego del análisis del SRM correspondiente mediante el método propuesto, y el valor certificado correspondiente. Esta comparación se expresó como porcentaje de recuperación %R. Las condiciones óptimas para la preparación de muestras descritas en la Sección 2.5.3 se seleccionaron después de evaluar el porcentaje de recuperación estimado como  $\%R = [\text{concentración experimental (mg kg}^{-1}) / \text{concentración certificada (mg kg}^{-1})] \times 100$ , para cada experimento (base seca). Se seleccionaron para su posterior validación las condiciones más simples y rápidas con un %R estadísticamente igual al 100 %. Los resultados de los diseños factoriales  $2^2$  se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 16. Resultados obtenidos luego del diseño factorial  $2^2$  utilizando el SRM.**

| Experimento | Porcentaje de recuperación (%R) |                   |                     |              |                 |
|-------------|---------------------------------|-------------------|---------------------|--------------|-----------------|
|             | Retinol                         | $\beta$ -caroteno | $\alpha$ -tocoferol | Ácido fólico | Ácido ascórbico |
| 1           | 75                              | 70                | 79                  | 81           | 84              |
| 2           | 79                              | 79                | 82                  | 91           | 92              |
| 3           | 85                              | 83                | 87                  | 90           | 100             |
| 4           | 100                             | 99                | 99                  | 100          | 101             |

Como se puede observar en la Tabla 9, los cinco compuestos analizados se recuperaron completamente usando las condiciones del Experimento 4. Sólo para el ácido ascórbico, también se obtuvo una recuperación completa después de realizar el Experimento 3. Así, para el retinol,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol y ácido fólico, se seleccionaron las condiciones descritas en el Experimento 4, mientras que para el ácido ascórbico se emplearon las condiciones descritas en el Experimento 3, como se muestra en la Sección

612.5.3. Se eligió el Experimento 3 para realizar determinaciones de ácido ascórbico, ya que involucraba una menor cantidad de disolvente de extracción ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), estando más alineado con los principios de la Química Analítica Verde (Gałuszka *et al.*, 2012).

Se requieren métodos de detección altamente sensibles para la cuantificación de retinol,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol. Por lo general, las vitaminas liposolubles suelen analizarse tras un procedimiento de saponificación. Sin embargo, la eficiencia de estos métodos de extracción puede variar según la muestra y, por lo tanto, debe optimizarse minuciosamente para cada estudio en particular. En este caso, la saponificación facilitó la separación de las vitaminas de la grasa de la leche, convirtiendo la grasa en ácidos grasos y glicerol. Seleccionar la temperatura de saponificación y el tiempo de extracción adecuados es fundamental para lograr una recuperación eficiente de las vitaminas lipófilas de la muestra y al mismo tiempo preservar su integridad. Esto implica equilibrar factores como la cinética de reacción, la mejora de la solubilidad, la emulsificación de la leche, el establecimiento del equilibrio y minimizar la degradación de las vitaminas (Chotyakul *et al.*, 2014). Generalmente, las temperaturas más altas aceleran la reacción, lo que conduce a una extracción más rápida; sin embargo, las temperaturas excesivamente altas también pueden degradar estos compuestos sensibles. También se probó el uso de ácido ascórbico como antioxidante. El mismo procedimiento descrito en la Sección 2.5.3.1 sin este reactivo mostró porcentajes de recuperación de alrededor del 60 % para los tres compuestos, lo que demuestra su relevancia durante la preparación de muestras en la conservación de analitos. Según trabajos anteriores, los antioxidantes permiten la separación de compuestos individuales como picos únicos sin interferencias durante la cromatografía (Chotyakul *et al.*, 2014). Luego de la saponificación se realizó una extracción líquido-líquido con hexano, que es el solvente más utilizado para este fin. En este paso también se evaluó el diclorometano; sin embargo, produjo un porcentaje de recuperación más bajo (~65 %) que el hexano (~100 %). Finalmente, el hexano fue evaporado mediante una corriente de nitrógeno en ausencia de luz, para evitar la descomposición de los analitos estudiados, durante el último paso. En este caso también se estudió la evaporación térmica mediante baño de agua a 60 °C, como recomiendan otros autores (Martínez-Rojano, 2016), pero las recuperaciones no fueron



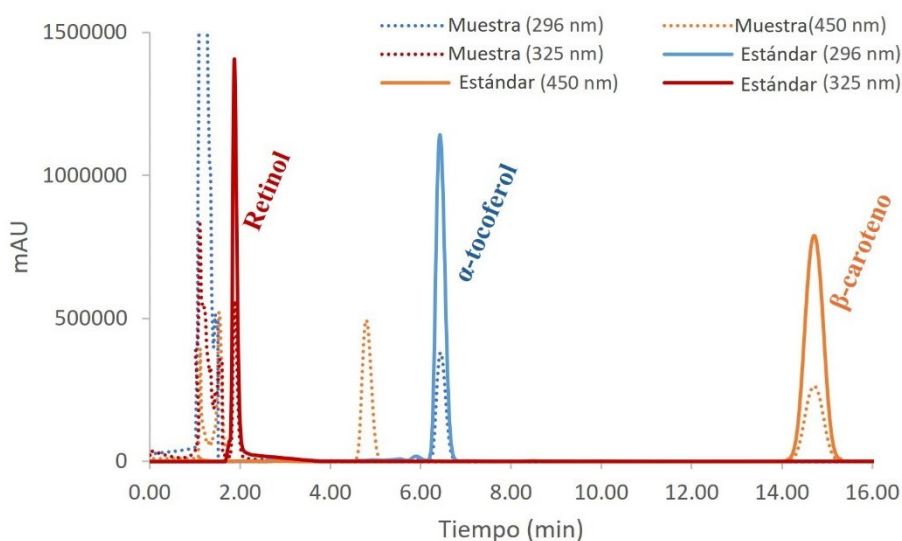
tubo para cada muestra, y por lo tanto fue la tecnología seleccionada. Finalmente, la centrifugación de la muestra de leche tratada con TCA es obligatoria para separar las proteínas precipitadas y otras macromoléculas del sobrenadante que contiene el analito. Este paso fue crítico para una extracción cuantitativa, como se muestra en la Tabla 9, requiriendo un tiempo de centrifugación de 10 min a 2500 g.

Al extraer ácido ascórbico de la leche humana, es esencial seguir un enfoque sistemático para garantizar resultados precisos y confiables, especialmente durante la preparación de las muestras. Hay varios métodos de extracción disponibles para el ácido ascórbico, incluida la extracción con disolventes, la extracción en fase sólida y la extracción líquido-líquido. En este caso la extracción líquido-líquido mediante ácido ortofosfórico resultó ser la opción más adecuada, tal y como recomiendan otros autores (Romeu-Nadal *et al.*, 2006; Tarrago-Trani *et al.*, 2012). El ácido ortofosfórico es un disolvente común para extraer ácido ascórbico de la leche y otras muestras biológicas, ya que precipita eficientemente proteínas y otras sustancias que interfieren mientras estabiliza el analito. Como se puede observar en la Tabla 9, el tiempo de centrifugación tiene un gran efecto sobre la eficiencia de extracción. Se requiere la centrifugación de muestras de leche humana para separar la capa de grasa de la fase acuosa, mientras que la eliminación de la capa de grasa debe realizarse con cuidado para evitar perder cualquier fracción acuosa que contenga el analito. La extracción con TCA también se probó en condiciones optimizadas, lo que llevó a una sobreestimación de la vitamina. Esto podría explicarse por el hecho de que el ácido ortofosfórico es selectivo para el ácido ascórbico y no extrae otros componentes de la leche como si ocurre con el TCA. Esta selectividad puede dar como resultado un extracto más limpio con menos interferencia de proteínas y otras sustancias que pueden absorber a la misma longitud de onda. El ácido ortofosfórico es relativamente estable y no sufre degradación ni reacción con el ácido ascórbico en condiciones ácidas, a diferencia del TCA (Chebrolu *et al.*, 2012).

### **3.3.2 Optimización de las condiciones cromatográficas**

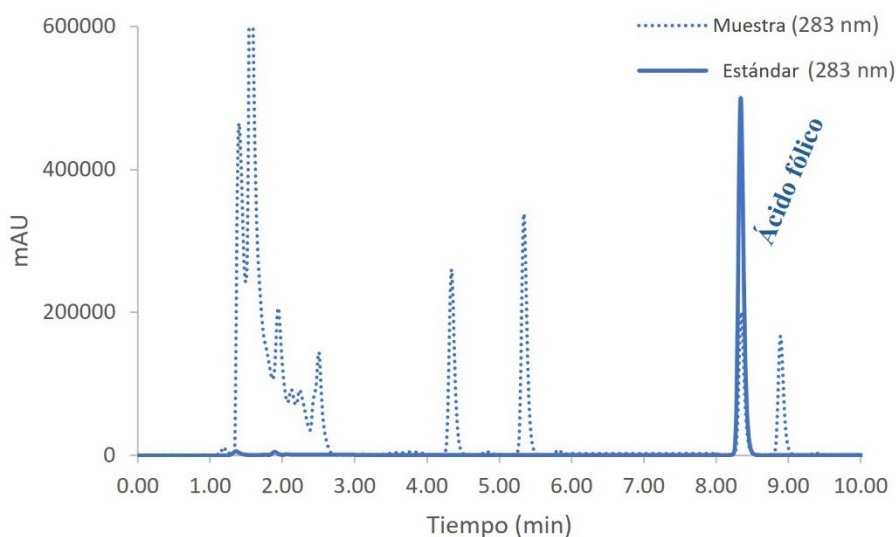
La optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de retinol,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol se realizó utilizando la columna Hypersil BDS

C18. La primera fase móvil probada fue metanol:agua (95:5 v/v), que mostró una buena separación cromatográfica, aunque el tiempo de retención del retinol fue excesivamente corto y la resolución comprometida, mientras que el tiempo de retención del  $\beta$ -caroteno fue excesivamente largo, lo que sugiere que el metanol podría ser demasiado polar para la elución de este último. Se observaron resultados similares usando metanol:acetonitrilo (90:10 v/v) como fase móvil. Así, para mejorar la separación cromatográfica, se disminuyó la concentración de metanol hasta alcanzar una fase móvil óptima formada por acetonitrilo:metanol (65:35 v/v). Estas condiciones son similares a las reportadas por otros autores (Chotyakul *et al.*, 2014). El volumen de inyección se ajustó a 100  $\mu$ L para compensar la menor sensibilidad del detector UV. El caudal se fijó en 1,5 mL min<sup>-1</sup> para reducir el tiempo de retención del  $\beta$ -caroteno y evitar un ensanchamiento excesivo. Estas condiciones permitieron una corrida total de 16 minutos. Se utilizó tetrahidrofurano como tercer disolvente, según lo recomendado por Andrés *et al.* (2014), empleando una fase móvil compuesta por acetonitrilo:metanol:tetrahidrofurano (65:30:5 v/v), la cual no mejoró la separación cromatográfica y resultó en corrida más larga, por lo que fue descartada para esta aplicación. La Figura 15 muestra cromatogramas típicos de estándares de vitaminas y una extracción de muestra de leche humana, que muestra una corrida total de 16 minutos.



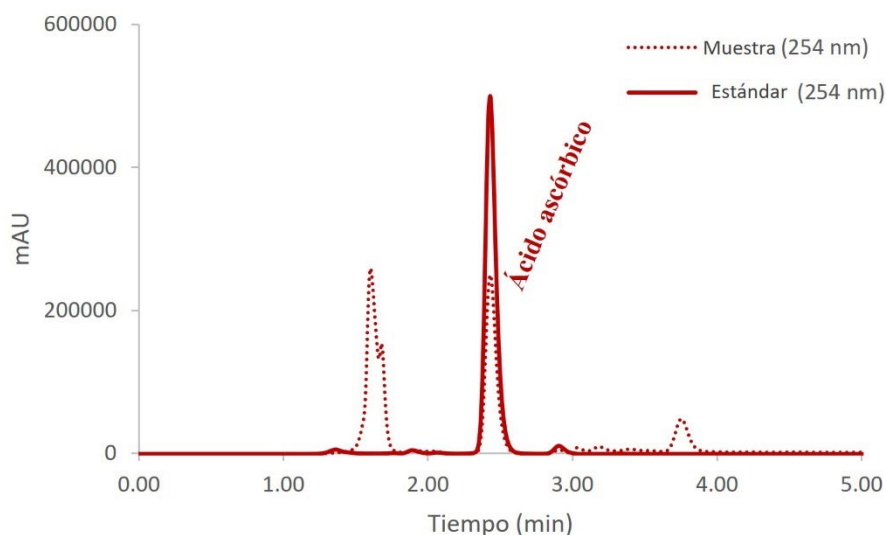
**Figura 15.** Cromatogramas superpuestos para una solución estándar de 1 mg L<sup>-1</sup> de retinol,  $\alpha$ -tocoferol y 10 mg L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno, y una extracción de muestra de leche humana.

La elección de la fase móvil para la determinación del ácido fólico mediante HPLC-DAD es crucial para lograr una separación y detección óptimas. La composición de la fase móvil normalmente consiste en mezclas de metanol:agua. Sin embargo, las vitaminas hidrosolubles como la B9 presentan características químicas particulares relacionadas con la estabilidad, polaridad y acidez (Albalá-Hurtado *et al.*, 1997). Con el objetivo de lograr condiciones cromatográficas óptimas, se utilizaron trietilamina y ácido acético como aditivos para ajustar el pH de la fase móvil a 3,6 y mejorar la forma y resolución del pico. Finalmente, la fase móvil seleccionada estuvo compuesta por metanol: 0,5 % v/v de trietilamina + 2,4 % v/v de ácido acético glacial en agua (15:85 v/v). Cuando la proporción de metanol se aumentó al 20 %, el ácido fólico eluyó en un tiempo más corto, pero la resolución fue pobre debido a la superposición con los picos de la matriz. El uso de una fase móvil con 15 % de metanol aumentó el tiempo total del análisis, pero proporcionó una mejor resolución. El pH de la fase móvil se ajustó previamente a 3,6 según lo recomendado por Vincenzetti *et al.* (2020), ya que anteriormente ha sido reportado como un factor extremadamente crítico para la separación y determinación de vitaminas B. La Figura 16 muestra cromatogramas típicos del estándar de ácido fólico y una extracción de muestra de leche humana.



**Figura 16. Cromatogramas superpuestos para una solución estándar de ácido fólico de 10 mg L<sup>-1</sup> y una extracción de muestra de leche humana.**

La optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación de ácido ascórbico se realizó utilizando la columna Zorbax Eclipse Plus C18. La primera fase móvil probada fue 0,02 % p/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:acetonitrilo (95:5 v/v) según lo recomendado por Tarrago-Trani *et al.* (2012) a un caudal de 0,7 ml min<sup>-1</sup>, con el pico de ácido ascórbico eluyendo aproximadamente a los 8,0 min. Sin embargo, la forma del pico obtenida parecía deformada cuando se inyectó la muestra. Para superar este problema, la fase móvil se cambió a 0,02 % p/v de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:metanol (95:5 v/v). Finalmente, la fase móvil óptima consistió en 0,1 % v/v de ácido acético: metanol (95:5 v/v), según lo recomendado por Romeu-Nadal *et al.* (2008), fluyendo a 1,2 mL min<sup>-1</sup>, el cual mostró una buena separación cromatográfica y excelente forma de pico luego de la inyección de muestras de leche. La Figura 17 muestra cromatogramas típicos del estándar de ácido ascórbico y una extracción de muestra de leche humana.



**Figura 17. Cromatogramas superpuestos para una solución estándar de ácido ascórbico de 10 mg L<sup>-1</sup> y una extracción de muestra de leche humana.**

### 3.3.3 Validación de los métodos analíticos

Una vez optimizado el método analítico, se realizó el procedimiento de validación. Las cifras de mérito evaluadas fueron las siguientes: linealidad, límite de detección (LD) y

límite de cuantificación (LC), precisión y veracidad. Los resultados obtenidos para cada analito se resumen a continuación en la Tabla 9.

**Tabla 17. Principales cifras de mérito obtenidas para cada analito luego de la validación.**

| Parámetro                                     | Retinol     | $\alpha$ -tocoferol | $\beta$ -caroteno | Ácido fólico  | Ácido ascórbico |
|-----------------------------------------------|-------------|---------------------|-------------------|---------------|-----------------|
| Rango lineal (mg L <sup>-1</sup> )            | 0,033 – 1,0 | 0,27 – 10,0         | 0,037 – 1,0       | 0,027 – 100,0 | 0,40 – 100,0    |
| LD (mg L <sup>-1</sup> ) (3 $\sigma$ , n=10)  | 0,010       | 0,081               | 0,011             | 0,008         | 0,012           |
| LC (mg L <sup>-1</sup> ) (10 $\sigma$ , n=10) | 0,033       | 0,27                | 0,037             | 0,027         | 0,040           |
| Precisión (RSD%, n=6)                         | 5,8*        | 6,2*                | 7,0*              | 6,8*          | 5,7*            |
| Veracidad (R%, n=6)                           | 101*        | 99*                 | 98*               | 98*           | 100*            |

\*Obtenidos usando el SRM NIST 1846a.

La linealidad se evaluó para cada compuesto mediante la construcción de curvas de calibración de seis puntos, cada nivel por duplicado. Se verificó en un rango adecuado para esta aplicación, hasta 1,0 mg L<sup>-1</sup> (retinol y  $\beta$ -caroteno), hasta 10,0 mg L<sup>-1</sup> ( $\alpha$ -tocoferol), y hasta 100,0 mg L<sup>-1</sup> (ácido fólico y ácido ascórbico), respectivamente, utilizando la prueba de falta de ajuste (Miller & Miller, 2010). Los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) fueron superiores a 0,999 en todos los casos.

El LD y LC se calcularon para cada analito como 3s<sub>b</sub>/b y 10s<sub>b</sub>/b, respectivamente, donde s<sub>b</sub> era la desviación estándar de 10 réplicas de una muestra en blanco y b era la pendiente de la curva de calibración. Los valores de LC obtenidos fueron 0,033 mg L<sup>-1</sup> (retinol), 0,27 mg L<sup>-1</sup> ( $\alpha$ -tocoferol), 0,037 mg L<sup>-1</sup> ( $\beta$ -caroteno), 0,027 mg L<sup>-1</sup> (ácido fólico) y 0,040 mg L<sup>-1</sup> (ácido ascórbico), respectivamente, siendo adecuados para los objetivos de este trabajo, ya que fueron considerablemente inferiores a las concentraciones obtenidas en las muestras de leche humana analizadas. Estos límites fueron del mismo orden, y en algunos casos menores, a los reportados previamente por otros autores en condiciones cromatográficas similares (Chotyakul *et al.*, 2014; Lebiedzińska *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2017).

La precisión se estimó como repetibilidad y se expresó como porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) después del análisis del SRM NIST 1846a mencionado anteriormente (n = 6). Resultó ser inferior al 10 % en todos los casos, lo que se consideró adecuado para esta aplicación, considerando la teoría de Horwitz sobre la variabilidad a

niveles de trazas, ya que los %RSD obtenidos estuvieron muy por debajo del 30 % (Horwitz & Albert, 2006).

Para la evaluación de la veracidad, se realizaron pruebas *t* de Student para comparar los valores obtenidos con los valores certificados de cada SRM (*n* = 6). Los valores *t* experimentales obtenidos para todos los compuestos después del análisis del SRM estuvieron por debajo del *t* (0,05, 5) = 2,57, lo que indica que al nivel de confianza del 95 %, las concentraciones experimentales no diferían significativamente de las certificadas (Miller & Molinero, 2010). También se evaluaron muestras de leche humana fortificadas para complementar los estudios de recuperación del SRM, considerando posibles diferencias en la matriz. Los resultados de recuperación de estas muestras enriquecidas mostraron un %R en el rango del 97 al 104 % para todos los compuestos analizados.

En vista de los resultados obtenidos luego de la evaluación de veracidad y precisión, los métodos analíticos se consideraron exactos para la determinación de las vitaminas estudiadas en muestras de leche humana.

En la Tabla 18 se muestra una comparación de los límites de detección obtenidos en este trabajo, con los límites reportados por otros autores luego del análisis por HPLC con diferentes métodos de detección. Como se puede observar, los valores de LD obtenidos en este trabajo fueron entre 5 y 80 veces inferiores a los reportados por Andrés *et al.* en bebidas a base de leche mediante HPLC-DAD (Andrés, Villanueva, & Tenorio, 2014). Además, el LD obtenido para el ácido fólico en este trabajo es 2,5 veces menor que el reportado por Mahato *et al.* en arroz usando HPLC-DAD (Mahato *et al.*, 2020). Asimismo, el LD obtenido para el ácido ascórbico es 4,5 veces menor que el informado por Ferin *et al.* (2013) en plasma humano empleando HPLC-DAD de exclusión iónica. Sin embargo, Chotyakul *et al.* (2014) obtuvieron valores de LD más bajos para retinol,  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno en leche de vaca utilizando un enfoque cromatográfico similar, lo que puede explicarse por el hecho de que estos autores utilizaron el doble de cantidad de muestra utilizada en este trabajo y el mismo volumen final. Por otro lado, el acoplamiento de condiciones cromatográficas similares a diferentes sistemas de detección como la detección

electroquímica coulombimétrica (CLD) o la detección por quimioluminiscencia (CLD) puede mejorar los límites de detección del método analítico (Ma *et al.*, 2017; Mahato *et al.*, 2020).

**Tabla 18. Comparación de los límites de detección de varios métodos de HPLC para la determinación de los compuestos estudiados.**

| Técnica                   | Muestra                | R     | LD (mg L <sup>-1</sup> ) |       |        |       | Referencia                         |
|---------------------------|------------------------|-------|--------------------------|-------|--------|-------|------------------------------------|
|                           |                        |       | α-t                      | β-c   | AF     | AA    |                                    |
| HPLC-DAD                  | Leche humana           | 0,011 | 0,009                    | -     | -      | -     | Martínez-Rojano (2016)             |
| HPLC-DAD                  | Leche de vaca          | 0,006 | 0,027                    | 0,004 | -      | -     | Chotyakul <i>et al.</i> (2014)     |
| HPLC-DAD                  | Bebidas lácteas        | 0,050 | 0,600                    | 0,900 | -      | -     | Tarrago-Trani <i>et al.</i> (2012) |
| HPLC-CED                  | Productos alimenticios | -     | -                        | -     | 0,0013 | -     | Lebiedzińska <i>et al.</i> (2008)  |
| HPLC-CLD                  | Leche humana           | -     | -                        | -     | -      | 0,008 | Ma <i>et al.</i> (2017)            |
| HPLC-DAD                  | Arroz                  | -     | -                        | -     | 0,020  | -     | Mahato <i>et al.</i> (2020)        |
| HPLC-DAD exclusión iónica | Plasma humano          | -     | -                        | -     | -      | 0,054 | Ferin <i>et al.</i> (2013)         |
| HPLC-DAD                  | Leche humana           | 0,010 | 0,081                    | 0,011 | 0,008  | 0,012 | Este trabajo                       |

CED: detección electroquímica coulombimétrica, CLD: detección por quimioluminiscencia, DAD: detección por arreglo de diodos, R: retinol, α-t: α-tocoferol, β-c: β-caroteno, AF: ácido fólico, AA: ácido ascórbico.

Cabe destacar que también se llevó a cabo la determinación de cobalamina, pero en este caso no fue necesario realizar optimización y validación, sino solo una adecuación al uso, ya que se utilizó un kit ELISA específico para este fin. En este caso simplemente se verificaron las condiciones establecidas por el fabricante. A saber, se corroboró un límite de cuantificación de 0,3 µg L<sup>-1</sup> y un rango lineal de 0,3 – 40,0 µg L<sup>-1</sup>. La veracidad expresada como %R fue luego del análisis del SRM correspondiente fue del 98 %.

### 3.3.4 Determinaciones de vitaminas en muestras de leche humana donada

Una vez finalizado el proceso de validación, se analizaron los análisis de muestras de leche humana proporcionadas por el banco de leche humana. Se analizaron un total de 40 muestras (10 de calostro y 30 de leches maduras), antes y después de la pasteurización. En la Tabla 19 se muestran las concentraciones promedio obtenidas para cada compuesto, separadas por calostro y leche madura, cruda (C) y pasteurizada (P), así como el porcentaje de pérdida luego de la pasteurización. Por otro lado, cabe destacar que los contenidos de grasa total fueron  $4,5 \pm 1,1$  % m/v (calostro) y  $7,0 \pm 0,5$  % m/v (leche madura), respectivamente, tal como se informara previamente en la Tabla 4.

**Tabla 19. Concentraciones de retinol,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido fólico y ácido ascórbico en las muestras de leche donada analizadas.**

| Compuesto           | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) |                     | Pérdida promedio (%) | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) |                       | Pérdida promedio (%) |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------------|----------------------|
|                     | Calostro (C)                        | Calostro (P)        |                      | Madura (R)                          | Madura (P)            |                      |
| Retinol             | $1,5 \pm 0,2$                       | $1,3 \pm 0,1$       | 10,8*                | $0,38 \pm 0,08$                     | $0,38 \pm 0,08$       | 6,9*                 |
| $\alpha$ -tocoferol | $12,8 \pm 2,5$                      | $11,2 \pm 0,6$      | 12,1*                | $2,9 \pm 0,7$                       | $2,7 \pm 0,6$         | 7,0*                 |
| $\beta$ -caroteno   | $0,58 \pm 0,08$                     | $0,52 \pm 0,01$     | 11,1*                | $0,067 \pm 0,009$                   | $0,062 \pm 0,010$     | 6,4*                 |
| Ácido fólico        | $1,05 \pm 0,20$                     | $0,95 \pm 0,23$     | 9,5 *                | $20,3 \pm 4,7$                      | $18,0 \pm 5,2$        | 11,3*                |
| Ácido ascórbico     | $55,4 \pm 4,1$                      | $48,6 \pm 5,1$      | 12,2*                | $36,1 \pm 5,9$                      | $31,0 \pm 5,1$        | 14,2*                |
| Cobalamina          | $0,0018 \pm 0,0004$                 | $0,0017 \pm 0,0005$ | 5,2                  | $0,00039 \pm 0,00008$               | $0,00037 \pm 0,00007$ | 3,9                  |

C) cruda, P) pasteurizada. Expresado como: promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 10 para calostro y n = 30 para leche madura). \*Diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

Los niveles medios de retinol y  $\beta$ -caroteno expresados en términos de grasa total fueron  $33,3 \mu\text{g g}^{-1}$  (calostro)/  $5,42 \mu\text{g g}^{-1}$  (leche madura) y  $12,8 \mu\text{g g}^{-1}$  (calostro)/  $0,96 \mu\text{g g}^{-1}$  (leche madura), respectivamente. Se puede decir que los niveles de retinol encontrados en madres uruguayas coincidieron con los reportados previamente por Martínez-Rojano *et al.* (2016) en madres mexicanas, Matamoros *et al.* (2014) en madres argentinas, y Ollilainen *et al.* (1989) en madres finlandesas. Asimismo, los niveles de  $\beta$ -caroteno coincidieron con los niveles informados por Xavier *et al.* (2018) en madres españolas. En términos generales, los niveles de  $\beta$ -caroteno obtenidos en este trabajo están en el mismo orden de magnitud y siguen tendencias similares en cuanto a la transición del calostro a la leche madura, como

lo reporta la literatura (Giuliano *et al.*, 1994; Gossage *et al.*, 2002). Según Giuliano *et al.* (1994) el contenido de carotenoides puede fluctuar a lo largo del día debido a diferencias interindividuales, mientras que la composición del calostro no representa el contenido de nutrientes estabilizado de la leche madura. Por tanto, los datos obtenidos deben evaluarse cuidadosamente ya que el contenido de carotenoides en el calostro es significativamente mayor que en la leche madura (Xavier *et al.*, 2018). La disminución promedio en los niveles de  $\beta$ -caroteno por un factor de 8 obtenida en este trabajo es similar a la reportada por Schweigert *et al.* (2004).

Por otro lado, los niveles de  $\alpha$ -tocoferol coincidieron con los reportados previamente por Martínez-Rojano (2016) en madres mexicanas y por Romeu-Nadal *et al.* (2008) en madres españolas. El contenido de vitamina E en la leche humana es muy variable y se presenta principalmente como  $\alpha$ -tocoferol. En comparación con los otros isómeros, el  $\alpha$ -tocoferol es menos estable durante el procesamiento y el almacenamiento, pero tiene la mayor actividad biológica con efectos antioxidantes beneficiosos en la prevención de enfermedades. Factores ambientales como el oxígeno, la luz, la temperatura y también factores intrínsecos como la actividad del agua, el contenido de grasa y el pH influyen en su estabilidad (Chotyakul *et al.*, 2014). De acuerdo con Picciano (2001) el contenido de  $\alpha$ -tocoferol es mayor en el calostro ( $\sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ ), disminuyendo y estabilizándose en la leche madura ( $\sim 3\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$ ), lo que concuerda con la disminución observada en este trabajo.

Los niveles de ácido ascórbico obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados por Romeu-Nadal *et al.* (2008) y Moltó-Puigmartí *et al.* (2011) en madres españolas. Asimismo, los niveles aproximadamente un 30 % más bajos en la leche madura en comparación con el calostro coincidieron con datos anteriores informados en la literatura (Guo, 2014). Se observó una disminución significativa del 36,2 % en los niveles entre el calostro y la leche madura en acuerdo con lo reportado por León-Sanz *et al.* (2021). El calostro contiene niveles más altos de ácido ascórbico en comparación con la leche madura, lo cual es fundamental ya que éste juega un papel crucial en el apoyo al sistema inmunológico del recién nacido para combatir infecciones. Los niveles de ácido ascórbico en la leche madura disminuyen en comparación con el calostro, con concentraciones que

oscilan entre 30-40 mg L<sup>-1</sup>, dependiendo de la dieta de la madre y otros factores como el tabaquismo, el estrés y el uso de suplementos, entre otros (Bzikowska-Jura *et al.*, 2018; León-Sanz *et al.*, 2021).

En cuanto a los niveles de ácido fólico, se puede decir que los niveles encontrados en madres uruguayas coincidieron con los reportados en la literatura internacional (Guo, 2014; García-López, 2011), siguiendo tendencias similares con respecto a la transición del calostro a la leche madura como en acuerdo con datos de otros autores (García-López, 2011). La variabilidad en el contenido de ácido fólico se debe a diferencias interindividuales en la ingesta dietética materna de fuentes alimentarias de esta vitamina. La concentración exacta de ácido fólico en el calostro puede variar entre las madres, pero generalmente no se considera una fuente importante de folato para el recién nacido, ya que este compuesto es captado principalmente por el feto en desarrollo a través de la placenta durante el embarazo. Luego del nacimiento, si la madre sigue una dieta equilibrada, los niveles de folato en la leche madura generalmente son adecuados para satisfacer las necesidades del bebé. Cabe recordar que el folato es crucial para la síntesis de ADN, la división celular y el desarrollo cerebral del bebé (Picciano, 2001).

Finalmente, los niveles de cobalamina encontrados en las muestras de madres uruguayas coincidieron con los reportados en la literatura internacional (García-López, 2011). De acuerdo con Sauberan (2019), la vitamina B12 se encuentra naturalmente en la leche humana en el rango 0,3 – 3 µg L<sup>-1</sup>. Asimismo, cabe destacar que hubo un marcado descenso en los niveles de esta vitamina al pasar del calostro a la leche madura, lo cual coincide con datos de la literatura, ya que la concentración en calostro puede ser hasta 20 veces superior respecto a la de la leche madura, dependiendo de las características de la madre (Sauberan, 2019). Se considera que los valores encontrados son suficientes para cumplir con la ingesta diaria recomendada de lactantes hasta 6 meses de edad, considerando los niveles de concentración y las condiciones normales de consumo en cada etapa. Si la madre lleva adelante una dieta variada y equilibrada no se requiere el uso de suplementos vitamínicos, sin embargo, se ha observado carencia de vitamina B12 en leche de mujeres con dietas vegetarianas estrictas (veganas), enfermedades malabsortivas

(Crohn, celiacía), mal estado nutricional, anemia perniciosa, nivel socioeconómico bajo y en caso de catástrofes naturales o guerras. Se ha demostrado que los lactantes que provienen de madres que sufren alguna de estas situaciones poseen alto riesgo de padecer trastornos relacionados a la carencia de vitamina B12, pudiendo cursar anemia, retraso de crecimiento y retraso psicomotor.

### **3.3.5 Evaluación de las pérdidas de vitaminas luego de la pasteurización**

En lo que respecta a las pérdidas de vitaminas por efecto de la pasteurización, se observaron los resultados que se discuten a continuación. Cabe destacar que para las comparaciones con datos de la literatura internacional se consideraron trabajos que involucraban pasteurizaciones tipo Holder en todos los casos.

Para retinol y  $\beta$ -caroteno las pérdidas promedio observadas luego de la pasteurización fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), concretamente 7,0 % (leche madura) y 12,1 % (calostro), respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los reportados previamente por otros autores (Matamoras *et al.*, 2014). También se observó una mayor pérdida después de la pasteurización para el retinol y el  $\beta$ -caroteno en el calostro, lo que puede explicarse por las diferencias en el contenido de grasa de ambas etapas. Como se puede observar en la Tabla 4, el contenido de grasa fue aproximadamente un 35 % menor en el calostro, lo que puede resultar en una menor retención de vitaminas liposolubles durante el tratamiento térmico. Asimismo, los referentes de los bancos de leche humana a nivel mundial recomiendan optimizar las medidas de toma de muestra y conservación de la leche para evitar pérdidas de vitamina A, la cual es particularmente sensible a la luz (Matamoras *et al.*, 2014). En este sentido, cabe destacar que el porcentaje de pérdida observado en este trabajo fue inferior al hallado en leche humana donada al BLH de la Maternidad del Hospital Universitario de Río Grande del Norte (Brasil), donde la pérdida reportada fue del 34 %. Esta diferencia podría deberse a un cuidado más eficiente de la leche luego del proceso de pasteurización en el BLH-CHPR.

En el caso del  $\alpha$ -tocoferol también se observaron pérdidas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) luego de la pasteurización, del orden de 12,1 % (calostro) y 7,0 %

(leche madura), lo cual puede relacionarse con el contenido de grasa en cada etapa, tal como se describió en el párrafo anterior. Las pérdidas observadas coinciden con los valores reportados por Romeu-Nadal *et al.* (2008) en leche humana. Estas pérdidas observadas para el  $\alpha$ -tocoferol son similares a las reportadas por Romeu-Nadal *et al.* (2008), las cuales se deben a la sensibilidad del compuesto al calor y al oxígeno atmosférico. Varios estudios han documentado que la pasteurización Holder reduce de manera significativa los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en la leche humana. Se estima que la reducción puede variar entre el 15 y el 35 % de su concentración original dependiendo de factores como el tiempo de exposición, la temperatura y la composición específica de la leche (Guo, 2014). De acuerdo con Silvestre *et al.* (2008), luego de la pasteurización Holder ocurre una disminución general en los niveles de agentes antioxidantes, incluyendo la vitamina E, lo cual podría comprometer las propiedades antioxidantes de la leche donada.

En cuanto a las pérdidas debidas a la pasteurización para el ácido ascórbico, se observaron disminuciones promedio estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de 12,2 % (calostro) y 14,2 % (leche madura), lo que concordó con valores previos reportados en la literatura (Romeu-Nadal *et al.*, 2008; Moltó-Puigmartí *et al.*, 2011). Estas pérdidas están relacionadas con la susceptibilidad del compuesto al aumentar la temperatura. Cuando las muestras de leche se exponen a altas temperaturas, luz u oxígeno, así como a la presencia de algunos metales pesados como cobre o hierro, el ácido ascórbico puede oxidarse a ácido dehidroascórbico. Este último, aunque tiene actividad de vitamina C, ya que puede reconvertirse en ácido ascórbico en el cuerpo humano, es muy inestable y se pierde principalmente como ácido dicetogulónico, que no muestra actividad (Moltó-Puigmartí *et al.*, 2011). Por este motivo, el seguimiento del ácido ascórbico en la leche humana donada es de gran relevancia para evitar o minimizar la incidencia de determinados trastornos en los lactantes. Los resultados de esta tesis muestran que el ácido ascórbico es más inestable respecto a las otras vitaminas estudiadas en respuesta al tratamiento térmico, por lo cual puede ser utilizado para el monitoreo de calidad del proceso (Romeu-Nadal *et al.*, 2008).

En cuanto a las pérdidas luego de la pasteurización para el ácido fólico, se observaron disminuciones estadísticamente significativas del 8,6 % (calostro) y del 11,3 %

(leche madura), las cuales están relacionadas con la susceptibilidad del compuesto al aumento de temperatura y al contacto con el oxígeno atmosférico. Estos valores están de acuerdo con los resultados reportados por Peila *et al.* (2016), donde se describe que pueden existir pérdidas de este compuesto de hasta aproximadamente un 20 % de su concentración inicial. Además, cabe destacar que los valores obtenidos son considerablemente superiores a los reportados en otras leches animales (Shetty *et al.*, 2020).

En el caso de la cobalamina no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los niveles de concentración luego de la pasteurización en ninguno de los dos estadios. Esto está en acuerdo con lo informado por Peila *et al.* (2016). A diferencia de otras vitaminas sensibles al calor, la cobalamina es relativamente estable bajo las condiciones de pasteurización Holder, y no se observan pérdidas significativas en su concentración. Esto se debe a la estructura química de la cobalamina, que es más resistente a la degradación térmica en comparación con vitaminas como el ácido ascórbico o el folato. Si bien la cobalamina es sensible a la luz y a cambios de pH extremos, su estabilidad térmica es mayor, lo que permite que conserve su integridad durante el proceso de pasteurización. Este hallazgo es muy importante, ya que esta vitamina es esencial para la formación de glóbulos rojos y el desarrollo neurológico, y un adecuado contenido en la leche pasteurizada es clave para asegurar un aporte nutricional completo para los lactantes.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el ácido ascórbico sería ligeramente más inestable al tratamiento térmico que el resto de los compuestos estudiados. Por tanto, el seguimiento de este compuesto sería un buen indicador de calidad de la leche materna donada. En este sentido, el ácido ascórbico ya ha sido propuesto como biomarcador de estrés oxidativo en muestras biológicas (Romeu-Nadal *et al.*, 2008).

Es importante destacar que, a pesar de las pérdidas debidas a la pasteurización observadas para todas las vitaminas, exceptuando la cobalamina, los niveles siguen siendo adecuados y se encuentran en el rango de valores reportados en otros estudios. Las ingestas adecuadas para los compuestos en estudio son: 0,4 mg/día (0 – 6 meses) y 0,5 mg/día (6 – 12 meses) (retinol), 4 mg/día (0 – 6 meses) y 5 mg/día (6 – 12 meses) ( $\alpha$ -tocoferol), 40

mg/día (0 – 6 meses) y 50 mg/día (6 – 12 meses) (ácido ascórbico), 0,065 mg/día (0 – 6 meses) y 0,080 mg/día (6 – 12 meses) (folato), 0,0004 mg/día (0 – 6 meses) y 0,0005 mg/día (6 – 12 meses) (cobalamina) (NIH, 2024). En este sentido, considerando un consumo diario de calostro en el rango de 40 a 300 mL y un consumo diario de leche madura en el rango 600 a 1000 mL, podría decirse que la leche donada por el BLH-CHPR estaría aportando las cantidades necesarias de las mencionadas vitaminas, aún a pesar de las pérdidas observadas en algunos casos. Cabe destacar que, entre los 6 y 12 meses, se acompaña la dieta con alimentos sólidos.

### 3.3.6 Monitoreo vitamínico en muestras de madres pertenecientes a distintas dietas

Al igual que lo reportado en la Sección 3.2.7 se evaluó si el contenido de algunas de las vitaminas estudiadas estaba relacionado con el tipo de alimentación de las madres donantes. Con este fin se analizaron las mismas muestras pertenecientes a madres omnívoras y veganas. Se analizaron muestras de leche madura cruda (sin pasteurizar) de seis madres en cada grupo, aproximadamente en el mismo estadio de tiempo. Estas madres no pertenecían al BLH-CHPR, sino que fueron donantes externas, sanas y con edades entre 22 y 38 años. De esta forma, se evaluó si existían diferencias significativas en los niveles de vitaminas según el tipo de dieta.

**Tabla 20. Niveles de vitaminas en las muestras de leche humana madura de madres con marcados hábitos alimenticios.**

| Tipo de dieta | Concentración (mg L <sup>-1</sup> ) (n = 6) |               |             |                 |              |
|---------------|---------------------------------------------|---------------|-------------|-----------------|--------------|
|               | Retinol                                     | β-caroteno    | α-tocoferol | Ácido ascórbico | Ácido fólico |
| Omnívora      | 0,51 ± 0,09                                 | 0,077 ± 0,008 | 4,0 ± 0,9   | 39,9 ± 7,1      | 25,2 ± 7,0   |
| Vegana        | 0,46 ± 0,08                                 | 0,071 ± 0,010 | 3,7 ± 0,8   | 43,4 ± 6,8      | 22,6 ± 8,3   |

Tal como se puede apreciar en la Tabla 20 los niveles de vitaminas en la leche de madres omnívoras y de madres veganas son muy similares, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p < 0,05$ ). Estos hallazgos concuerdan con los resultados reportados por Ureta-Velasco *et al.* (2023) para estas mismas vitaminas. Asimismo, los resultados obtenidos para el ácido fólico concuerdan con los reportados por

Karcz & Królak-Olejniki (2021), lo cual era de esperarse, ya que se sabe que el contenido de folato en la leche no depende de la ingesta materna, sino que su organismo regula y mantiene los niveles de folato para asegurar que el bebé reciba una cantidad adecuada (Allen, 2012).

En términos generales, la mayor preocupación entre las madres veganas es el contenido de vitamina B12 en su leche, ya que ésta es escasa en los alimentos de origen vegetal y su deficiencia en la madre lactante puede provocar un deterioro cognitivo irreversible y otros trastornos neurológicos, así como complicaciones hematológicas en el lactante (Dror & Allen, 2008). Sin embargo, de acuerdo con Ureta-Velasco *et al.* (2023) la dieta vegana puede ser adecuada para las mujeres lactantes si se proporciona una suplementación suficiente. Si bien se pueden encontrar en la literatura varios trabajos que evalúan los niveles de vitamina B12 entre madres veganas y omnívoras, existe muy poca información acerca de los niveles de otras vitaminas entre ambos grupos. En este sentido, si bien no pudo evaluarse la vitamina B12 en este grupo de muestras, si se evaluaron otras cinco vitaminas, proporcionando información relevante en lo que respecta a la nutrición de los lactantes.

### **3.4 Interacciones entre oligoelementos y vitaminas**

De forma de estudiar la interacción y correlación entre los oligoelementos y las vitaminas analizadas en las muestras de leche humana, se llevó a cabo un estudio de correlación de Pearson. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 21.

**Tabla 21. Coeficientes de correlación de Pearson (r) para oligoelementos y vitaminas.**

|             | Cu | Fe     | Zn     | Se              | I      | AA             | R              | $\alpha$ -t    | $\beta$ -c     | AF             |
|-------------|----|--------|--------|-----------------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Cu          | 1  | 0,0684 | 0,2442 | <b>0,4952*</b>  | 0,0975 | 0,2408         | -0,0963        | 0,1919         | -0,2170        | 0,1012         |
| Fe          |    | 1      | 0,2002 | 0,2768          | 0,1637 | <b>0,4793*</b> | 0,1675         | 0,1816         | 0,2398         | <b>0,5122*</b> |
| Zn          |    |        | 1      | <b>-0,4926*</b> | 0,4023 | <b>0,5263*</b> | <b>0,4962*</b> | 0,3217         | <b>0,4837*</b> | <b>0,5567*</b> |
| Se          |    |        |        | 1               | 0,4002 | 0,1636         | 0,3283         | <b>0,6018*</b> | 0,3080         | 0,1007         |
| I           |    |        |        |                 | 1      | 0,1304         | 0,0980         | 0,0796         | 0,0805         | 0,0986         |
| AA          |    |        |        |                 |        | 1              | 0,1774         | 0,1796         | 0,1780         | <b>0,6109*</b> |
| R           |    |        |        |                 |        |                | 1              | <b>0,8184*</b> | <b>0,8454*</b> | 0,1025         |
| $\alpha$ -t |    |        |        |                 |        |                |                | 1              | <b>0,8227*</b> | 0,1121         |
| $\beta$ -c  |    |        |        |                 |        |                |                |                | 1              | 0,1069         |
| AF          |    |        |        |                 |        |                |                |                |                | 1              |

R: retinol,  $\alpha$ -t:  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -c:  $\beta$ -caroteno, AF: ácido fólico, AA: ácido ascórbico.

\*Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

Los resultados del estudio de correlación realizado sobre las muestras de leche humana donada al BLH-CHPR mostraron correlaciones positivas estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre los pares Cu/Se, Fe/ácido ascórbico, Fe/ácido fólico, Zn/ácido ascórbico, Zn/retinol, Zn/ $\beta$ -caroteno, Zn/ácido fólico, Se/ $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico/ácido fólico, retinol/ $\alpha$ -tocoferol, retinol/ $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol/ $\beta$ -caroteno. De acuerdo con Hurtado & Domínguez (2009), las correlaciones retinol/ $\alpha$ -tocoferol, retinol/ $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol/ $\beta$ -caroteno corresponden a correlaciones fuertes ( $r > 0,8$ ).

Es interesante señalar que tanto Perrone *et al.* (1994) como Almeida *et al.* (2008) reportaron previamente una correlación positiva significativa entre cobre y selenio. La aparición de estas correlaciones entre oligoelementos probablemente refleja mecanismos similares en su paso del plasma a la leche en la glándula mamaria, pero se necesita más información para fundamentar esta suposición.

Asimismo, la correlación positiva entre selenio y  $\alpha$ -tocoferol puede deberse a que ambos actúan como antioxidantes y trabajan en conjunto para proteger las células del daño oxidativo. Ambos nutrientes trabajan sinérgicamente para mejorar la capacidad antioxidante del organismo (Rayman, 2000).

En cuanto a las correlaciones positivas entre ácido ascórbico y oligoelementos, se puede decir que este compuesto es capaz de aumentar la absorción de hierro al mantenerlo en su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que es más soluble y absorbible a nivel del intestino. Este efecto

se observa principalmente en la absorción intestinal, pero puede tener implicaciones en los niveles generales de hierro de la madre y, en consecuencia, en la concentración de hierro de su leche, lo cual puede explicar la correlación positiva observada. En forma análoga, existe evidencia que sugiere que el ácido ascórbico también puede mejorar la absorción de zinc, lo cual explicaría la correlación positiva con este oligoelemento (Harari, 2010).

Asimismo, la correlación positiva observada entre el zinc y la vitamina A puede explicarse ya que el zinc es necesario para la liberación y el transporte de esta vitamina en el organismo. Niveles adecuados de zinc pueden mejorar la disponibilidad de vitamina A en la leche materna (Christian & West, 1998).

En lo que respecta a la correlación entre la vitamina A y la vitamina E, puede decirse que ambas son liposolubles y su concentración en la leche materna está influenciada por la ingesta dietética de la madre. Normalmente, existe una correlación positiva entre la concentración de estas vitaminas, ya que una dieta rica en grasas saludables y micronutrientes suele aumentar los niveles de ambas en la leche materna (Schweigert & Dudenhausen, 1992). En forma similar, la vitamina C y vitamina B9 son ambas hidrosolubles y pueden estar correlacionadas, especialmente en madres que consumen una dieta rica en frutas y vegetales. La vitamina C puede influir positivamente en la estabilidad y biodisponibilidad del ácido fólico, lo que puede reflejarse en sus concentraciones en la leche materna (Ortega *et al.*, 1997).

Paralelamente, se encontró una correlación inversa para entre selenio y zinc, lo cual concuerda con los hallazgos de Perrone *et al.* (1994) y de Almeida *et al.* (2008). El hecho de que el selenio se correlacione inversamente con el zinc y directamente con el cobre, podría significar que el contenido de zinc y cobre en la leche depende de la variación en la ingesta de selenio de la madre.

Finalmente, cabe destacar que todas estas correlaciones son influenciadas por muchos factores, incluyendo la dieta de la madre, la suplementación y el estado de salud general. Asimismo, la biodisponibilidad de oligoelementos y vitaminas puede variar, lo que también puede influir en sus concentraciones en la leche materna.

### **3.5 Consideraciones finales sobre la pasteurización Holder y potenciales alternativas**

El creciente número de bebés que nacen extremadamente prematuros y sobreviven al nacer y después, con una edad gestacional de tan solo 22 semanas, representa un nuevo desafío para la nutrición neonatal. En las últimas décadas, las organizaciones de la salud y las sociedades científicas han identificado la leche humana como el estándar normativo para la alimentación y nutrición del lactante prematuro, ya que confiere protección contra diversas patologías, mejora la salud cardiovascular y el desarrollo neurocognitivo a largo plazo (Arslanoglu *et al.*, 2013). Como se comentó previamente, la leche humana materna es la primera opción para la alimentación del lactante prematuro. Sin embargo, cuando ésta no es suficiente, la mejor alternativa es la leche humana donada obtenida de bancos de leche humana (Moro *et al.*, 2019).

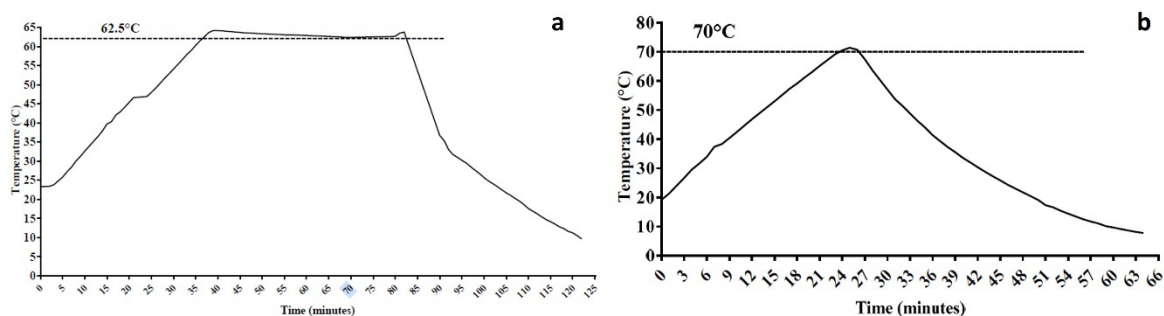
La leche humana donada debe pasteurizarse para inactivar agentes virales y bacteriológicos. Actualmente, las directrices internacionales para el establecimiento y manejo de bancos de leche humana recomiendan el método de pasteurización Holder (HMBANA, 2018). Se sabe que la leche humana pasteurizada retiene muchos componentes beneficiosos y protectores de la leche humana fresca, sin embargo, también afecta algunas de las propiedades nutricionales y elimina microorganismos beneficiosos. Esto resulta en la reducción de algunos mecanismos bacteriostáticos que hacen que la leche sea más susceptible a la contaminación bacteriana luego del calentamiento y disminuye su valor nutricional (Moro *et al.*, 2019).

En este trabajo de tesis se observaron pérdidas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los niveles de selenio, retinol,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido fólico y ácido ascórbico, luego del proceso de pasteurización. En contraposición, se destacó la ausencia de pérdidas significativas en el caso de la cobalamina. La pérdida de algunos componentes biológicamente activos como resultado de la pasteurización Holder constituye la principal limitante en cuanto a la difusión de la utilización de leche humana donada en la alimentación de lactantes prematuros. En este sentido, han surgido varias alternativas en

los últimos años para superar éste y otros problemas, siendo las más ampliamente estudiadas la pasteurización a alta temperatura y tiempo corto (HTST), el procesamiento a alta presión (HPP) y la irradiación ultravioleta-C (UV-C) (Moro *et al.*, 2019).

La HTST generalmente se realiza calentando capas delgadas de leche en sistemas de flujo continuo a 72 °C durante 15 segundos. Esta tecnología se ha aplicado al tratamiento de leche humana donada con resultados prometedores (Peila *et al.*, 2016). Escuder-Vieco *et al.* (2018) describieron equipamiento diseñado específicamente para el procesamiento continuo de leche humana donada mediante HTST, considerando las necesidades específicas de un banco de leche humana. La calidad microbiológica, la actividad de las enzimas indicadoras y los índices de daño térmico fueron evaluados antes y después del tratamiento HTST utilizando diferentes combinaciones de temperatura y tiempo. Finalmente, los resultados se compararon con los resultados obtenidos luego de realizar pasteurización Holder sobre las mismas muestras, encontrándose una mayor retención de inmunoglobulinas, algunas hormonas, actividad lipasa estimulada por sales biliares y capacidad antioxidante en las muestras de leche humana donada tratadas mediante HTST.

Asimismo, con el fin de acortar el tiempo requerido para la pasteurización Holder y mejorar el perfil nutricional de la leche, Capriati *et al.* (2019) reportaron una modificación de la pasteurización Holder mediante cambios de bioingeniería en las curvas de tiempo-temperatura de la pasteurizadora, obteniendo así una versión modificada, la cual consiste en el calentamiento de las muestras a 70 °C durante 3 minutos, similar a HTST, tal como se puede apreciar a continuación en la Figura 18.



**Figura 18. Curvas tiempo temperatura para método Holder (a) y método Holder modificado (b).  
Extraído de: Capriati *et al.* (2019).**

En este caso, los autores llegaron a la conclusión de que el método Holder modificado proporcionaba la misma seguridad microbiológica y producía cambios nutricionales similares a los observados para el método Holder convencional de acuerdo con los niveles de calcio, triglicéridos y aminoácidos evaluados. Sin embargo, el método modificado tiene la ventaja de consumir menos tiempo y es probablemente más rentable que el convencional. Por lo tanto, podría resultar muy valioso en instituciones donde se requiere una gran cantidad de preparados lácteos diariamente. Otros aspectos nutricionales deberían evaluarse en el futuro para confirmar estos resultados preliminares.

El tratamiento HPP es un método de procesamiento no térmico que se puede aplicar a distintos tipos de alimentos para proporcionar productos microbiológicamente seguros, nutricionalmente intactos y características sensoriales de alta calidad (Considine *et al.*, 2008). Esta técnica inactiva los microorganismos patógenos mediante la aplicación de alta presión hidrostática (generalmente 400 a 800 MPa) mediante tratamientos de corta duración (generalmente 5 a 10 min) (Huppertz *et al.*, 2006). La pureza microbiológica alcanzada utilizando HPP es comparable con la obtenida luego de la pasteurización térmica (Windyga *et al.*, 2015). Asimismo, estudios recientes sugieren que un tratamiento con HPP, a presiones inferiores a 600 MPa durante 15 minutos, permite conservar la actividad antirotaviral (Parrón *et al.*, 2018). El método HPP respeta mejor las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos respecto a la pasteurización Holder, debido a la ausencia de tratamiento térmico (Contador *et al.*, 2015). Sin embargo, puede producirse un cambio en la fracción lipídica, ya que la grasa de la leche se distribuye en forma de glóbulos en el líquido coloidal producido por la glándula mamaria, y cualquier factor físico capaz de influir en la estabilización de este componente, ya sea la presurización o alta temperatura, puede provocar una disminución de su tamaño (Huppertz *et al.*, 2002). En este sentido, aumentar la presión por encima de 600 MPa podría provocar cambios en el contenido de ácidos grasos en la leche humana y aumentar la presencia de productos de oxidación lipídica (Huppertz *et al.*, 2017).

El tratamiento UV-C utiliza radiación ultravioleta de longitud de onda corta (200 a 280 nm), la cual que es perjudicial para los microorganismos. Cuanto mayor es la exposición

a la radiación UV, mejor es el resultado, asegurando una destrucción completa de todos los microorganismos presentes en el alimento. Este tratamiento posee una serie de características que lo convierten en un buen candidato como alternativa a la pasteurización Holder, ya que la radiación UV sólo penetra las muestras unos pocos milímetros, dependiendo de las propiedades ópticas, sin alterarlas. Sin embargo, la radiación UV no puede penetrar la leche ni otros alimentos turbios. Como consecuencia, estas sustancias deben presentarse al sistema como una capa delgada, lo cual no resulta eficiente cuando se tratan diariamente grandes volúmenes de leche humana donada. A pesar de esto, el tratamiento UV-C proporciona una excelente protección de los componentes biológicos, y es capaz de producir una disminución de al menos 5-log<sub>10</sub> en el número de bacterias presentes en la leche humana (incluido *Bacillus sp*). Asimismo, se ha demostrado la capacidad de la radiación UV para eliminar formas activas de citomegalovirus en la leche humana (Lloyd *et al.*, 2016). Desafortunadamente, hasta el momento no existe ningún dispositivo, ni siquiera un prototipo, que permita el uso de esta tecnología en un entorno de banco de leche humana (Moro *et al.*, 2019).

Estos métodos alternativos ofrecen varias ventajas y desventajas en términos de eficiencia, conservación nutricional y viabilidad para la producción a gran escala. Por ello, los investigadores continúan explorando y desarrollando nuevas tecnologías con el fin de garantizar la seguridad alimentaria y la calidad nutricional de la leche humana donada. Estas nuevas tecnologías se están desarrollando rápidamente, siendo el objetivo final lograr una mejor conservación de los componentes nutricionales y bioactivos de la leche humana cruda, garantizando al mismo tiempo la seguridad microbiológica de este alimento, al menos al mismo nivel que la pasteurización Holder convencional.

# **CAPÍTULO 4**

## **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 4.1 Conclusiones

Los procedimientos de preparación de muestras propuestos fueron simples, rápidos y precisos, además de adecuados a los objetivos propuestos, constituyendo herramientas eficientes para la determinación cuantitativa de los analitos estudiados. Los resultados presentados respaldan la utilidad de los métodos analíticos optimizados, que fue confirmada por las cifras de mérito obtenidas luego de la validación correspondiente. Asimismo, se pudieron implementar en algunos casos métodos multielemento y multicompuesto, los cuales se optimizaron de forma de alinearse lo más posible con los principios de la Química Analítica Verde, buscando generar mayor eficiencia y un menor impacto sobre el ambiente y el analista.

Los valores de los elementos esenciales son acordes a los reportados en la literatura para leche humana y constituyen una actualización de la información sobre este alimento único para los recién nacidos y lactantes. Asimismo, los niveles de Pb en las muestras evaluadas son acordes con los valores reportados a nivel internacional para madres no expuestas, garantizando la inocuidad del alimento frente a este contaminante inorgánico. Estos datos son muy valiosos, pues constituyen los primeros reportes en madres uruguayas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles antes y después de la pasteurización, salvo para el selenio.

En cuanto a los niveles de vitaminas se observó una mayor concentración de vitaminas en el calostro respecto a la leche madura, a excepción del ácido fólico, que mostró una tendencia opuesta. Asimismo, se observaron descensos estadísticamente significativos para todas las vitaminas tras la pasteurización, entre el 6,4 y el 14,2 %. Estas pérdidas fueron más significativas para las vitaminas liposolubles en el calostro, lo que puede explicarse por la menor concentración de grasa en esta etapa. Estos resultados son de suma importancia ya que constituyen los primeros datos reportados en madres uruguayas. En todos los casos las concentraciones de los analitos fueron mayores en el calostro respecto a la leche madura, a excepción del ácido fólico, tal como se reporta en la literatura,

lo cual está relacionado con la composición total de la leche en cada una de las etapas y la forma en la que los analitos se unen a la matriz, así como de los requerimientos nutricionales del lactante en cada etapa.

Paralelamente, se evaluó la variación intradía e intrames en los niveles de los oligoelementos en estudio, la cual mostró cambios estadísticamente significativos en los niveles de cobre, hierro y zinc intradía, siendo la concentración de hierro un 44 % mayor en la mañana. Cabe destacar que estos son resultados parciales, obtenidos de una muestra pequeña, por lo cual no corresponde la generalización de éstos. Asimismo, se observaron descensos estadísticamente significativos en los niveles de todos los oligoelementos estudiados a lo largo de un mes, especialmente para cobre, hierro y zinc. Estos hallazgos estuvieron en acuerdo con datos de la literatura internacional. Adicionalmente, con el fin de evaluar la incidencia de la dieta materna, se compararon los niveles de oligoelementos entre un grupo de madres veganas y un grupo de madres omnívoras. Los resultados mostraron diferencias significativas entre ambos grupos para todos los oligoelementos estudiados, siendo estos menores en la leche de madres veganas, en acuerdo con datos de la literatura. Sin embargo, el mismo estudio aplicado a las vitaminas, demostró que los niveles de éstas eran estadísticamente equivalentes entre ambos grupos.

Finalmente, se estudiaron potenciales correlaciones entre oligoelementos y vitaminas, observándose algunas correlaciones estadísticamente significativas, destacándose la correlación negativa selenio/zinc y varias correlaciones positivas como cobre/selenio, hierro/ácido ascórbico, selenio/ $\alpha$ -tocoferol, retinol/ $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico/ácido fólico, entre otras. La existencia de estas correlaciones en la leche humana tiene varias implicaciones biológicas importantes como ser la interdependencia nutricional a nivel de la absorción y el metabolismo, el equilibrio nutricional y el desarrollo infantil. Asimismo, comprender estas correlaciones puede ayudar a formular mejores sustitutos de la leche humana, asegurando que los lactantes que no pueden ser amamantados reciban un perfil nutricional lo más parecido posible al de la leche humana materna.

En suma, se destacan los siguientes grandes aportes del trabajo de tesis: el aporte analítico mediante la implementación de estrategias de trabajo multianalito y alineadas con

los principios de la Química Analítica Verde, el aporte al conocimiento composicional de la leche humana en Uruguay, el aporte del efecto de la pasteurización sobre los niveles de nutrientes esenciales y su efecto sobre los requerimientos de los lactantes, y el efecto de la dieta materna sobre la composición de la leche. Asimismo, la información obtenida en este trabajo de tesis se considera de interés general para la sociedad, ya que aporta nueva información sobre la leche de madres uruguayas que no estaba disponible hasta el momento, si bien ha habido muchos avances en otras líneas de estudio relacionadas con leche humana en nuestro país. Cabe destacar que en todos los casos los niveles de los nutrientes estudiados serían aptos para cubrir las necesidades de los lactantes, en acuerdo con las guías internacionales. La información obtenida constituye además una actualización sobre cómo la pasteurización Holder puede afectar la composición de la leche humana donada a los bancos, principalmente a ciertos nutrientes esenciales. Esto podría impulsar el desarrollo de otras tecnologías de tratamiento microbiológico, con el fin de obtener un mejor aprovechamiento de este alimento de alto valor nutricional para los lactantes. En la actualidad existen varios avances relacionados con tratamientos alternativos como ser la pasteurización a alta temperatura y tiempo corto, el procesamiento a alta presión y la irradiación ultravioleta-C, los cuales presentan una serie de ventajas y de desventajas, pero que podrían constituir alternativas más eficientes en el futuro cercano.

## **4.2 Perspectivas**

Se pretende continuar profundizando en la composición de la leche humana, expandiendo los estudios hacia la evaluación de distintos nutrientes de interés y las potenciales repercusiones sobre la salud. En particular, sería interesante estudiar la especiación de oligoelementos antes y después de la pasteurización, para evaluar si a pesar de que no ocurran cambios en la concentración total de un cierto elemento, si exista interconversión de especies, afectando posteriormente su biodisponibilidad. En este sentido, se prevé la presentación de proyectos de investigación interdisciplinarios relacionados con esta línea de estudio. La interdisciplinariedad es fundamental, ya que permite abordar problemas complejos desde diferentes perspectivas, enriqueciendo la

comprensión, fomentando la innovación, mejorando la toma de decisiones y dando respuesta a problemas complejos. La colaboración entre profesionales de distintas áreas no solo mejora los resultados, sino que también impulsa el progreso científico y social, haciendo la interdisciplinariedad clave para enfrentar los desafíos del siglo XXI.

# **CÁPITULO 5**

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar, O., Türker, A.R., Kiliç, Z. (1996). Determination of bismuth and lead in geological samples by electrothermal AAS, Part 1. Comparative study of tungsten containing chemical modifiers. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 357: 656–660.
- Adhisivam, B., Vishnu Bhat, B., Rao, K., Kingsley, S.M., Plakkal, N., Palanivel, C. (2019). Effect of Holder pasteurization on macronutrients and immunoglobulin profile of pooled donor human milk. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 32(18): 3016-3019.
- AEP – Asociación Española de Pediatría. (2023). Lactancia materna – Información y recomendaciones. Disponible en: <https://lactanciamaterna.aeped.es/lactancia-por-etapas/>
- Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Mariné-Font, A. (1997). Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778, 247–253.
- Allen, L.H. (2012). B Vitamins in Breast Milk: Relative Importance of Maternal Status and Intake, and Effects on Infant Status and function. *Advances in Nutrition* 3: 362–369.
- Allen, L.H., Dror, D.K. (2018). Introduction to Current Knowledge on Micronutrients in Human Milk: Adequacy, Analysis, and Need for Research. *Advances in Nutrition* 9: 275S–277S.
- Almeida, S., Dórea, J.G. (2006). Quality control of banked milk in Brasília, Brazil. *Journal of Human Lactation* 22(3): 335–339.
- Almeida, A., Lopes, C., Silva, A., Barrado, E. (2008). Trace elements in human milk: Correlation with blood levels, inter-element correlations and changes in concentration during the first month of lactation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22(3): 196-205.
- Alves Peixoto, R.R., Bianchi Codo, C.R., Lacerda Sanches, V., Guiraldelo, T.C., Ferreira da Silva, F., Ribessi, R.L., Martins Marba, S.T., Cadore, S. (2019). Trace mineral composition of human breast milk from Brazilian mothers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 54: 199–205.

Ambroszkiewicz, J., Chełchowska, M., Szamotulska, K., Rowicka, G., Klemarczyk, W., Strucińska, M., Gajewska, J. (2019). Bone status and adipokine levels in children on vegetarian and omnivorous diets. *Clinical Nutrition* 38(2): 730–737.

Andrés, V., Villanueva, M.J., Tenorio, M.D. (2014). Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and  $\beta$ -carotene in milk- and soy-juice based beverages by HPLC with diode-array detection. *LWT - Food Science and Technology* 58: 557e562.

Arslanoglu, S., Boquien, C.Y., King, C., Lamireau, D., Tonetto, P., Barnett, D., Bertino, E., Gaya, A., Gebauer, C., Grovslie, A., Moro, G.E., Weaver, G., Wesolowska, A.M., Picaud, J.C. (2019). Fortification Human Milk Preterm Infants: Update and Recommendations of the European Milk Bank Association (EMBA) Working Group on Human Milk Fortification. *Frontiers in Pediatrics* 7(76): 1–14.

Arslanoglu, S., Corpeleijn, W., Moro, G., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., Decsi, T., Domellöf, M., Fewtrell, M., Hojsak, I., Mihatsch, W., Mølgaard, C., Shamir, R., Turck, D., van Goudoever, J. (2013). Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 57: 535–542.

ASSE – Administración de los Servicios de Salud del Estado (2019). Banco de Leche. Disponible en: <https://www.asse.com.uy/contenido/BANCO-DE-LECHE-3392>

ASSE – Administración de los Servicios de Salud del Estado (2022). ASSE creará Red Nacional de Bancos de Leche Materna con el apoyo de la Presidencia del Senado. Disponible en: <https://www.asse.com.uy/contenido/ASSE-creara-Red-Nacional-de-Bancos-de-Leche-Materna-con-el-apoyo-de-la-Presidencia-del-Senado-13837>

ASSE – Administración de los Servicios de Salud del Estado (2024). Hemocentro de Maldonado proyecta un banco de leche materna de alcance nacional. Disponible en: <https://www.gub.uy/presidencia/comunicacion/noticias/hemocentro-maldonado-proyecta-banco-leche-materna-alcance-nacional>

Balaram, V. (2020). Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. *Microchemical Journal* 159: 105483.

- Ball, G.F.M. (2006). *Vitamins in foods. Analysis, bioavailability, and stability*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Springer, Berlin.
- Bendicho, C., De La Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., Lavilla, I. (2012). Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 31: 50-60.
- Blake, C.J. (2007). Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 63–76.
- Bhattacharya, S., Chatterjee, S., Sarkar, S. (2012). Pattern of arsenic exposure to children: Newborn to toddler stages. *Journal of Natural Sciences Research* 2(6): 39–47.
- Borre Ortiz, M.Y., Cortina Navarro, C., González Ruíz, G. (2014). Lactancia materna exclusiva: ¿La conocen las madres realmente? *Revista Cuidarte* 5(2): 723–730.
- Bzikowska-Jura, A., Czerwonogrodzka-Senczyna, A., Olędzka, G., Weker, H., Socha, P. (2018). The influence of maternal nutrition on human milk composition. *Nutrients* 10(10): 1379.
- Caballero, L. (2017). Deficiencia de iodo en mujeres lactantes. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría* 80(2): 62 – 68.
- Capriati, T., Goffredo, B.M., Argentieri, M., De Vivo, L., Bernaschi, P., Cairoli, S., Laureti, F., Reposi, M.P., Marino, D., Benedetti, S., Diamanti, A. (2019). A Modified Holder Pasteurization Method for Donor Human Milk: Preliminary Data. *Nutrients* 11: 1139.
- Carretero-Krug, A., Montero-Bravo, A., Morais-Moreno, C., Puga, A.M., Samaniego-Vaesken, M.L., Partearroyo, T. Varela-Moreiras, G. (2024). Nutritional Status of Breastfeeding Mothers and Impact of Diet and Dietary Supplementation: A Narrative Review. *Nutrients* 16: 301.
- Castillo-Durán, C., Perales, C., Hertrampf, E., Marín, V., Rivera, F., Icaza, G. (2001). Effect of zinc supplementation on development and growth of Chilean infants. *The Journal of Pediatrics* 138(2): 229–235.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (2024). Breastfeeding special circumstances. Disponible en: <https://www.cdc.gov/breastfeeding-special-circumstances/hcp/exposures/lead.html>

Cerf, O., Condrón, R. (2006). *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology & Infection* 134: 946–951.

Chebrolu, K.K., Jayaprakasha, G.K., Yoo, K.S., Jifon, J.L., Patil, B.S. (2012). An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Science and Technology* 47(2): 443–449.

Chen, Y., Gao, M., Bai, Y., Hao, Y., Chen, W., Cui, T., Guo, W., Pan, Z., Lin, L., Wang, C., Shen, J., Zhang, W. (2020). Variation of iodine concentration in breast milk and urine in exclusively breastfeeding women and their infants during the first 24 wk after childbirth. *Nutrition* 71: 110599.

Chotyakul, N., Pateiro-Moure, M., Saraiva, J.A., Torres, J.A., Pérez-Lamela, C. (2014). Simultaneous HPLC-DAD quantification of vitamins A and E content in raw, pasteurized, and UHT cow's milk and their changes during storage. *European Food Research and Technology* 238(4): 535–547.

Christian, P., West, K.P.Jr. (1998). Interactions between zinc and vitamin A: An update. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68(2): 435S–441S.

Codo, C.R.B., Caldas, J.P.S., Peixoto, R.R.A., Sanches, V.L., Guiraldelo, T.C., Cadore, S., Marba, S.T.M. (2018). Electrolyte and mineral composition of term donor human milk before and after pasteurization and of raw milk of preterm mothers. *Revista Paulista de Pediatria* 36(2): 141–147.

Cole, J.I. (2021). *Human Milk: Nutritional Content and Role in Health and Disease*. Nova.

Comisión del *Codex Alimentarius* (2019). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del *Codex* sobre contaminantes de los alimentos. Documento de debate sobre la revisión del código de prácticas para la prevención y reducción de la presencia de plomo en los alimentos. Disponible en: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/>

- Concha, G., Vogler, G., Lezcano, D., Nermell, B., Vahter, M. (1998). Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicological Sciences* 44(2): 185–190.
- Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Sleator, R.D. (2008). High-pressure processing-effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters* 281: 1–9.
- Contador, R., Delgado, F.J., García-Parra, J., Garrido, M., Ramírez, R. (2015). Volatile profile of breast milk subjected to high-pressure processing or thermal treatment. *Food Chemistry* 180: 17–24.
- Da Costa, R.S.S., Tavares do Carmo, M.G., Saunders, C., de Jesus, E.F.O., Lopes, R.T., Simabuco, S.M. (2003). Characterization of iron, copper and zinc levels in the colostrum of mothers of term and pre-term infants before and after pasteurization. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 54: 111–117.
- Dedina, J., Tsalev, D.L. (1995). *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. John Wiley & Sons, England.
- Dobrowolski, R., Adamczyk, A., Otto, M. (2010). Comparison of action of mixed permanent chemical modifiers for cadmium and lead determination in sediments and soils by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 82: 1325–1331.
- Domellöf, M., Lönnnerdal, B., Dewey, K.G., Cohen, R.J., Hernell, O. (2004). Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 111–115.
- Dror, D.K., Allen, L.H. (2008). Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: Current knowledge and possible mechanisms. *Nutrition Reviews* 66: 250–255.
- Escuder-Vieco, D., Espinosa-Martos, I., Rodríguez, J.M., Corzo, N., Montilla, A., Siegfried, P., Pallás-Alonso, C.R., Fernández, L. (2018). High-temperature short-time pasteurization system for donor milk in a human milk bank setting. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–16.

Eurachem. (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Disponible en: <http://www.eurachem.org>.

Eurofins Technologies. (2020). SENSISpec ELISA Vitamin B12 96 Tests. Disponible en: [https://www.goldstandarddiagnostics.com/pub/media/productattachments/files/IFU\\_SENSISpec\\_ELISA\\_Vitamin\\_B12\\_96\\_EN\\_v01\\_14OCT2020.pdf](https://www.goldstandarddiagnostics.com/pub/media/productattachments/files/IFU_SENSISpec_ELISA_Vitamin_B12_96_EN_v01_14OCT2020.pdf)

Evans, E.H., Pisonero, J., Smith, C.M.M., Taylor, R.N. (2024). Atomic spectrometry update: review of advances in atomic spectrometry and related techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 39(5): 1188-1211.

Fangstrom, B., Moore, S., Nermell, B., Kuenstl, L., Goessler, W., Grander, M., Kabir, I., Palm, B., Arifeen, S.E., Vahter, M. (2008). Breast-feeding protects against arsenic exposure in Bangladeshi infants. *Environmental Health Perspectives* 116(7): 963–969.

Fatima, Z., Jin, X., Zou, Y., Kaw, H.Y., Quinto, M., Li, D. (2019). Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A* 1606: 360245.

Ferin, R., Pavão, M.L., Baptista, J. (2013). Rapid, sensitive, and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV. *Clinical Biochemistry* 46: 665–669.

Fernandez-Sanchez, L.F., Bermejo-Barrera, P., Fraga-Bermudez, J.M., Szpunar, J., Lobinskic, R. (2007). Determination of iodine in human milk and infant formulas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21: 10–13.

Fewtrell, M., Bronsky, J., Campoy, C., Domellöf, M., Embleton, N., Fidler Mis, N., Hojsak, I., Hulst, J.M., Indrio, F., Lapillonne, A., Molgaard, C. (2017). Complementary feeding: a position paper by the European society for paediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 64(1): 119–132.

Gałaszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z. M., Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry* 37: 61–72.

- García-López, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica Mexicana* 32(4): 223–230.
- Gentili, A., Caretti, F. (2013). Chapter 18 – Analysis of Vitamins by Liquid Chromatography. In *Liquid Chromatography. Applications*. Elsevier.
- Giuliano, A.R., Neilson, E.M., Yap, H., Baier, M., Canfield L. M. (1994). Carotenoids of mature human milk: Inter/intraindividual variability. *Journal of Nutritional Biochemistry* 5: 551–556.
- Goodman, A., Ruddon, W., Molinoff, B., Limbird, E., Hardman, G. (1998). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9º Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México.
- Gossage, C. P., Deyhim, M., Yamini, S., Douglas, L. W., & Moser-Veillon, P.B. (2002). Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to  $\beta$ -carotene supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 193–197.
- Guo, M. (2014). *Human milk biochemistry and infant formula manufacturing Technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing.
- Gürbay, A., Charehsaz, M., Eken, A., Sayal, A., Girgin, G., Yurdakök, M., Yiğit, S., Erol, D.D., Şahin, G., Aydın, A. (2012). Toxic metals in breast milk samples from Ankara, Turkey: Assessment of lead, cadmium, nickel, and arsenic levels. *Biological Trace Element Research* 149: 117–122.
- Hallberg, L., Brune, M., Rossander-Hulthen, L. (1987). Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption? *Annals of the New York Academy of Sciences* 498(1): 324–332.
- Hallberg L, Rossander-Hulthen L, Brune M, Gleerup A (1993). Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *British Journal of Nutrition* 69: 533–540.
- Hampel, D., Shahab-Ferdows, S., Islam, M.M., Peerson, J.M., Allen, L.H. (2017). Concentrations in human milk vary with time within feed, circadian rhythm, and single dose supplementation. *Journal of Nutrition* 147(4): 603–11.

Harari, F., Åkesson, A., Casimiro, E., Lu, Y., Vahter, M. (2010). Exposure to lithium and cesium through drinking water and thyroid function during pregnancy: A prospective cohort study. *PLoS ONE* 10(8): e0135282.

Hartmann, B.T., Pang, W.W., Keil, A.D., Hartmann, P.E., Simmer, K. (2007). Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early Human Development* 83: 667–673.

Harvey, D. (2024). *Analytical Chemistry 2.1*. Libre Texts.

Hennet, T., Borsig, L. (2016). Breastfed at Tiffany's. *Trends in Biochemical Sciences* 41(6): 508-518.

Heudi, O., Trisconi, M.J., Blake, C.J. (2004). Simultaneous quantification of vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1022(1e2): 115e23.

HMBANA – Human Milk Banking Association of North America. (2024). Disponible en: <https://www.hmbana.org/>.

Horwitz, W., & Albert, R. J. (2006). The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International* 89(4): 1095–1109.

Hunt, J.R. (2003). Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 633S–639S.

Huppertz, T., Fox, P.F., de Kruif, K.G., Kelly, A.L. (2006). High-pressure-induced changes in bovine milk: A review. *International Journal of Dairy Technology* 59: 58–66.

Huppertz, T., Zobrist, M.R., Uniacke, T., Upadhyay, V., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal* 12: 561–72.

Huppertz, T., Zobrist, M.R., Uniacke, T., Upadhyay, V., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2017). Effect of high pressure and sub-zero temperature on total antioxidant capacity and the content of Vitamin C, fatty acids and secondary products of lipid oxidation in human milk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 67: 117–22.

Hurtado, A.N., Domínguez Sánchez, F.C. (2009). Análisis de correlación y regresión. En: *Probabilidad y Estadística para Ingeniería. Un enfoque moderno*. McGraw-Hill.

Hyun T.H., Tamura, T. (2005). Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review. *Experimental Biology and Medicine* 230: 444–454.

IARC – Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. (2022). Arsenic and arsenic compounds. Disponible en: <https://www.iarc.who.int/>.

Indyk, H.E. (1988). Simplified saponification procedure for the routine determination of total vitamin E in dairy products, foods and tissues by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 113: 1217–1221.

Jensen, R.G. (1995). *Handbook of milk composition*. Academic Press.

Jung, M.Y., Kang, J.H., Choi, Y.S., Lee, D.Y., Lee, J.Y., Park, J.S. (2019). Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of manganese (Mn) in wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). *Food Chemistry* 274: 20.

Karcz, K., Królak-Olejnik, B. (2021). Vegan or vegetarian diet and breast milk composition – a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61(7): 1081–1098.

Keikha, M., Shayan-Moghadam, R., Bahreynian, M., Kelishadi, R. (2021). Nutritional supplements and mother's milk composition: a systematic review of interventional studies. *International Breastfeeding Journal* 16: 1.

Kelleher, S.L., Lönnerdal, B. (2005). Molecular regulation of milk trace mineral homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 328–39.

Kim, S.Y., Yi, D.Y. (2020). Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics* 63(8): 301–309.

Kirel, B., Aksit, M.A., Bulut, H. (2005). Blood lead levels of maternal cord pairs, children and adults who live in a central urban area in Turkey. *Turkish Journal of Pediatrics* 47(2): 125–131.

Kristensen, M.B., Hels, O., Morberg, C., Marving, J., Bügel, S., Tetens, I. (2005). Pork meat increases iron absorption from a 5-day fully controlled diet when compared to a vegetarian diet with similar vitamin C and phytic acid content. *British Journal of Nutrition* 94(1): 78–83.

Krug, F.J., Piovezani Rocha, F.R. (2016). Métodos de preparo de amostras para análise elementar, 2º Ed., EditSBQ, Piracicaba, Brasil.

Kumar, S.S., Chouhan, R.S., Thakur, M.S. (2010). Trends in analysis of vitamin B12. *Analytical Biochemistry* 398: 139–149.

Lawrence, R.A. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatrica* 88(430) (1999) 14–8.

Lawrence, R.A., Lawrence, R.M. (2007). Bioquímica de la leche humana. En: R.A. Lawrence & R.M. Lawrence, *Lactancia materna. Una guía para la profesión médica*. Madrid, Elsevier.

Lebiedzińska, A., Dąbrowska, M., Szefer, P., & Marszałł, M. (2008). High-performance liquid chromatography method for the determination of folic acid in fortified food products. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18(6), 463–467.

León-Sanz, P., de la Cruz, M. L., Martí-Bonmatí, E., García-Merino, A., Rodríguez-García, L. (2021). Composition of human colostrum and mature milk: From physiology to metabolomics. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 24(6): 495–502.

Leotsinidis, M., Alexopoulos, A., Kostopoulou-Farri, E. (2005). Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors. *Chemosphere* 61(2): 238–247.

Leung, A.M., Lamar, A., He, X., Braverman, L.E., Pearce, E.N. (2011). Iodine status and thyroid function of Boston-area vegetarians and vegans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(8): E1303–7.

Lönnerdal, B. (2000). Regulation of mineral and trace elements in human milk: exogenous and endogenous factors. *Nutrition Reviews* 58: 223–9.

Lorençatto, R., Nascimento Monção, D., Araújo Silva, R. (2020). High Throughput, Multi-Element Analysis of Effluents by MP-AES. Application Note. Agilent Technologies.

Luo, Y., Zhang, B., Chen, M., Wang, J., Zhang, X., Gao, W.Y., Huang, J.F., Fu, W.L. (2010). Rapid and simultaneous determination of essential minerals and trace elements in human milk by improved flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) with microwave digestion. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(17): 9396– 9400.

- Ma, L., Shi, H., Lian, K., Diao, Y., Chen, Y., Ma, C., & Kang, W. (2017). Highly selective and sensitive determination of several antioxidants in human breast milk using high-performance liquid chromatography based on Ag(III) complex chemiluminescence detection. *Food Chemistry* 218: 422–426.
- Mac, K., Maya Tromburg, T., Parker, M.T., Morrison, N., O'Connor, S., Weber, C., Kim, U. (2017). Screening donated breast milk in the developing world: Market evaluation and needs identification for rapid and sustainable methods of screening donated milk at human milk banks. *IEEE Global Humanitarian Technology Conference (GHTC)*, San Jose, CA, USA.
- Machado, I., Bergmann, G., Pistón, M. A. (2016). Simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *Food Chemistry* 194: 373–376.
- Machado, I., Dol, I., Rodríguez-Arce, E., Cesio, M.V., Pistón, M. (2016b). Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). *Microchemical Journal* 128: 128–133.
- Macias, S.M., Rodriguez, S., Ronayne de Ferrer, P.A. (2006). Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Archivos Argentinos de Pediatría* 104(5): 423–430.
- Mahato, A., Vyas, S., Chatterjee, N.S. (2020). HPLC-UV estimation of folic acid in fortified rice and wheat flour using enzymatic extraction and immunoaffinity chromatography enrichment: an interlaboratory validation study. *Journal of AOAC International* 103(1): 73–77.
- Martínez-Rojano, H. (2016). Utilidad de un método que determina simultáneamente retinol y tocoferol en leche materna por cromatografía líquida de alta resolución. *Perinatología y Reproducción Humana* 30(4): 151-158.
- Matamoros, N., Santandreu, F., Disalvo, L., Varea, A., Martins, E., Sager, G., González, H.F. (2014). Contenido de vitamina A en leche materna madura después de la pasteurización:

Requerimientos nutricionales del lactante. *Revista Argentina de Salud Pública* 5(19): 11–16.

Mazej, D., Horvat, M., Barbone, F., Stibilj V. (2004). Simple and Rapid Method for Determination of Selenium in Breast Milk by HG-AFS. *Microchimica Acta* 147(1): 73–79.

McMichael, A. J., Vimpani, G.V., Robertson, E.F., Baghurst, P.A., Clark, P.D. (1986). The Port Pirie Cohort Study: Maternal blood lead and pregnancy outcome. *Journal of Epidemiology and Community Health* 40(1): 18–25.

Mikheev, I.V., Karpukhina, E.A., Usol'tseva, L.O., Samarina, T.O., Volkov, D.S., Proskurnin, M.A. (2017). Application of Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry and Hydride Generation for Determination of Arsenic and Selenium in Mineral Water. *Inorganic Materials* 53(14): 1422–1426.

Milkotronic Ltd. (2019). Lactoscan SP Milk Analyzer. Disponible en: [https://www.milkotronic.com/pdfs/LactoscanSP\\_Eng.pdf](https://www.milkotronic.com/pdfs/LactoscanSP_Eng.pdf).

Miller, J.N., Miller, J.C. (2010). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Ashford Colour Press Ltd., England.

Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA.

Mohd-Taufek, N., Cartwright, D., Davies, M., Hewavitharana, A.K., Koorts, P., McConachy, H., Shaw, P.N., Sumner, R., Whitfield, K. (2016). The effect of pasteurization on trace elements in donor breast milk. *Journal of Perinatology* 36(10): 897–900.

Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A. I., López-Sabater, M.C. (2011). Effects of pasteurization and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols, and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry* 124: 697–702.

Moreno-Villares, J.M., Germán-Díaz, M. (2019). Human Milk as a Bioactive Food. In: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*. Academic Press.

Moro, G.E., Arslanoglu, S., Bertino, E., Corvaglia, L., Montirosso, R., Picaud, J.C., Polberger, S., Schanler, R.J., Steel, C., van Goudoever, J., Ziegler, E.E. (2015). Human Milk in Feeding Premature Infants: Consensus Statement. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 61(1): S16–S19.

Moro, G.E., Billeaud, C., Rachel, B., Calvo, J., Cavallarin, L., Christen, L., Escuder-Vieco, D., Gaya, A., Lembo, D., Wesolowska, A., Arslanoglu, S., Barnett, D., Bertino, E., Boquien, C.Y., Gebauer, C., Grovslie, A., Weaver, G.A., Picaud, J.C. (2019). Processing of donor human milk: Update and recommendations from the European Milk Bank Association (EMBA). *Frontiers in Pediatrics* 7: 49.

MSP – Ministerio de Salud Pública (2023). “Día mundial del prematuro”. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/17-noviembre-dia-mundial-del-prematuro-0>

NIH – National Institutes of Health (2024). Nutrient Recommendations and Databases. Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/HealthInformation/nutrientrecommendations.aspx>

Norman, A.W., Henry, H.L. (2015). Hormones of Pregnancy, Parturition and Lactation. In *Hormones*, 3° Ed., Elsevier.

Ohashi, T., Yamaki, M., Pandav, C.S., Karmarkar, M.G., Irie, M. (2000). Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clinical Chemistry* 46(4): 529-536.

Ollilainen, V., Heinonen, M., Linkola, E., Varo, P., Koivistoinen, P. (1989). Carotenoids and retinoids in Finnish foods: Dairy products and eggs. *Journal of Dairy Science* 72: 2257–2265.

OMS – Organización Mundial de la Salud (2018). “Alimentación del lactante y del niño pequeño”. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/279518/A71\\_R9-sp.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/279518/A71_R9-sp.pdf)

OMS/UNICEF – Organización Mundial de la Salud/ Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (1991). “Iniciativa Hospital Amigo del Niño”. Disponible en: <https://iris.paho.org/>

OMS/UNICEF – Organización Mundial de la Salud/ Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (1990). “Lactancia Materna en los 90's: una iniciativa mundial”. Disponible en: <https://worldbreastfeedingweek.org/2021/wp-content/uploads/2021/07/1990-Innocenti-Declaration.pdf>

ONU – Organización de las Naciones Unidas: Asamblea General (1990). Convención sobre los Derechos del Niño, United Nations, Treaty Series, vol. 1577, p. 3, 20. Disponible en: <https://www.refworld.org/es/leg/trat/agonu/1989/es/18815>

Ortega, R.M., López-Sobaler, A.M., Martínez, R.M., Andrés, P., Quintas, M.E. (1997). Influence of vitamin C on the bioavailability of folic acid. *European Journal of Clinical Nutrition* 51(6): 375–380.

Paintal, K. (2011). Integrating breastfeeding in public health programming – scientific facts, current status and future directions. In *Public Health Nutrition in Developing Countries*, Woodhead Publishing, India.

Parrón, J.A., Ripollés, D., Ramos, S.J., Pérez, M.D., Calvo, M., Sánchez, L. (2018). Effect of thermal and high-pressure treatments on the antirotaviral activity of human milk fractions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 47: 262–70.

Pawliszyn, J., Lord, H.L. (2010). *Handbook of Sample Preparation*, 1° Ed., John Wiley & Sons, Inc., Canada.

Peila, C., Moro, G.E., Bertino, E., Cavallarin, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., Cresi, F., Coscia, A. (2016). The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients* 8(8): 477.

Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, T. (2020). AGREE analytical GREENness metric approach and software. *Analytical Chemistry* 92(14): 10076–10082.

Perrin, M.T., Pawlak, R., Judd, N., Cooper, J., Donati, G.L. (2022). Major and Trace Mineral Composition of Milk from Lactating Women Following Vegan, Vegetarian, and Omnivore Diets. *British Journal of Nutrition* 130(6): 1005–1012.

Perrone, L., Di Palma, L., Di Toro, R., Gialanella, G., Moro, R. (1994). Interaction of trace elements in a longitudinal study of human milk from full-term and preterm mothers. *Biological Trace Elements Research* 41: 321–430.

Picaud, J.C., Buffin R. (2017). Human Milk-Treatment and Quality of Banked Human Milk. *Clinics in Perinatology* 44(1): 95–119.

Picciano, M.F. (2001). Nutrient composition of human milk. *Pediatric Clinics of North America* 48(1): 53-67.

Pino, S., Fang, S., Braverman, L.E. (1996). Ammonium persulfate: A safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine. *Clinical Chemistry* 42: 239–43.

Pistón, M., Suárez, A., Bühl, V., Tissot, F., Silva, J., Panizzolo, L. (2020). Influence of cooking processes on Cu, Fe, Mn, Ni, and Zn levels in beef cuts. *Journal of Food Composition and Analysis* 94: 103624.

Powell, M.L., Unger, S.E. (2004). Bioanalytical methods: Challenges and opportunities in drug development. In *Applications of Pharmacokinetic Principles in Drug Development*, Springer New York.

Pozebon, D., Müller, A., Dressler, V.L. (2020). Advances of nitrogen microwave plasma for optical emission spectrometry and applications in elemental analysis: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 35: 2113–2131.

Puente Perpiñán, M., de los Reyes Losada, A., Riccis Salas Palacios, S., Torres Montaña, I., Vaillant Rodriguez, M. (2014). Factores de riesgo relacionados con la anemia carencial en lactantes de 6 meses. *MEDISAN* 18(3): 378.

Qiao, W., Chen, J., Zhang, M., Wang, Y., Yang, B., Zhao, J., Jiang, T., Chen, L. (2022). A cohort study of vitamins contents in human milk from maternal-infant factors. *Frontiers in Nutrition* 9: 993066.

Rayman, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356(9225): 233–241.

rBLH – Red Global de bancos de Leche Humana. (2024). Disponible en: <https://rblh.fiocruz.br/pagina-inicial-rede-blh>

Redecilla Ferreiro, S., López, A.M., Moreno Villares, J.M. (2020). *Anales de Pediatría* 92(5): 306.e1–306.e6

Richter, M., Boeing, H., Grünewald-Funk, D., Heseker, H., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Watzl, B., for the German Nutrition Society (DGE) (2016). Vegan diet. Position of the German Nutrition Society (DGE). *Ernährungs Umschau* 63(04): 92–102.

Rodríguez-Palmero, M., Koletzko, B., Kunz, C., Jensen, R. (1999). Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors. *Clinics in Perinatology* 26(2): 335–359.

- Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., Gayá, A., López-Sabater, M.C. (2008). Effect of pasteurization on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols, and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chemistry* 107: 434–438.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A.I., Lopez-Sabate, M.C. (2006). Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *Journal of Chromatography B* 830: 41–46.
- Rossipal, E., Krachler, M. (1998). Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. *Nutrition Research* 18(1): 11–24.
- Sala-Vila, A., Castellote, A., Rodríguez Palmero, M. (2005). Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation. *Nutrition* 21: 467–473.
- Salam, R.A., Das, J.K., Bhutta, Z.A. (2014). Multiple Micronutrient Supplementation during Pregnancy and Lactation in Low-to-Middle Income Developing Country Settings: Impact on Pregnancy Outcomes. *Annals of Nutrition and Metabolism* 65: 4–12.
- Sandell, E.B., Kolthoff, I. (1937). Micro Determination of iodine by a catalytic method. *Microchimica Acta* 1: 9–25.
- São Bernardo Carvalho, L., Santos Silva, C., Araújo Nóbrega, J., Santos Boa Morte, E., Muniz Batista Santos, D.C., Andrade Korn, M.G. (2020). Microwave induced plasma optical emission spectrometry for multielement determination in instant soups. *Journal of Food Composition and Analysis* 86: 103376.
- Sauberan, J.B. (2019). High-dose vitamins. *Breastfeeding Medicine* 14(5) 287–289.
- Scholz-Ahrens, K., Ahrens, F., Barth, C.A. (2020). Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. *European Journal of Nutrition* 59: 19–34.
- Scholz-Ahrens, K.E., Schaafsma, G., Kip, P., Elbers, F., Boeing, H., Schrezenmeir, J. (2004). Iron-fortified milk can improve iron status in young women with low iron stores. *Milk Science International* 59(5/6): 253–257.
- Schweigert, F. J., Bathe, K., Chen, F., Büscher, U., Dudenhausen, J. W. (2004). Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. *European Journal of Nutrition* 43: 39–44.

Schweigert, F.J., Dudenhausen, J.W. (1992). The protective role of carotenoids and tocopherols in infants and during pregnancy. *The Journal of Nutrition* 122(3 Suppl): 613–620.

Segura, S.A., Ansótegui, J.A., Díaz-Gómez, N.M. (2016). The Importance of Maternal Nutrition during Breastfeeding: Do Breastfeeding Mothers Need Nutritional Supplements? *Anales de Pediatría* 84: 347.e1–347.e7.

Shetty, S. A., Young, M. F., Taneja, S., Rangiah, K. (2020). Quantification of B-vitamins from different fresh milk samples using ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry/selected reaction monitoring methods. *Journal of Chromatography A* 1609: 460452.

Silvestre, D., Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Jareño, E., Romero, F.J. (2008). Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for pasteurization. *Acta Pædiatrica* 97: 1070–1074.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2008). *Principios de análisis elemental*, 6° Ed., Cengage Learning, México D.F., México.

Specker, B.L., Miller, D., Norman, E.J., Greene, H.L., Hayes, K.C. (1988). Nutritional quality of breast milk from mothers following a macrobiotic diet, containing little animal food, compared with the milk of omnivores. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*.

Stanford Medicine Children's Health. (2024). Anatomía de las mamas. Disponible en: <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=anatomy-of-the-breasts-85-P03255>

Suarez-Villa, M., Carrero, C., Granadillo, V., Lastre-Amell, G., Alejandra-Orostegui, M., Delgado, F. (2019). Niveles de cobre y zinc en diferentes etapas de la leche materna y la influencia del estado nutricional de madres lactantes. *Revista Chilena de Nutrición* 46(5): 511-517.

Tanabe, C.K., Hopfer, H., Gilleland, G., Liba, A., Ebeler, S.E., Nelson, J. (2016). Total arsenic analysis in Californian wines with hydride generation – microwave plasma – atomic emission spectroscopy (HG-MP-AES). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31: 1223.

- Tarrago-Trani, M.T., Phillips, K.M., Cotty, M. (2012). Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 12–25.
- Tissot, F., Machado, I. (2020). Evaluation of essential and potentially toxic elements in popcorn: Study of cooking effect and *in vitro* bioaccessibility. *Journal of Food Measurement and Characterization* 14: 1842–1849.
- Tissot, F., Pereira, M., Pistón, M., Ibáñez, F., Dini, S. (2020). Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de Cd, Pb y As en frutas y hortalizas como una alternativa a los métodos estándar de análisis. *INNOTECH* 19: 52–63.
- Tsalev, D.L., Slaveykova, V.I. (1992). Chemical Modification in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 7: 147–153.
- Turan, S., Saygi, S., Kiliç, Z., Acar, O. (2001). Determination of heavy metal contents in human colostrum samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Tropical Pediatrics* 47: 81–85.
- Underwood, M.A. (2013). Human milk for the premature infant. *Pediatric Clinics of North America* 60(1): 189–207.
- Unger, S.L., O'Connor, D.L. (2024). Review of current best practices for human milk banking. *Maternal & Child Nutrition* 20(S4): e13657.
- Ureta-Velasco, N., Keller, K., Escuder-Vieco, D., Fontecha, J., Calvo, M.V., Megino-Tello, J., Serrano, J.C.E., Romero Ferreiro, C., García-Lara, N.R., Pallás-Alonso, C.R. (2023). Human Milk Composition and Nutritional Status of Omnivore Human Milk Donors Compared with Vegetarian/Vegan Lactating Mothers. *Nutrients* 15: 1855.
- Van Zoeren-Grobbe, D., Schrijver, J., Van Den Berg, H., Berger, H.M. (1987). Human milk vitamin content after pasteurization, storage, or tube feeding. *Archives of Disease in Childhood* 62: 161–165.
- Vázquez Román, S., Alonso Díaz, C., Medina López, C., Bustos Lozano, G., Martínez Hidalgo, M.V., Pallás Alonso, C.R. (2009). Puesta en marcha del banco de leche materna donada en una unidad neonatal. *Anales de Pediatría* 71(4): 343–348.

- Vincenzetti, S., Pucciarelli, S., Santini, G., Klimanova, Y., Polzonetti, V., Polidori, P. (2020). B-vitamins determination in donkey milk. *Beverages* 6: 46–54.
- Vollset, M., Iszatt, N., Enger, Ø., Gjengedal, E.L.F., Eggesbø, M. (2019). Concentration of mercury, cadmium, and lead in breast milk from Norwegian mothers: Association with dietary habits, amalgam and other factors. *Science of the Total Environment* 677: 466–473.
- Waldmann, A., Koschizke, J.W., Leitzmann, C., Hahn, A. (2004). Dietary iron intake and iron status of German female vegans: results of the German vegan study. *Annals of Nutrition and Metabolism* 48(2): 103–108.
- Weaver, C.M., Heaney, R.P. (2006). Food sources, supplements, and bioavailability. In: Weaver, C.M., Heaney, R.P. (eds) *Calcium in human health. Nutrition and health*. Humana Press, Totowa.
- Wight, M.E. (2001). Donated human milk for preterm infants. *Journal of Perinatology* 21(4): 249–254.
- Williams, C.B., Jones, B.T., Donati, G.L., Amais, R.S., Fontoura, B.M., Nóbrega, J.A. (2019). Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. *Trends in Analytical Chemistry* 116: 151–157.
- Xavier, A.A.O., Díaz-Salido, E., Arenilla-Vélez, I., Aguayo-Maldonado, J., Garrido-Fernández, J., Fontecha, J., Sánchez-García, A. Pérez-Gálvez, A. (2018). Carotenoid content in human colostrum is associated to preterm/full-term birth condition. *Nutrients* 10: 1654.
- Yamawaki, N., Yamada, M., Kan-No, T. (2005). Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19(2): 171–181.
- Yang, Q., Zhao, Y., Yu, H., Xiong, X., Huang, K. (2024). Recent advances of sample separation and preconcentration techniques for analytical atomic spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews* 59(5): 652–677.

Yoshida, Y. (2013). Analysis of aluminum in beverages using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer (MP-AES). Application note. Agilent Technologies.

Zoeller, R.T., Rovet, J. (2004). Timing of Thyroid Hormone Action in the Developing Brain: Clinical Observations and Experimental Findings. *Journal of Neuroendocrinology* 16: 809–818.

Zhang, L. (2014). Variations in the chemical composition of human milk. In *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*, Elsevier Ltd. Cambridge, United Kingdom.

# **CAPÍTULO 6**

## **ANEXO**

## 6 ANEXO

### 6.1 Presentaciones en eventos

Durante la realización de la maestría el trabajo realizado se ha presentado en diversas instancias:

- Presentación oral en el “6° Encuentro Nacional de Química - ENAQUI6”, realizado del 16 al 18 de octubre de 2019 en Montevideo, Uruguay. "Efecto de la pasteurización sobre los niveles de vitamina A y E en leche humana". J. Santander, A. Rodríguez, L. Panizzolo, I. Machado.
- Presentación de póster en el “5to Congreso Uruguayo de Química Analítica”, realizado del 24 al 26 de octubre de 2018 en Montevideo, Uruguay. "Estudio del efecto de la pasteurización sobre los niveles de vitamina C, cobre, hierro, selenio y zinc en leche humana". J. Santander, A. Rodríguez, L. Panizzolo, I. Machado.
- Presentación e-poster en el “7° Encuentro Nacional de Química – ENAQUI7”, realizado del 3 al 5 de noviembre de 2021 en Montevideo, Uruguay. "Determinación de elementos esenciales y potencialmente tóxicos en leche materna humana de madres uruguayas". J. Santander, A. Rodríguez, L. Panizzolo, I. Machado.
- Presentación de póster en el “8 Encuentro Nacional de Química – ENAQUI8”, a realizarse 18 al 21 de octubre de 2023 en Montevideo, Uruguay. "Evaluación de iodo en leche humana: Efecto de la pasteurización". J. Santander, A. Rodríguez, L. Panizzolo, I. Machado.
- Presentación oral en el evento “9th International Congress & Exhibition on Arsenic in the Environment”, a realizarse del 20 al 24 de octubre en Bhubaneswar, India. “Arsenic and lead monitoring in donated human milk from Uruguayan mothers”. J. Santander, A. Puyol, A. Rodríguez, L. Panizzolo, I. Machado. Presentado por I. Machado.

## 6.2 Publicaciones

- Santander, J., Puyol, A., Rodríguez, A., Panizzolo, L., Machado, I. (2024). Optimization of chromatographic methods for the evaluation of vitamin losses in human milk after Holder pasteurization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 135, 106673.



# Optimization of chromatographic methods for the evaluation of vitamin losses in human milk after Holder pasteurization

Jessica Santander<sup>a</sup>, Arturo Puyol<sup>b</sup>, Analía Rodríguez<sup>c</sup>, Luis Panizzolo<sup>c</sup>, Ignacio Machado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Bioanalítica y Especiación (BIOESP), Área Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Banco de Leche "Rubén Panizza", Centro Hospitalario Pereira Rossell, Administración de los Servicios de Salud del Estado, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Área Química de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Human milk  
Vitamins  
Nutrient losses  
Pasteurization  
Liquid chromatography

## ABSTRACT

Holder pasteurization, a process that consists of heating the sample at 62.5 °C for 30 min, is the most widely used protocol to ensure microbial inactivation in human milk. Aiming to evaluate vitamin losses after pasteurization, three extraction methods and the subsequent chromatographic conditions were optimized. For the simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene a saponification procedure was employed, while folic acid and ascorbic acid were extracted using solvent extractions, followed by high-performance liquid chromatography – diode array detection. Limits of detection were: 0.010 (retinol), 0.081 ( $\alpha$ -tocopherol), 0.011 ( $\beta$ -carotene), 0.008 (folic acid), and 0.012 (ascorbic acid) ( $\text{mgL}^{-1}$ ). Trueness was verified by using a milk-based standard reference material. Concentrations in raw milk samples from a Uruguayan human milk bank were:  $1.5 \pm 0.2/0.38 \pm 0.08$  (retinol),  $12.8 \pm 2.5/2.9 \pm 0.7$  ( $\alpha$ -tocopherol),  $0.58 \pm 0.08/0.067 \pm 0.009$  ( $\beta$ -carotene),  $1.05 \pm 0.20/20.3 \pm 4.7$  (folic acid), and  $55.4 \pm 4.1/36.1 \pm 5.9$  (ascorbic acid) (colostrum/mature,  $\text{mgL}^{-1}$ ). Statistically significant losses ( $p < 0.05$ ) were observed after pasteurization for all studied compounds, ranging from 6.4 % to 14.2 %. Liposoluble vitamins losses were higher in colostrum, probably due to the lower fat concentrations at this stage, while the opposite tendency was observed for hydrosoluble vitamins. Ascorbic acid was the most affected compound. This work represents the first study monitoring vitamins in donated human milk in Uruguay.

## 1. Introduction

Human milk is the only recommended food for infants during the first 6 months of life due to its high quality and cost-effectiveness. This is because it provides several nutrients that promote growth and protect infants against age-related diseases (Martínez-Rojano, 2016). The consumption of human milk in premature newborns offers many benefits, significantly reducing the risk of certain physiological disorders. However, the loss of nutrients in human milk can lead to important deficiencies, that may affect infants' health (Picaud & Buffin, 2017).

Human milk can be classified into three phases: colostrum, intermediate, and mature milk. Colostrum is the secretion that is produced during the first days after childbirth, being rich in immunoglobulins, proteins, liposoluble vitamins and lactoferrin. Transitional milk is produced between the sixth and fourteenth days postpartum, characterized by decreased concentrations of immunoglobulins and total proteins, and increased lactose and total calories. Finally, mature milk, which is secreted from the end of transitional milk until the end of lactation, is

characterized by being richest in fat (Guo, 2014). The chemical composition at each stage is appropriate to the nutrient's requirements of infants. An adequate intake of vitamins is crucial, due to their many vital functions (Guo, 2014; Picciano, 2001; Romeu-Nadal et al., 2006).

To ensure the healthy development of newborns during breastfeeding, it is necessary to provide them adequate amounts of energy and nutrients. However, the volume of milk production is variable between mothers, and is influenced by psychological, physiological, and sociological factors (Macías et al., 2006; Hartmann et al., 2007). In this regard, human milk banks aim to support the breastfeeding of newborns, whose mothers do not have enough milk for their appropriate nutrition, constituting an alternative for the care of premature children (Romeu-Nadal et al., 2008). But milk must be pasteurized in the first place to assure the inactivation of viral and bacterial agents. The most widely used protocol to treat donated human milk is Holder pasteurization, a process that consists of heating the sample at 62.5 °C for 30 min (Matamoros et al., 2014). This process may lead to the loss of sensitive compounds (Picaud & Buffin, 2017).

\* Corresponding author.

E-mail address: [imachado@fq.edu.uy](mailto:imachado@fq.edu.uy) (I. Machado).

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106673>

Received 11 April 2024; Received in revised form 18 August 2024; Accepted 19 August 2024

Available online 24 August 2024

0889-1575/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

The losses of vitamins due to pasteurization have been widely studied in bovine milk, receiving less attention in the case of human milk. In particular, vitamins A, B, C and E are sensitive to heat and therefore their concentrations in human milk may be affected after pasteurization (Vázquez Román et al., 2009; Moro et al., 2019). The vast number of biological functions related to these vitamins, the risk of potential losses due to pasteurization, and the lack of related information in Uruguay, inspired the development of this work. In this context, the aim of this work was to optimize and validate chromatographic methods for the determination of retinol and  $\beta$ -carotene (vitamin A activity),  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E activity), folic acid (vitamin B activity), and ascorbic acid (vitamin C activity) in donated human milk, before and after pasteurization, to evaluate potential losses due to the thermal treatment. This is the first study focused on the evaluation of vitamins in human milk from Uruguayan mothers and the potential losses after Holder pasteurization. The optimized methods provide significant advantages in terms of feasibility and cost-effectiveness compared to traditional approaches, offering faster and more precise results with simple sample preparation procedures, making them highly applicable in both research and clinical settings, that could be extended to other dairy products, making them valuable tools for the broader food industry and the quality assessment of these products.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Calibration curves were assembled by serial dilution of 1000 mg L<sup>-1</sup> stock solutions prepared from the solid vitamins: retinol (93 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA),  $\beta$ -carotene (95 %, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), ascorbic acid (99 %, Merck, Darmstadt, Germany), and  $\alpha$ -tocopherol (98 %, Acros Organics, Geel, Belgium). Potassium hydroxide (KOH) (99 %, Merck, Darmstadt, Germany), acetonitrile, methanol, and hexane (HPLC Grade, Carlo Erba, Milano, Italy) were used for liposoluble vitamins determinations. Orthophosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (85 %, Merck, Darmstadt, Germany), trichloroacetic acid (CCl<sub>3</sub>COOH) (99.0 %, Biopack, Buenos Aires, Argentina), triethylamine (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) (Carlo Erba, Milano, Italy) and glacial acetic acid (Carlo Erba, Milano, Italy) were used for hydrosoluble vitamins determinations. Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$ cm resistivity was obtained from a Millipore™ Direct Q3 UV water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). A standard reference material (SRM) consisting of Infant/Adult Nutritional Formula I (milk-based) NIST 1846a (NIST, Gaithersburg, MD, USA) was used for trueness and precision evaluation of the analytical methods.

### 2.2. Samples

A total of 40 samples were analyzed (n = 10 for colostrum and n = 30 for mature milk) from healthy mothers with full-term gestation, provided by the Human Milk Bank of Centro Hospitalario Pereira Rossell (BLH-CHPR), which has standardized sampling protocols and a validated computerized system that guarantees the traceability of all samples. The donors provided their surplus production in accordance with the BLH-CHPR inclusion criteria and, through informed consent, agreed that a fraction would be used for this research study, previously approved by the Research Ethics Committee of CHPR. Each sample corresponded to a pool of 3 extractions carried out during the same day, stored at -20 °C until processing. A total volume of 12 mL was used for each fraction, raw and pasteurized. Holder pasteurization was carried out at a temperature of 62.5 °C for 30 minutes in a water bath, according to the BLH-CHPR safety protocol. Once the process was completed, the samples were quickly cooled to re-enter the cold chain. Finally, they were transferred and stored in polypropylene tubes at -18 °C in the Faculty of Chemistry. It should be noted that this work has also the approval of the Human Research Ethics Commission of the Faculty of

Chemistry, UdelaR (Exp. N° 101900-000832-19).

### 2.3. Sample preparation procedures for vitamins extraction

For the simultaneous determination of retinol,  $\beta$ -carotene, and  $\alpha$ -tocopherol an extraction procedure including a saponification, followed by a liquid-liquid separation, and a subsequent preconcentration step was performed. The optimized procedure consisted of mixing 3.0 mL of milk with 0.15 g of ascorbic acid (as an antioxidant agent) and 6.00 mL of a 16 % (m/v) KOH solution in methanol, and heating for 30 minutes at 40 °C. Then it was allowed to cool down and 3.0 mL of hexane were added, homogenized in a vortex, and allowed to rest for another 30 minutes. The hexane phase was removed with a pipette and placed in a clean tube. The solvent was evaporated by a stream of nitrogen (99.99 %, Air Liquide, Montevideo, Uruguay) and in the absence of light. The residue was reconstituted in 1.0 mL of methanol. Finally, the solutions obtained were filtered through 0.45  $\mu$ m polytetrafluoroethylene filters (Sartorius, Göttingen, Germany) and placed in amber vials (Chotyakul et al., 2014; Martínez-Rojano, 2016; Xavier et al., 2018).

For the extraction of folic acid, 1.0 mL of sample was placed in a conical polypropylene tube, 0.1 g of trichloroacetic acid (TCA) was added and the mixture was shaken for 10 min in a Vibrax-VXR orbital shaker (IKA, Wilmington, NC, USA). Subsequently, the mixture was centrifuged for 10 min at 2500 g and the first supernatant was recovered. To the precipitate obtained, 1 mL of 4 % w/v TCA was added, mixed for 10 min, and centrifuged again under the same conditions. After centrifugation, both supernatants were combined and brought to a final volume of 5.0 mL with 4 % m/v TCA. The resulting solution was filtered through 0.45  $\mu$ m nylon filters (Sartorius, Göttingen, Germany) and placed in amber vials (Vincenzetti et al., 2020).

For the determination of ascorbic acid liquid-liquid extractions were carried out. For this task, 1.00 mL of milk sample was taken and 1.00 mL of 0.5 % v/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> at pH=2.8 was added. The mixtures obtained were vortexed for 1 min and then centrifuged at 2500 g for 15 minutes. The resulting solution was filtered through 0.45  $\mu$ m nylon filters (Sartorius, Göttingen, Germany) and placed in amber vials (Romeu-Nadal et al., 2006).

Samples were protected from light by covering the tubes with aluminum foil and working under subdued lighting conditions in all cases.

### 2.4. Optimization of vitamins extraction conditions

For the optimization of the extraction conditions 2<sup>2</sup> factorial designs were performed (two variables and two levels). Different variables were assayed for each of the three extraction procedures: saponification temperature and saponification time (retinol,  $\beta$ -carotene, and  $\alpha$ -tocopherol extraction), agitation time and number of extractions (folic acid extraction), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> volume and centrifugation time (ascorbic acid extraction). The evaluated response was the mean percentage recovery %R by comparing with the corresponding certified values of the SRM. The experimental conditions are shown in Table 1. The selected conditions were chosen after a thorough revision of the existing scientific literature on the matter, aiming to find the simplest sample treatment conditions, using the smallest possible amounts of solvents, and the shortest extraction times, that provided quantitative results. The optimization was carried out through recovery studies by comparing the experimental concentration obtained for each analyte after the analysis of the SRM using the proposed method, and the corresponding certified value. This comparison was expressed as percentage recovery %R. The optimal conditions for sample preparation described in Section 2.3 were selected after evaluating the percentage recovery estimated as %R = [experimental concentration (mg kg<sup>-1</sup>)/certified concentration (mg kg<sup>-1</sup>)]  $\times$  100, for each experiment (dry basis). The simplest and fastest conditions with an %R statistically equal to 100 % were selected for

**Table 1**Experimental conditions used for each 2<sup>2</sup> factorial design using the SRM.

| Experiment | Retinol, $\beta$ -carotene, $\alpha$ -tocopherol |                           | Folic acid           |                       | Ascorbic acid                              |                           |
|------------|--------------------------------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
|            | Saponification temperature (°C)                  | Saponification time (min) | Agitation time (min) | Number of extractions | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> volume (mL) | Centrifugation time (min) |
| 1          | 30                                               | 20                        | 5                    | 1                     | 1                                          | 10                        |
| 2          | 40                                               | 20                        | 10                   | 1                     | 2                                          | 10                        |
| 3          | 30                                               | 30                        | 5                    | 2                     | 1                                          | 15                        |
| 4          | 40                                               | 30                        | 10                   | 2                     | 2                                          | 15                        |

subsequent validation. Spiked human milk samples were also evaluated to supplement the recovery studies of the SRM by spiking samples with appropriate volumes of each standard solution prior to extraction.

## 2.5. Analytical determinations of the vitamins

Analytical determinations of retinol,  $\beta$ -carotene, and  $\alpha$ -tocopherol were performed by reversed-phase liquid chromatography with diode array detection (RP-HPLC-DAD) in a Shimadzu Prominence system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) in the same run, using a Hypersil BDS C18 column (150  $\times$  4.6 mm; 5  $\mu$ m) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The mobile phase consisted of acetonitrile: methanol (65:35 v/v) flowing at 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 100  $\mu$ L. The monitoring wavelengths were 290 ( $\alpha$ -tocopherol), 325 nm (retinol), and 450 nm ( $\beta$ -carotene) (Martínez-Rojano, 2016; Xavier et al., 2018).

Analytical determinations of folic acid were performed by RP-HPLC-DAD in a Shimadzu Prominence system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A C18 column (100  $\times$  4.6 mm; 5  $\mu$ m) was used as the stationary phase. The mobile phase was composed of methanol: 0.5 % v/v triethylamine solution + 2.4 % v/v glacial acetic acid (15:85 v/v). Analyzes were performed in isocratic mode at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 50  $\mu$ L. The determinations were carried out at 283 nm (Vincenzetti et al., 2020).

Analytical determinations of ascorbic acid were performed by RP-HPLC-DAD in a Shimadzu Prominence system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A mixture of 0.1 % v/v acetic acid: methanol (95:5 v/v), flowing at 1.2 mL min<sup>-1</sup> in isocratic mode, was used as the mobile phase. A Zorbax Eclipse Plus C18 column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used as the stationary phase. The injection volume was 50  $\mu$ L. The monitoring wavelength was 254 nm (Romeu-Nadal et al., 2006).

## 2.6. Determination of total fat concentration

To determine this important quality parameter, the Lactoscan SP (Milkotronic, Nova Zagora, Bulgaria) ultrasonic milk analyzer was used, which was specifically calibrated to work with human milk. The measurements were carried out directly on the samples, without the need for sample treatment (Milkotronic Ltd., 2019).

## 2.7. Statistical analysis

Normal distribution was verified by Kolmogórov-Smirnov test. The differences between the analytes concentrations in the samples were tested by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's *t*-test. The number of replicates employed was *n* = 10 for colostrum and *n* = 30 for mature milk, respectively. Also, the Student's *t*-test was used to compare the experimental means obtained for the SRM with the corresponding certified values during trueness evaluation (*n* = 6). Differences among mean concentrations at a 5 % significance level (*p* < 0.05) were considered statistically significant (Miller & Miller, 2010). Statistical analyses were performed using MS Excel®.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of the extraction procedures

Before its application to the analysis of human milk samples, the analytical methods were optimized and validated for the determination of the studied vitamins (retinol,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol, folic acid, and ascorbic acid) based on the recommendations of the Eurachem Guide (Eurachem, 2014). The results of the optimization by means of the 2<sup>2</sup> factorial designs are shown in Table 2.

As it can be observed in Table 2, the five analyzed compounds were completely recovered using the conditions of Experiment 4. Only for ascorbic acid, a complete recovery was also obtained after performing Experiment 3. Hence, for retinol,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol, and folic acid, the conditions described in Experiment 4 were selected, while for ascorbic acid the conditions described in Experiment 3 were employed, as shown in Section 2.3. Experiment 3 was chosen to perform ascorbic acid determinations, since it involved a lower amount of extraction solvent (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), being more aligned with Green Analytical Chemistry principles (Gatuszka et al., 2012).

Highly sensitive detection methods are required for the quantification of for retinol,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol. In general, liposoluble vitamins are usually analyzed after a saponification procedure. However, the efficiency of these extraction methods can vary according to the sample, and thus must be thoroughly optimized for each particular study. In this case, saponification facilitated vitamin separation from milk fat, converting fat into fatty acids and glycerol. Selecting the appropriate saponification temperature and extraction time is critical for achieving efficient recovery of lipophilic vitamins from the sample while preserving their integrity. This involves balancing factors such as reaction kinetics, solubility enhancement, milk emulsification, equilibrium establishment, and minimizing vitamins degradation (Chotyakul et al., 2014). Generally, higher temperatures accelerate the reaction, leading to faster extraction, however, excessively high temperatures can also degrade these sensitive compounds. The use of ascorbic acid as antioxidant was also tested. The same procedure described in Section 2.3 without this reagent showed percentage recoveries around 60 % for all three compound, demonstrating its relevance during sample preparation in the preservation of analytes. According to previous works, antioxidants allow separation of individual compounds as single peaks without interferences during chromatography (Chotyakul et al., 2014). After saponification, a liquid-liquid extraction with hexane was performed, which is the most commonly used solvent for this purpose. Dichloromethane was also evaluated in this step; however, it yielded lower percentage recoveries (~65 %) than hexane (~100 %). Finally, hexane

**Table 2**Results obtained after the 2<sup>2</sup> factorial design using the SRM.

| Experiment | Percentage recovery (%R) |                   |                      |            |               |
|------------|--------------------------|-------------------|----------------------|------------|---------------|
|            | Retinol                  | $\beta$ -carotene | $\alpha$ -tocopherol | Folic acid | Ascorbic acid |
| 1          | 75                       | 70                | 79                   | 81         | 84            |
| 2          | 79                       | 79                | 82                   | 91         | 92            |
| 3          | 85                       | 83                | 87                   | 90         | 100           |
| 4          | 100                      | 99                | 99                   | 100        | 101           |

was evaporated by a stream of nitrogen in the absence of light, to avoid decomposition of the studied analytes, during the last step. In this case, a thermal evaporation using a water bath at 60 °C was also studied, as recommended by other authors (Martínez-Rojano, 2016), but recoveries were not satisfactory (~75 %), thus this technology was discarded for this purpose, while the evaporation under a stream of nitrogen was selected.

Extracting folic acid from human milk samples can be challenging due to the complexity of the matrix. In this work an acid precipitation pouring an appropriate amount of solid TCA to the milk sample to precipitate proteins and other macromolecules was performed (Fatima et al., 2019). According to the literature, the final TCA concentration should be between 5 % and 20 % w/v. In this work a 10 % w/v TCA concentration was employed, as a compromise, while the subsequent washing was performed with a 4 % v/v solution, aiming to use the least possible amount of TCA, according to the principles of Green Analytical Chemistry (Gałuszka et al., 2012). Also, to ensure thorough mixing of the TCA solution with the milk sample, an orbital shaker was successfully employed. This shaker was coupled to a 36-position tube rack, allowing the preparation of 36 samples at the same time. Orbital shaking was also compared to magnetic stirring, as suggested by Vincenzetti et al., 2020, employing a digital 8-positions multi-point magnetic stirrer. Although results were comparable in both cases, the sample throughput using the orbital shaker was much higher, allowing the use of a single tube for each sample, and thus it was the selected technology. Finally, the centrifugation of the TCA-treated milk sample is mandatory to separate the precipitated proteins and other macromolecules from the supernatant containing the analyte. This step was critical for a quantitative extraction, as shown in Table 2, requiring a centrifugation time of 10 min at 2500 g.

When extracting ascorbic acid from human milk, it is essential to follow a systematic approach to ensure accurate and reliable results, especially during sample preparation. There are several extraction methods available for ascorbic acid, including solvent extraction, solid-phase extraction, and liquid-liquid extraction. In this case the liquid-liquid extraction using orthophosphoric acid turned out to be the most suitable option, as recommended by other authors (Romeu-Nadal et al., 2006; Tarrago-Trani et al., 2012). Orthophosphoric acid is a common solvent for extracting ascorbic acid from milk and other biological samples, as it effectively precipitates proteins and other interfering substances while stabilizing the analyte. As it can be observed in Table 2, the centrifugation time poses a big effect over the extraction efficiency. The centrifugation of human milk samples to separate the fat layer from the aqueous phase is required, while the removal of the fat layer must be carefully performed to avoid losing any aqueous fraction containing the analyte. The extraction using TCA was also tested under optimized conditions, which led to an overestimation of the vitamin. This could be explained by the fact that orthophosphoric acid is selective for ascorbic acid and does not precipitate other milk components to the same extent as TCA. This selectivity can result in a cleaner extract with less interference from proteins and other substances. Orthophosphoric acid is relatively stable and does not undergo degradation or reaction with ascorbic acid under acidic conditions, unlike TCA (Chebrolu et al., 2012).

### 3.2. Optimization of the chromatographic conditions

The optimization of the chromatographic conditions for the simultaneous determination of retinol,  $\beta$ -carotene, and  $\alpha$ -tocopherol was performed using the Hypersil BDS C18 column. The first mobile phase tested was methanol:water (95:5 v/v), which showed a good chromatographic separation, although the retention time of retinol was excessively short, and resolution was compromised, while the retention time for  $\beta$ -carotene was excessively long, suggesting that methanol might be too polar for the elution of the latter. Similar results were observed using methanol:acetonitrile (90:10 v/v) as the mobile phase.

Thus, in order to improve the chromatographic separation, methanol concentration was decreased until reaching an optimum mobile phase consisting of acetonitrile:methanol (65:35 v/v). These conditions are similar to those reported by other authors (Chotyakul et al., 2014). The injection volume was set to 100  $\mu$ L to compensate for the lower sensitivity of the UV detector. The flow rate was set to 1.5 mL min<sup>-1</sup> to lower the retention time of  $\beta$ -carotene and avoid excessive broadening. These conditions allowed a total run of 16 min. Tetrahydrofuran was used as a third solvent, as recommended by Andrés et al., 2014, employing a mobile phase composed by acetonitrile:methanol:tetrahydrofuran (65:30:5 v/v), which did not improve the chromatographic separation and resulted in a longer run, thus it was discarded for this application. Fig. 1 shows typical chromatograms of vitamin standards and a human milk sample extraction, showing a total run of 16.0 min.

The choice of mobile phase for folic acid determination by HPLC-DAD is crucial for achieving optimal separation and detection. The mobile phase composition typically consists of mixtures methanol:water. However, hydrosoluble vitamins such as B9 present particular chemical characteristics related to stability, polarity, and acidity (Albalá-Hurtado et al., 1997). Aiming to achieve optimum chromatographic conditions, triethylamine and acetic acid were used as additives to adjust the pH of the mobile phase to 3.6 and improve peak shape and resolution. Finally, the selected mobile phase was composed of methanol: 0.5 % v/v triethylamine + 2.4 % v/v glacial acetic acid in water (15:85 v/v). When the proportion of methanol was increased to 20 % folic acid eluted in a shorter time, but resolution was poor due to overlapping with peaks from the matrix. The use of a mobile phase with 15 % of methanol increased the total time of the analysis but provided a better resolution. The pH of the mobile phase was previously adjusted to 3.6, as recommended by Vincenzetti et al., 2020, since it has been previously reported as an extremely critical factor for the separation and determination of B vitamins. Fig. 2 shows typical chromatograms of the folic acid standard and a human milk sample extraction.

The optimization of the chromatographic conditions for the determination of ascorbic acid was performed using the Zorbax Eclipse Plus C18 column. The first mobile phase tested was 0.02 % w/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: acetonitrile (95:5 v/v) as recommended by Tarrago-Trani et al., 2012 at a flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>, with ascorbic acid peak eluting at about 8.0 min. However, the peak shape obtained looked deformed when the sample was injected. To overcome this issue, the mobile phase was changed to 0.02 % w/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:methanol (95:5 v/v). Finally, the optimum mobile phase consisted of 0.1 % v/v acetic acid: methanol (95:5 v/v), as recommended by Romeu-Nadal et al., 2008, flowing at 1.2 mL min<sup>-1</sup>, which showed a good chromatographic separation and excellent peak shape after the injection of milk samples. Fig. 3 shows typical chromatograms of the ascorbic acid standard and a human milk sample extraction.

### 3.3. Validation of analytical methods

Once the analytical method was optimized, the validation procedure was performed. The figures of merit evaluated were as follows: linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), precision, and trueness. The results obtained for each analyte are summarized in Table 3.

Linearity was evaluated for each compound by constructing six-point calibration curves, each level in duplicate. It was verified in a suitable range for this application, up to 1.0 mg L<sup>-1</sup> (retinol and  $\beta$ -carotene), up to 10.0 mg L<sup>-1</sup> ( $\alpha$ -tocopherol), and up to 100.0 mg L<sup>-1</sup> (folic acid and ascorbic acid), respectively, using the lack-of-fit test (Miller & Miller, 2010). Determination coefficients (R<sup>2</sup>) were greater than 0.999 in all cases.

The LOD and LOQ were calculated for each analyte as 3 s<sub>b</sub>/b and 10 s<sub>b</sub>/b, respectively, where s<sub>b</sub> was the standard deviation of 10 replicates of a blank sample and b was the slope of the calibration curve. The obtained LOQ values were 0.033 mg L<sup>-1</sup> (retinol), 0.27 mg L<sup>-1</sup>

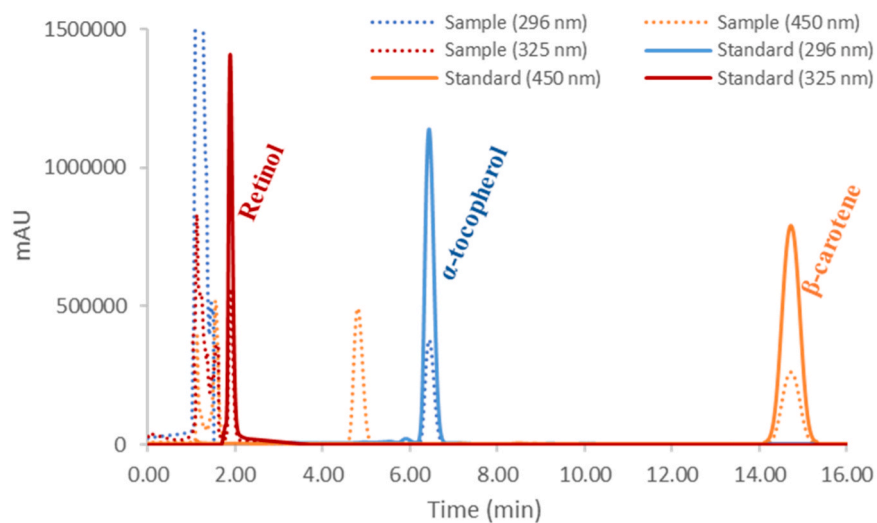


Fig. 1. Overlapped chromatograms for a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  standard solution of retinol,  $\alpha$ -tocopherol, and  $10 \text{ mg L}^{-1}$   $\beta$ -carotene, and a human milk sample extraction.

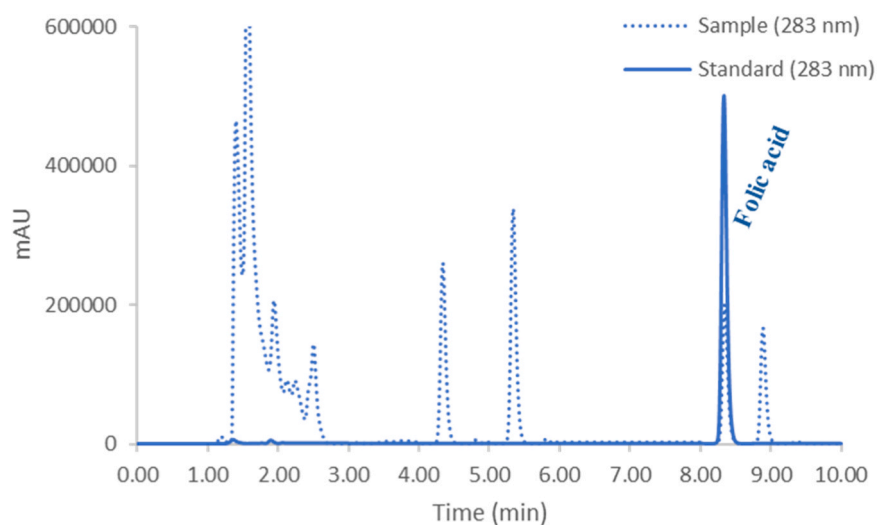


Fig. 2. Overlapped chromatograms for a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  standard solution of folic acid, and a human milk sample extraction.

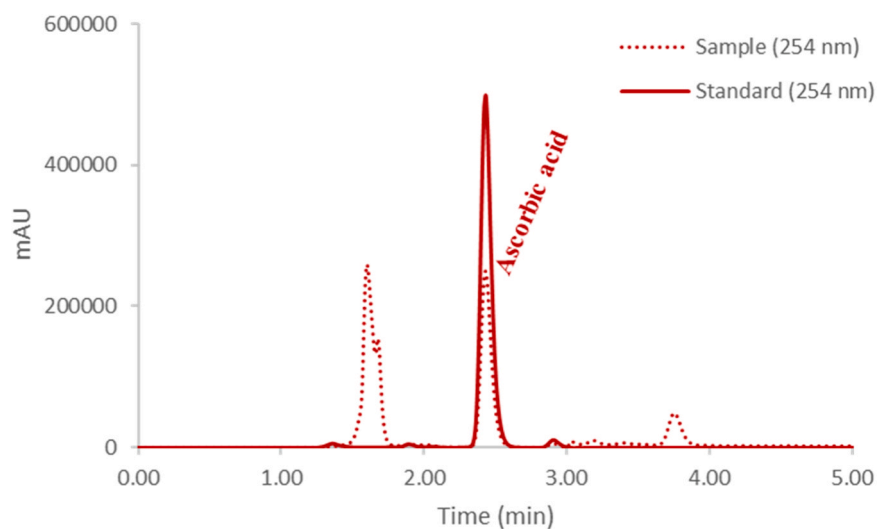


Fig. 3. Overlapped chromatograms for a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  standard solution of ascorbic acid, and a human milk sample extraction.

**Table 3**

Main figures of merit obtained for each analyte after validation.

| Parameter                                      | Retinol   | $\alpha$ -tocopherol | $\beta$ -carotene | Folic acid  | Ascorbic acid |
|------------------------------------------------|-----------|----------------------|-------------------|-------------|---------------|
| Lineal range (mg L <sup>-1</sup> )             | 0.033–1.0 | 0.27–10.0            | 0.037–1.0         | 0.027–100.0 | 0.40–100.0    |
| LOD (mg L <sup>-1</sup> ) (3 $\sigma$ , n=10)  | 0.010     | 0.081                | 0.011             | 0.008       | 0.012         |
| LOQ (mg L <sup>-1</sup> ) (10 $\sigma$ , n=10) | 0.033     | 0.27                 | 0.037             | 0.027       | 0.040         |
| Precision (RSD%, n=6)                          | 5.8*      | 6.2*                 | 7.0*              | 6.8*        | 5.7*          |
| Trueness (R%, n=6)                             | 101*      | 99*                  | 98*               | 98*         | 100*          |

\*Obtained using SRM NIST 1846a

( $\alpha$ -tocopherol), 0.037 mg L<sup>-1</sup> ( $\beta$ -carotene), 0.027 mg L<sup>-1</sup> (folic acid), and 0.040 mg L<sup>-1</sup> (ascorbic acid), respectively, being suitable for the objectives of this work, since they were considerably lower than the concentrations obtained in the analyzed human milk samples. These limits agreed with those previously reported by other authors in similar chromatographic conditions (Chotyakul et al., 2014; Lebiedzinska et al., 2008; Ma et al., 2017).

Precision was estimated as repeatability and expressed as percentage relative standard deviation (%RSD) after the analysis of the previously mentioned SRM NIST 1846a (n = 6). It turned out to be lower than 10 % in all cases, which was considered suitable for this application, considering the Horwitz theory about variability at trace levels, since the obtained %RSD were far below 30 % (Horwitz & Albert, 2006).

For trueness evaluation, Student's *t*-tests were performed to compare the obtained values with the certified values of the each SRM (n = 6). Experimental *t*-values obtained for all compounds after the analysis of the SRM were below the theoretical *t* (0.05, 5) = 2.57, indicating that at the 95 % confidence level, the experimental concentrations did not differ significantly from the certified ones (Miller & Miller, 2010). Spiked human milk samples were also evaluated, in order to supplement the recovery studies of the SRM, considering potential matrix differences. The recovery results of these spiked samples showed %R in the range 97 – 104 % for all the analyzed compounds.

In view of the results obtained after trueness and precision evaluation, the analytical methods were considered accurate for the determination of the studied vitamins in human milk samples.

A comparison of the limits of detection obtained in this work, with the limits reported by other authors, is shown in Table 4. As it can be observed, the LOD values obtained in this work were between 5 and 80 times lower than those reported by Andrés et al. in milk-based beverages by HPLC-DAD (Andrés et al., 2014). Also, the LOD obtained for folic acid in this work is 2.5 times lower than that reported by Mahato et al., 2020 in rice using HPLC-DAD. Furthermore, the LOD obtained for ascorbic acid is 4.5 times lower than that reported by Ferin et al., 2013 in human plasma employing ion-exclusion HPLC-DAD. However, lower LOD values were obtained by Chotyakul et al., 2014 for retinol,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene in cow milk using a similar chromatographic approach, which might be explained by the fact that these authors used twice the amount of sample used in this work and the same final volume. On the other hand, the coupling of similar chromatographic conditions to

different detection systems such as coulometric electrochemical detection (CLD) or chemiluminescence detection (CLD) can improve the limits of detection of the analytical method (Ma et al., 2017; Mahato et al., 2020).

#### 3.4. Vitamins determinations in donated human milk samples

Once the validation process was completed, the analysis of human milk samples provided by the human milk bank was conducted. A total of 40 samples (10 colostrum and 30 mature milks), before and after pasteurization, were analyzed. Table 5 shows the average concentrations obtained for each compound, separated by colostrum and mature milk, raw (R) and pasteurized (P), as well as the percentage of loss after pasteurization. On the other hand, total fat contents were  $4.5 \pm 1.1$  % w/v (colostrum) and  $7.0 \pm 0.5$  % w/v (mature milk), respectively.

Mean retinol and  $\beta$ -carotene levels expressed in terms of total fat were  $33.3 \mu\text{g g}^{-1}$  (colostrum)/  $5.42 \mu\text{g g}^{-1}$  (mature milk) and  $12.8 \mu\text{g g}^{-1}$  (colostrum)/  $0.96 \mu\text{g g}^{-1}$  (mature milk), respectively. It can be said that retinol levels found in Uruguayan mothers agreed with those previously reported by Martínez-Rojano, 2016 in Mexican mothers, Matamoros et al., 2014 in Argentinian mothers, and Ollilainen et al., 1989 in Finnish mothers. Likewise,  $\beta$ -carotene levels agreed with levels reported by Xavier et al., 2018 in Spanish mothers. In general terms,  $\beta$ -carotene levels obtained in this work are in the same order of magnitude and follow similar trends regarding the transition from colostrum to mature milk, as reported in the literature (Giuliano et al., 1994; Gossage et al., 2002). According to Giuliano et al., 1994 carotenoid content can fluctuate throughout the day due to interindividual differences, while colostrum composition does not represent the stabilized nutrient content of mature milk. Thus, the obtained data should be carefully evaluated since the carotenoid content in colostrum is significantly higher than in mature milk (Xavier et al., 2018). The average decrease in  $\beta$ -carotene levels by a factor of 8 obtained in this work is similar to that reported by Schweigert et al., 2004. On the other hand,  $\alpha$ -tocopherol levels agreed with those previously reported by Martínez-Rojano, 2016 in Mexican mothers and by Romeu-Nadal et al., 2008 in Spanish mothers. The vitamin E content in human milk is highly variable and occurs mainly as  $\alpha$ -tocopherol. Compared to the other isomers,  $\alpha$ -tocopherol is less stable during processing and storage but has the highest biological activity with beneficial antioxidant effects in

**Table 4**

Comparison of the detection limits of various HPLC methods for the determination of the studied compounds.

| Technique              | Sample               | LOD (mg L <sup>-1</sup> ) |            |           |        |       | Reference |
|------------------------|----------------------|---------------------------|------------|-----------|--------|-------|-----------|
|                        |                      | R                         | $\alpha$ T | $\beta$ C | FA     | AA    |           |
| HPLC-DAD               | Human milk           | 0.011                     | 0.009      | -         | -      | -     | [1]       |
| HPLC-DAD               | Cow milk             | 0.006                     | 0.027      | 0.004     | -      | -     | [18]      |
| HPLC-DAD               | Milk-based beverages | 0.050                     | 0.600      | 0.900     | -      | -     | [22]      |
| HPLC-CED               | Food products        | -                         | -          | -         | 0.0013 | -     | [24]      |
| HPLC-CLD               | Human milk           | -                         | -          | -         | -      | 0.008 | [25]      |
| HPLC-DAD               | Rice                 | -                         | -          | -         | 0.020  | -     | [27]      |
| ion-exclusion HPLC-DAD | Human plasma         | -                         | -          | -         | -      | 0.054 | [28]      |
| HPLC-DAD               | Human milk           | 0.010                     | 0.081      | 0.011     | 0.008  | 0.012 | This work |

CED: coulometric electrochemical detection, CLD: chemiluminescence detection, DAD: diode array detection, R: retinol,  $\alpha$ T:  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ C:  $\beta$ -carotene, FA: folic acid, AA: ascorbic acid.

**Table 5**Retinol,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, folic acid, and ascorbic acid concentrations in the analyzed milk samples.

| Compound             | Concentration (mg L <sup>-1</sup> ) |                 | Average loss (%) | Concentration (mg L <sup>-1</sup> ) |                   | Average loss (%) |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------------|-------------------|------------------|
|                      | Colostrum (R)                       | Colostrum (P)   |                  | Mature (R)                          | Mature (P)        |                  |
| Retinol              | 1.5 $\pm$ 0.2                       | 1.3 $\pm$ 0.1   | 10.8*            | 0.38 $\pm$ 0.08                     | 0.38 $\pm$ 0.08   | 6.9*             |
| $\alpha$ -tocopherol | 12.8 $\pm$ 2.5                      | 11.2 $\pm$ 0.6  | 12.1*            | 2.9 $\pm$ 0.7                       | 2.7 $\pm$ 0.6     | 7.0*             |
| $\beta$ -carotene    | 0.58 $\pm$ 0.08                     | 0.52 $\pm$ 0.01 | 11.1*            | 0.067 $\pm$ 0.009                   | 0.062 $\pm$ 0.010 | 6.4*             |
| Folic acid           | 1.05 $\pm$ 0.20                     | 0.95 $\pm$ 0.23 | 9.5 *            | 20.3 $\pm$ 4.7                      | 18.0 $\pm$ 5.2    | 11.3*            |
| Ascorbic acid        | 55.4 $\pm$ 4.1                      | 48.6 $\pm$ 5.1  | 12.2*            | 36.1 $\pm$ 5.9                      | 31.0 $\pm$ 5.1    | 14.2*            |

R) raw, P) pasteurized. Expressed as: mean  $\pm$  standard deviation (n = 10 for colostrum and n = 30 for mature milk). \* Statistically significant differences (p < 0.05).

disease prevention. Environmental factors such as oxygen, light, temperature, and also intrinsic factors such as water activity, fat content and pH influence its stability (Chotyakul et al., 2014). According to Picciano (2001) the content of  $\alpha$ -tocopherol is higher in colostrum around 10 mg L<sup>-1</sup>, decreasing and stabilizing in mature milk reaching 3–4 mg L<sup>-1</sup>, which agrees with the tendency observed in this work. Likewise, the average losses observed after pasteurization were statistically significant (p < 0.05), namely 7.0 % (mature milk) and 12.1 % (colostrum), respectively. A higher loss after pasteurization was also observed for retinol and  $\beta$ -carotene in colostrum, which can be explained by the differences in the fat content of both stages. As can be seen in Table 5, the fat content is approximately 35 % lower in colostrum, which may result in less retention of fat-soluble vitamins during the heat treatment. These losses observed for  $\alpha$ -tocopherol are similar to those reported by Romeu-Nadal et al., 2008.

Ascorbic acid levels obtained in this work agree with those reported by Romeu-Nadal et al., 2008 and Moltó-Puigmartí et al., 2011 in Spanish mothers. Likewise, the approximately 30 % lower levels in mature milk compared to colostrum agreed with previous data reported in the literature (Guo, 2014). Regarding losses after pasteurization, statistically significant (p < 0.05) average decreases of 12.2 % (colostrum) and 14.2 % (mature milk) were observed, which agreed with previous values reported in the literature (Romeu-Nadal et al., 2008; Moltó-Puigmartí et al., 2011). These losses are related to the susceptibility of the compound to increasing temperature. When milk samples are exposed to high temperatures, light, or oxygen, as well as the presence of some heavy metals such as Cu or Fe, ascorbic acid can be oxidized to dehydroascorbic acid. The latter, although it has vitamin C activity, since it can be reconverted into ascorbic acid in the human body, is very unstable and is mainly lost as diketogulonic acid, which does not show activity (Moltó-Puigmartí et al., 2011). For this reason, monitoring ascorbic acid in donated human milk is of great relevance to avoid or minimize the incidence of certain disorders in infants.

Regarding folic acid levels, it can be said that the levels found in Uruguayan mothers agreed with those reported in the literature (Guo, 2014; García-López, 2011), while following similar trends with respect to the transition from colostrum to mature milk as shown in previous data (García-López, 2011). The variability in folic acid content is due to interindividual differences in maternal dietary intake from food sources of this vitamin. Regarding losses after pasteurization, statistically significant decreases of 8.6 % (colostrum) and 11.3 % (mature milk) were observed, which are related to the susceptibility of the compound to increasing temperature and contact with the atmospheric oxygen. Despite these losses, the values would still be appropriate for proper infant feeding. Furthermore, the obtained values are considerably higher than those reported in other animal milks (Shetty et al., 2020).

The results obtained in this work suggest that ascorbic acid would be slightly more unstable to heat treatment than the other studied compounds. Therefore, the monitoring of this compound would be a good quality indicator for donated human milk. In this regard, ascorbic acid has been already proposed as a biomarker of oxidative stress in biological samples (Romeu-Nadal et al., 2008).

The loss of some biologically active components as a result of Holder pasteurization is the main limit to the spread of donor human milk

utilization in the feeding of preterm infants. Many alternatives have raised in the last few years to overcome this and other issues, being the most studied processing techniques high-temperature-short-time (HTST) pasteurization, high pressure processing (HPP), and ultraviolet-C (UV-C) irradiation (Moro et al., 2019). These alternative methods offer various advantages and disadvantages in terms of effectiveness, nutritional preservation, and feasibility for large-scale production. Thus, researchers continue to explore and develop new technologies in order to ensure food safety and nutritional quality.

#### 4. Conclusions

The proposed extraction and purification procedures were simple, fast, and accurate as well as suitable for the proposed objectives, as confirmed by the figures of merit obtained after validation, constituting efficient tools for the quantitative determination of the studied compounds. A higher concentration of vitamins was observed in colostrum compared to mature milk, except for folic acid, which showed an opposite tendency, as expected. Likewise, statistically significant decreases were observed for all vitamins after pasteurization, between 6.4 % and 14.2 %. These losses were more significant for liposoluble vitamins in colostrum, which may be explained by the lower fat concentration at this stage. The obtained results will contribute to the compositional knowledge of this food, making advances in human nutrition, while possibly helping to evolve food-based strategies to improve human milk treatment in the future.

#### Funding sources

This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-VUSP Project 53/2019).

#### Author statement

We declare that this manuscript is original, has not been published before and is not currently being considered for publication elsewhere.

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process, responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs.

#### CRediT authorship contribution statement

**Luis Panizzolo:** Writing – original draft, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition. **Ignacio Machado:** Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Arturo Puyol:** Writing – original draft, Formal analysis, Data curation. **Analía Rodríguez:** Writing – original draft, Supervision, Methodology, Investigation. **Jessica Santander:** Writing – original

draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data Availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-VUSP Proyect 53/2019), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) and PEDECIBA-Química.

## References

- Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Mariné-Font, A., 1997. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 778, 247–253. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00387-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00387-7).
- Andrés, V., Villanueva, M.J., Tenorio, M.D., 2014. Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and  $\beta$ -carotene in milk- and soy-juce based beverages by HPLC with diode-array detection, 557e562 LWT - Food Sci. Technol. 58. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.025>.
- Chebroli, K.K., Jayaprakasha, G.K., Yoo, K.S., Jifon, J.L., Patil, B.S., 2012. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Sci. Technol.* 47 (2), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.004>.
- Chotyakul, N., Pateiro-Moure, M., Saraiva, J.A., Torres, J.A., Pérez-Lamela, C., 2014. Simultaneous HPLC-DAD quantification of vitamins A and E content in raw, pasteurized, and UHT cow's milk and their changes during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 238 (4), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2130-7>.
- Eurachem. (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Retrieved from <http://www.eurachem.org>. Accessed February 29, 2024.
- Fatima, Z., Jin, X., Zou, Y., Kaw, H.Y., Quinto, M., Li, D., 2019. Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. *J. Chromatogr. A* 1606, 360245. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.025>.
- Ferin, R., Pavão, M.L., Baptista, J., 2013. Rapid, sensitive, and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV. *Clin. Biochem.* 46, 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.01.006>.
- Gałaszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z.M., Namieśnik, J., 2012. Analytical eco-scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends Anal. Chem.* 37, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>.
- García-López, R., 2011. Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica Mex.* 32 (4), 223–230.
- Giuliano, A.R., Neilson, E.M., Yap, H., Baier, M., Canfield, L.M., 1994. Carotenoids of mature human milk: Inter/intraindividual variability. *J. Nutr. Biochem.* 5, 551–556. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(94\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)90054-X).
- Gossage, C.P., Deyhim, M., Yamini, S., Douglas, L.W., Moser-Veillon, P.B., 2002. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to  $\beta$ -carotene supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 193–197. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.1.193>.
- Guo, M. (2014). Human milk biochemistry and infant formula manufacturing technology (1st ed.). Woodhead Publishing.
- Hartmann, B.T., Pang, W.W., Keil, A.D., Hartmann, P.E., Simmer, K., 2007. Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early Hum. Dev.* 83, 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2007.07.012>.
- Horwitz, W., Albert, R.J., 2006. The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC Int.* 89 (4), 1095–1109. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1095>.
- Lebiedzińska, A., Dąbrowska, M., Szefer, P., Marszał, M., 2008. High-performance liquid chromatography method for the determination of folic acid in fortified food products. *Toxicol. Mech. Methods* 18 (6), 463–467. <https://doi.org/10.1080/15376510701623870>.
- Ma, L., Shi, H., Lian, K., Diao, Y., Chen, Y., Ma, C., Kang, W., 2017. Highly selective and sensitive determination of several antioxidants in human breast milk using high-performance liquid chromatography based on Ag(III) complex chemiluminescence detection. *Food Chem.* 218, 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.025>.
- Macías, S.M., Rodríguez, S., Ronayne de Ferrer, P.A., 2006. Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Arch. Argent. de Pediatría* 104 (5), 423–430.
- Mahato, A., Vyas, S., Chatterjee, N.S., 2020. HPLC-UV estimation of folic acid in fortified rice and wheat flour using enzymatic extraction and immunoaffinity chromatography enrichment: an interlaboratory validation study. *J. AOAC Int.* 103 (1), 73–77. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0207>.
- Martínez-Rojano, H., 2016. Utilidad de un método que determina simultáneamente retinol y tocoferol en leche materna por cromatografía líquida de alta resolución. *Perinatol. y Reprod. Hum.* 30 (4), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2016.11.009>.
- Matamoros, N., Santandreu, F., Disalvo, L., Varea, A., Martins, E., Sager, G., González, H. F., 2014. Contenido de vitamina A en leche materna madura después de la pasteurización: Requerimientos nutricionales del lactante. *Rev. Argent. de Salud Pública* 5 (19), 11–16.
- Milkotronic Ltd. (2019). Lactoscan SP Milk Analyzer. Retrieved from [https://www.milkotronic.com/pdfs/LactoscanSP\\_Eng.pdf](https://www.milkotronic.com/pdfs/LactoscanSP_Eng.pdf). Accessed February 29, 2024.
- Miller, J.N., & Miller, J.C. (2010). Statistics and chemometrics for analytical chemistry (6th ed.). Ashford Colour Press Ltd.
- Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C., 2011. Effects of pasteurization and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols, and fatty acids in mature human milk. *Food Chem.* 124, 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.079>.
- Moro, G.E., Billeaud, C., Rachel, B., Calvo, J., Cavallarin, L., Christen, L., Escuder-Vieco, D., Gaya, A., Lembo, D., Wesolowska, A., Arslanoglu, S., Barnett, D., Bertino, E., Boquien, C.Y., Gebauer, C., Grosvliet, A., Weaver, G.A., Picaud, J.C., 2019. Processing of donor human milk: update and recommendations from the European Milk Bank Association (EMBA). *Front. Pediatr.* 7, 49. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00049>.
- Ollilainen, V., Heinonen, M., Linkola, E., Varo, P., Koivistoinen, P., 1989. Carotenoids and retinoids in Finnish foods: dairy products and eggs. *J. Dairy Sci.* 72, 2257–2265. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79356-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79356-5).
- Picaud, J.C., Buffin, R., 2017. Human milk-treatment and quality of banked human milk. *Clin. Perinatol.* 44 (1), 95–119. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.003>.
- Picciano, M.F., 2001. Nutrient composition of human milk. *Pediatr. Clin. North Am.* 48 (1), 53–67. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70285-6](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70285-6).
- Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., Gayá, A., López-Sabater, M.C., 2008. Effect of pasteurization on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols, and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem.* 107, 434–438. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.060>.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C., 2006. Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J. Chromatogr. B* 830, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.018>.
- Schweigert, F.J., Bathe, K., Chen, F., Büscher, U., Dudenhausen, J.W., 2004. Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. *Eur. J. Nutr.* 43, 39–44. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0439-5>.
- Shetty, S.A., Young, M.F., Taneja, S., Rangiah, K., 2020. Quantification of B-vitamins from different fresh milk samples using ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry/selected reaction monitoring methods. *J. Chromatogr. A* 1609, 460452. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460452>.
- Tarrago-Trani, M.T., Phillips, K.M., Cotty, M., 2012. Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods. *J. Food Compos. Anal.* 26, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.03.004>.
- Vázquez Román, S., Alonso Díaz, C., Medina López, C., Bustos Lozano, G., Martínez Hidalgo, M.V., Pallás Alonso, C.R., 2009. Puesta en marcha del banco de leche materna donada en una unidad neonatal. *An. de Pediatría* 71 (4), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2009.06.008>.
- Vincenzetti, S., Pucciarelli, S., Santini, G., Klimanova, Y., Polzonetti, V., Polidori, P., 2020. B-vitamins determination in donkey milk. *Beverages* 6, 46–54.
- Xavier, A.A.O., Díaz-Salido, E., Arenilla-Vélez, I., Aguayo-Maldonado, J., Garrido-Fernández, J., Fontecha, J., Sánchez-García, A., Pérez-Gálvez, A., 2018. Carotenoid content in human colostrum is associated to preterm/full-term birth condition. *Nutrients* 10, 1654. <https://doi.org/10.3390/nu10111654>.