

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE SOLUCIONES ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN SANGRE EN EMBARAZADAS Y RECIÉN NACIDOS

Franzi Mega, Noel
García Rodríguez, Jennifer
Gargaglione Pérez, Fernando
Maidana de los Santos, Camila
Rivero González, Leandro
Toledo Gonzalez, Sofia

Tutora: Prof. Dra. Marcela Guerendiain
Cotutor: Asist. Lic. Juan Gabriel Garmendia

**MONTEVIDEO
2024**

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Laboratorio de Nutrición, Alimentación y Metabolismo (NAM) de la Escuela de Nutrición por permitirnos el uso de equipos, materiales y reactivos en el desarrollo de la presente investigación.

A nuestros tutores, por brindarnos la oportunidad de realizar este trabajo, el acompañamiento a lo largo del mismo y por sus enseñanzas.

Y finalmente a nuestras familias, por el apoyo incondicional en nuestros estudios y formación.

RESUMEN

Introducción: Las vitaminas liposolubles son sensibles a la oxidación, siendo crucial establecer condiciones de almacenamiento adecuadas que aseguren la validez de resultados en futuros estudios de muestras biológicas. **Objetivo:** Evaluar la estabilidad de soluciones estándar de vitaminas liposolubles. **Metodología:** Se realizó un estudio experimental cuali-cuantitativo, almacenando soluciones patrón de las vitaminas A y E a distintas concentraciones, analizando su estabilidad por el método de espectrofotometría UV-Vis, en función del tiempo (2 meses), temperatura de almacenamiento (-80°C, -18°C, 2° a 6 °C y ambiente) y condiciones de exposición a la luz (material con o sin fotoprotección). **Resultados:** Se adquirieron e implementaron medidas de seguridad, habilidades en la manipulación de materiales, equipos y elaboración de soluciones. Los coeficientes de variación (CV, %) de las muestras preparadas por cada subgrupo de trabajo fueron <10%. Sin embargo, los CV globales oscilaron entre 47,43% y 72,20%. El retinol se presentó estable para la concentración de 0,5 ppm a -18°C. El α -tocoferol fue inestable desde las primeras semanas, independientemente de las concentraciones y temperaturas de almacenamiento. El acetato de α -tocoferol demostró una alta estabilidad en todas las concentraciones a bajas temperaturas (-80°C y -18°C), exceptuando a la solución de mayor concentración a temperaturas más elevadas (2°C a 6°C y ambiente) y la muestra expuesta a la luz. La solución de 1 ppm de β -caroteno fue inestable a -18°C luego de dos meses. **Conclusión:** Los integrantes del estudio adquirieron habilidades técnicas para el trabajo en el laboratorio, sin embargo, las variaciones en las absorbancias de β -caroteno mostraron inconsistencias en las técnicas de elaboración entre los subgrupos. El retinol fue estable a concentraciones bajas, independiente de la temperatura. El α -tocoferol aumentó sin importar la concentración o temperatura. El acetato de α -tocoferol fue estable a bajas temperaturas. El β -caroteno demostró inestabilidad en las etapas tardías del almacenamiento.

Palabras clave: vitaminas liposolubles, estabilidad de estándares, espectrofotometría UV-VIS, embarazadas, recién nacidos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Vitaminas A y E.	7
2.1.1. Características generales de las vitaminas.	7
2.1.2. Estructura y propiedades físico-químicas.	7
2.1.2.1. Vitamina A.	7
2.1.2.1.1. β -caroteno.	8
2.1.2.2. Vitamina E.	9
2.1.2.2.1. Acetato de α -tocoferol.	9
2.1.3. Alimentos fuente.	10
2.1.4. Funciones y consecuencias de la carencia y exceso.	11
2.2. Vitaminas A y E en embarazadas y recién nacidos.	12
2.2.1. Requerimientos nutricionales.	15
2.3. Determinación de vitaminas A y E.	15
2.3.1. Métodos analíticos.	15
2.3.1.1. Espectrofotometría UV-VIS.	17
2.3.2. Degradación y estabilidad de vitaminas liposolubles.	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general.	21
3.2. Objetivos específicos.	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1. Reactivos, materiales y equipos.	24
4.1.1. Estándares, disolventes y materiales.	24
4.1.2. Equipos mayores y menores.	25
4.2. Preparación de soluciones patrón.	25
4.3. Procedimiento para la lectura de disoluciones patrón.	29
4.4. Construcción de las curvas de calibración.	30
4.5. Análisis estadístico.	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Habilidades adquiridas para el desempeño en el laboratorio.	32
5.1.1. Evaluación del desempeño de los operadores en el laboratorio.	34
5.2. Cambios de las concentraciones de disoluciones de estándares de vitaminas liposolubles en el tiempo.	36
5.3. Evaluación de la concentración de los estándares de vitaminas liposolubles en función del tiempo, temperatura de almacenamiento y exposición a la luz artificial blanca y/o natural.	38
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIÓN	49
8. RECOMENDACIONES	50
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTADO DE ABREVIATURAS

AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
CV	Coeficiente de Variación
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
NAM	Nutrición, Alimentación y Metabolismo
OMS	Organización Mundial de la Salud
RAR/RXR	Receptores de ácido retinoico y receptores X retinoicos
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución (<i>Ultra-High Pressure Liquid Chromatography</i>)
UV-VIS	Ultravioleta Visible

1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay, a pesar de la creciente preocupación por el sobrepeso y la obesidad en mujeres embarazadas, no se han realizado estudios sobre las vitaminas A y E y su impacto en la salud materna y fetal (1-3). La revisión de la literatura científica revela una notable carencia de investigaciones locales en este ámbito, siendo la mayoría de los estudios procedentes de otros países (4-7). Estos resultados no pueden aplicarse directamente a la población uruguaya debido a las diferencias culturales y socioeconómicas, lo que genera una brecha significativa en el conocimiento disponible sobre este tema crucial para la salud durante el embarazo (8).

El presente estudio tiene como objetivo contribuir al conocimiento científico sobre la estabilidad de estándares de vitaminas A y E, para el futuro análisis de muestras biológicas. La estabilidad de estas vitaminas es un aspecto fundamental en la investigación y la práctica clínica, ya que su degradación puede ser inducida por diversos factores, como la temperatura, la exposición a la luz, el oxígeno y las condiciones de almacenamiento inadecuadas (9-11). La inestabilidad de estas vitaminas podría comprometer la precisión de pruebas utilizadas para determinar sus concentraciones en sangre, lo que dificultaría una correcta interpretación de los datos clínicos. Por lo tanto, abordar estos desafíos es crucial para asegurar la validez de los resultados en cualquier investigación que involucre a estas vitaminas. Con respecto a ello, se realizaron jornadas de capacitación enfocadas en el trabajo de laboratorio, abordando temas claves como las medidas de seguridad y el almacenamiento adecuado de productos químicos, además de adquirir experiencia en la manipulación de material volumétrico y el uso de equipos especializados. Para garantizar la precisión y fiabilidad de los análisis de vitaminas liposolubles en muestras biológicas, se estudia la estabilidad de los patrones, aplicando la técnica de espectrofotometría como método de control de calidad de los estándares que serán utilizados posteriormente como referencia en la determinación de la concentración de vitaminas A y E en sangre (9-12).

En este contexto, se espera que los hallazgos de esta investigación tengan implicaciones significativas para la práctica clínica y la salud pública, especialmente en el análisis de vitaminas liposolubles.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Vitaminas A y E.

2.1.1. Características generales de las vitaminas.

Las vitaminas son sustancias orgánicas que el ser humano necesita en pequeñas cantidades para el correcto funcionamiento celular, las cuales provienen de la alimentación. Si bien algunas pueden ser sintetizadas por el organismo, las cantidades no alcanzan a cubrir los requerimientos, por lo cual, es necesario el aporte de las mismas mediante la dieta (13). Las vitaminas se pueden clasificar en hidrosolubles, siendo estas solubles en agua (vitaminas del complejo B y vitamina C) o liposolubles que, como lo indica su nombre, son solubles en grasas (vitaminas A, D, E y K) (14).

2.1.2. Estructura y propiedades físico-químicas.

2.1.2.1. Vitamina A.

El término vitamina A refiere a un grupo de compuestos orgánicos derivados de la β -ionona (*Figura 1*), los cuales cuentan con actividad biológica de retinol (*Figura 2*), incluyendo a los retinoides y sus precursores, denominados provitamina A. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, con el retinol presente en alimentos de origen animal y la provitamina A en alimentos de origen vegetal (15).

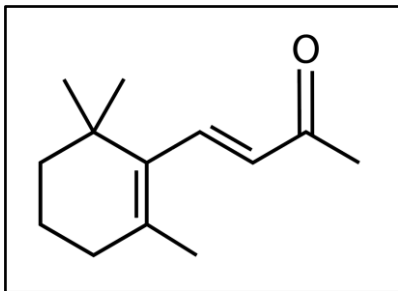


Figura 1. - Estructura química de la β -ionona. Adaptado de Paparella, A. et al. (16).

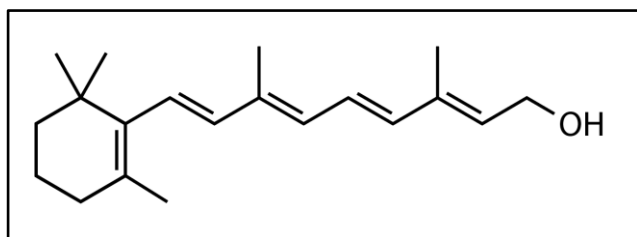


Figura 2. - Estructura química del retinol. Adaptado de Fernandez, J. et al. (17).

Los derivados de la β -ionona exhiben la actividad biológica del trans retinol y se encuentran en la naturaleza en tres formas, alcohol (retinol), aldehído (retinal o retinaldehído) y ácido (ácido retinoico) (*Figura 3*), correspondiendo a lo que se denomina todo-trans-retinol. Los isómeros todo-trans presentan la mayor actividad de vitamina A, los cuales exponen esta isomería geométrica en todos sus dobles enlaces, siendo los retinoides y carotenoides las formas que más predominan naturalmente en los alimentos (18). Además del todo-trans-retinol, existen otros cinco isómeros cis (7-cis, 9-cis, 11-cis, 13-cis y 9,13-cis) que poseen actividad vitamínica A. La conversión a los isómeros cis puede suceder ligeramente en procesos térmicos, por ejemplo, durante la cocción de los alimentos, causando una pérdida en la actividad de la vitamina A (18, 19).

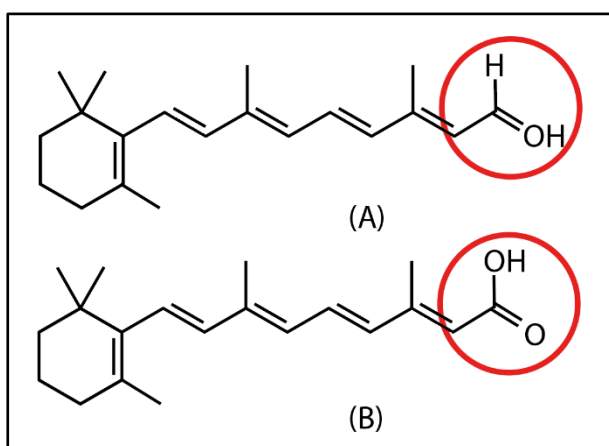


Figura 3. - Estructuras químicas: retinal (A), ácido retinoico (B). Adaptado de Kawczak, P. et al. (20) y de Rhinn, M. et al. (21).

En su mayoría, las diversas formas de la vitamina A, son consideradas compuestos cristalinos con un punto de fusión muy bajo. A causa de dicho punto de fusión, esta vitamina es estable al tratamiento térmico moderado, a los agentes reductores y al medio alcalino (16).

2.1.2.1.1. β -caroteno.

El β -caroteno es un carotenoide presente en plantas y organismos fotosintéticos, reconocido por sus propiedades antioxidantes y su función como precursor de la vitamina A (22). En el organismo humano a través de la acción de la enzima β -caroteno oxigenasa tipo 1 se genera retinaldehído, que luego se transforma en ácido retinoico, una forma activa de vitamina A, mediante la acción de la enzima retinaldehído deshidrogenasa. Además, el retinaldehído puede ser reducido a retinol, por la retinol deshidrogenasa y la deshidrogenasa de cadena corta (23, 24).

La fórmula molecular del β -caroteno $C_{40}H_{56}$ (*Figura 4*), muestra una cadena larga y altamente conjugada de unidades de isopreno. Esta estructura, compuesta por once

unidades de isopreno dispuestas de manera lineal, conforma un sistema de once enlaces dobles conjugados. Los sistemas de dobles enlaces conjugados (enlaces simples y dobles alternados) de los carotenoides, proporcionan fuertes absorbancias, característica de la región espectro visible, otorgándole al β -caroteno su coloración anaranjada (9, 25).

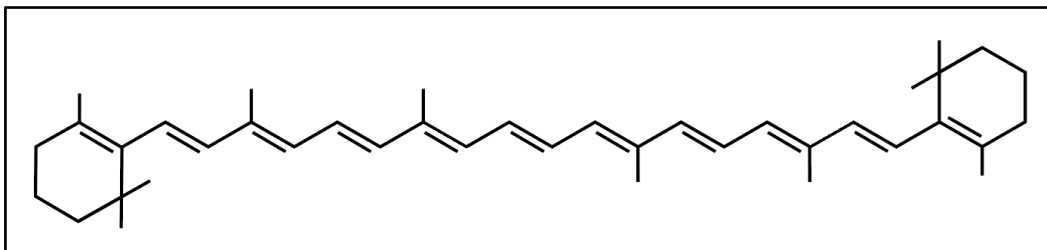


Figura 4. - Estructura química del β -caroteno. Adaptado de Melendez, A. et al. (26)

La estructura altamente conjugada del β -caroteno conlleva a sus propiedades antioxidantes, neutralizando especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha observado que esta estructura molecular permite la eficiente captura de radicales libres, lo que respalda su papel en la protección celular contra el estrés oxidativo (22).

2.1.2.2. Vitamina E.

La vitamina E, conocida como tocoferol, refiere a un conjunto de ocho sustancias liposolubles, cuatro tocotrienoles y cuatro tocoferoles (α - , β - , γ - , δ -), las cuales se pueden encontrar de forma natural en los alimentos (27).

La forma más activa de esta vitamina es el α -tocoferol (Figura 5), un compuesto conformado por un anillo de cromanol y una cadena saturada formada por fitol y dobles enlaces en las posiciones 3, 7 y 11. Los tocoferoles son muy apolares y se localizan en la parte lipídica de los alimentos (18).

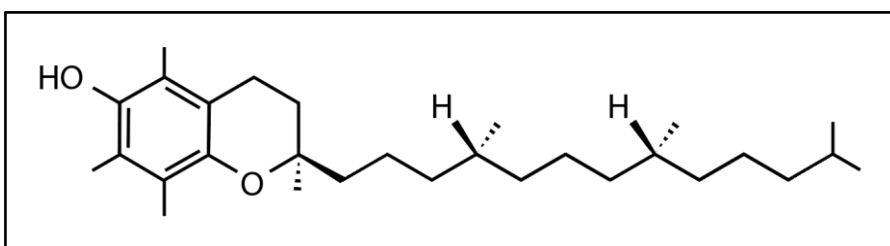


Figura 5. - Estructura química del α -tocoferol. Adaptado de González, A. et al. (28)

Todos los tocoferoles y tocotrienoles si no están esterificados, tienen la capacidad de actuar como antioxidantes, neutralizando los radicales libres (19). Esta capacidad se debe a su estructura molecular, la cual incluye un hidroxilo fenólico en el anillo de cromano. Este grupo funcional es responsable de la reducción antioxidante, lo que impide la propagación de reacciones en cadena con radicales libres y, por lo tanto, reduce el estrés oxidativo (18, 29).

2.1.2.2.1. Acetato de α -tocoferol.

El acetato de α -tocoferol (*Figura 6*) es una forma sintética del α -tocoferol, la cual también presenta actividad vitamínica E (30). Es una molécula fundamental en la familia de tocoferoles, caracterizada por su relevancia biológica como antioxidante liposoluble. La estructura del acetato de α -tocoferol, $C_{31}H_{52}O_3$, contiene un grupo acetato el cual sustituye al grupo -OH del α -tocoferol, además su estructura revela una cadena isoprenoide con un anillo cromanol; una configuración única que subyace a sus propiedades antioxidantes y a su impacto en la salud humana (18).

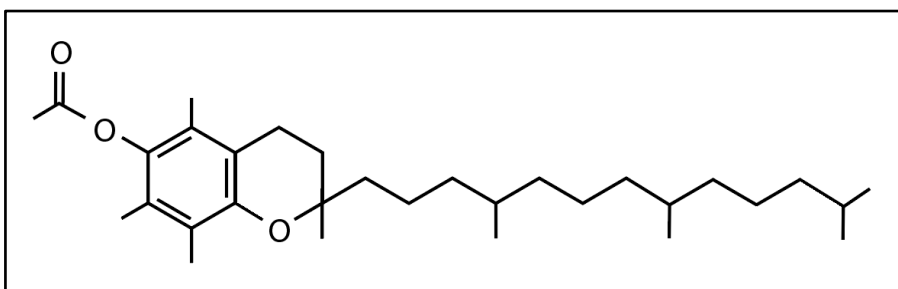


Figura 6. - Estructura química del acetato de α -tocoferol. Adaptado de Cuerq, C. et al. (31)

La estructura del acetato de α -tocoferol también influye en su función biológica como una forma de vitamina E, equivaliendo 1 mg de éste a 0,67 mg de α -tocoferol (30, 32). En el organismo, este compuesto puede convertirse en α -tocoferol activo, participando en procesos esenciales para la salud, como la protección de los lípidos celulares y la regulación de la respuesta inmune. Estudios realizados por Brigelius-Flohé y Traber (32), han explorado la importancia de la estructura del acetato de α -tocoferol en su biodisponibilidad y metabolismo, subrayando su relevancia para la absorción y utilización efectiva en el cuerpo humano.

2.1.3. Alimentos fuente.

Las fuentes alimentarias de la vitamina A son diversas. En alimentos de origen animal como hígado, leche entera, queso, manteca, yema de huevo, pescados grasos y derivados, entre otros, se puede encontrar naturalmente en forma de retinol (33-35). En los alimentos de origen vegetal, la vitamina A está presente en forma de carotenoides,

principalmente como β -caroteno. Entre estos alimentos se incluyen las hortalizas como boniato zanahoria (batata), zanahoria, espinaca y frutas con gran pigmentación, como durazno, mango, caqui, guayaba, pomelo rojo, naranja, papaya, entre otros (33, 34).

En cuanto a las fuentes alimentarias de vitamina E, se destacan las de origen vegetal, como aceites de girasol, maíz, oliva y frutos secos, entre los cuales encontramos las almendras, nueces y maní. Entre los productos de origen animal se encuentran los lácteos, atún y yema de huevo (34, 36).

2.1.4. Funciones y consecuencias de la carencia y exceso.

La vitamina A se ha relacionado con diferentes funciones en el ser humano. La más característica es con respecto al desarrollo de la visión y el mejoramiento de la visión nocturna, así como la prevención de su pérdida, al formar parte de la rodopsina, un pigmento localizado en la retina, de gran importancia para la captación de la luz (33).

Se ha vinculado con efectos beneficiosos en el tejido óseo, estimulando la actividad osteoblástica e inhibiendo la actividad osteoclástica y en la diferenciación celular, uniéndose con receptores de ácido retinoico y retinoides X (RAR/RXR), produciendo cambios en la cromatina (37, 38).

La vitamina A cuenta con efecto antioxidante, principalmente por medio del β -caroteno. Los carotenoides son más activos que los retinoides debido a que el sistema de dobles enlaces conjugados es más largo, reduciendo potencialmente los efectos negativos causados por ROS, generados por el propio metabolismo del organismo. Esto ayuda a reducir el riesgo de desarrollar enfermedades neoplásicas, cardíacas, entre otras (25, 39).

La deficiencia de vitamina A produce sequedad patológica del ojo, que puede causar xeroftalmía y en ocasiones, queratomalacia y ceguera. Además, esta carencia puede llegar a afectar a las células epiteliales y se asocia con un mayor riesgo de ciertos tipos de cáncer, incluido el cáncer de colon (40, 41). Por contraparte, su ingesta en forma de suplementos o ciertos medicamentos en exceso, puede causar fuertes dolores de cabeza, visión borrosa, náuseas, mareos, dolores musculares y problemas de coordinación (14), recomendándose la suplementación sólo cuando el individuo se encuentra en una situación deficitaria (42).

La vitamina E se destaca por su alto poder antioxidante, teniendo un papel clave en la eliminación de ROS y reducción del estrés oxidativo (43). Esta vitamina ha sido ampliamente estudiada debido a su participación en el sistema inmunológico. Presenta

una gran acción protectora frente a la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas de las células inmunitarias, contribuyendo en la defensa contra microorganismos patógenos y su alta actividad metabólica. Debido a esta función, la vitamina E ayuda a mantener la integridad de la membrana y por ende algunas de las funciones que se llevan a cabo en ella, como la transducción de señales. A su vez, puede actuar sobre la modulación de mediadores inflamatorios y movilización y activación de las moléculas de señalización superficiales, al influir en la movilidad de las balsas lipídicas (43, 44).

La deficiencia de vitamina E se considera poco común. Esta se ha relacionado con un debilitamiento en la respuesta inmunológica e inflamatoria (45). En casos de trastorno de malabsorción intestinal, la deficiencia de esta vitamina ha demostrado un desgaste en la función de las células T, las cuales junto a las células B, componen al sistema inmunitario. Esto es debido al deterioro de la interleucina (IL)-2, una citoquina esencial para el funcionamiento de las células T. De todas formas, fue observada una mejora en la proliferación de células T y un decrecimiento de las citoquinas inflamatorias mediante la suplementación de esta vitamina (46). Por otro lado, ingestas de vitamina E elevadas pueden llegar a generar hipervitaminosis E, sin embargo, esta situación es poco frecuente, ya que se requieren dosis muy altas. Algunas de las manifestaciones clínicas que pueden resultar de esta sobredosis incluyen dolor de cabeza, visión borrosa, hipogonadismo, náuseas, vómitos y flatulencias (47, 48).

2.2. Vitaminas A y E en embarazadas y recién nacidos.

El embarazo y la lactancia representan una etapa crítica para la vida de una mujer y su descendencia. Los procesos fisiológicos involucrados en el desarrollo fetal, preparación del cuerpo para el parto y la posterior lactancia provocan alteraciones en los requerimientos nutricionales maternos, siendo indispensable un estado nutricional adecuado que contribuya al correcto desarrollo fetal (49). La vitamina A y sus precursores juegan un papel importante durante la gestación. En el embarazo, la demanda de la misma aumenta para apoyar el desarrollo fetal, particularmente en la formación del sistema nervioso central y la vista. Además, es esencial para mantener la integridad del sistema inmunológico de la madre y del recién nacido (2, 50-52). Durante el embarazo los niveles de adecuación de retinol en plasma oscilan entre 29 y 47 µg/dL (53). En los lactantes prematuros, las reservas adecuadas de vitamina A son cruciales para la expresión de proteínas surfactantes y factores de crecimiento. Los bebés prematuros a menudo presentan niveles bajos de vitamina A en sangre, ya que el hígado aún no produce suficiente proteína de unión al retinol para secretarla. Es esencial

desarrollar reservas pulmonares adecuadas en el tercer trimestre del embarazo, previniendo el riesgo de displasia broncopulmonar y otras enfermedades respiratorias comunes en estos bebés. Además, el β -caroteno metabolizado actúa como antioxidante, neutralizando el oxígeno singlete y eliminando radicales peroxilo (54).

La deficiencia o el exceso de vitamina A durante la etapa del desarrollo embrionario conllevan a malformaciones congénitas en los humanos, a causa de la acción transcripcional defectuosa del ácido retinoico, el cual regula la expresión de genes esenciales para la organogénesis (55). Debido a lo anteriormente mencionado, cobra un gran valor conocer las concentraciones de retinol de la madre. En un estudio realizado en Brasil, se constató que los valores de retinol y β -caroteno en la sangre del cordón umbilical pueden deberse a la influencia de los niveles maternos de vitamina A, los cuales podrían ejercer un efecto regulador negativo en la entrada de β -caroteno en la placenta (4, 56).

En embarazadas, los altos valores de retinol se han relacionado con un menor riesgo de desarrollo de anemia, encontrando concordancia con otros estudios (57-59), en los cuales se sugiere una relación entre el retinol y la expresión de la eritropoyetina y la movilización de hierro para su síntesis (4, 60). Además, esta vitamina participa en el desarrollo de las glándulas mamarias, así como en la lactogénesis. La cantidad de retinol ingerida por la madre está relacionada con la concentración en la leche secretada, fundamental para el lactante (61). En una investigación realizada en mujeres lactantes en China, se evidenció que solo un reducido número de ellas logró cumplir con la ingesta recomendada de vitamina A. Además, se observó que las mujeres lactantes con sobrepeso u obesidad podrían presentar concentraciones más bajas de esta vitamina en suero de leche (5).

La vitamina A y sus provitaminas, carotenoides, desempeñan un papel crucial en la programación fetal y neonatal. Esta programación temprana puede tener implicaciones significativas en la salud metabólica a lo largo de la vida, incluyendo el riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad. Se ha observado que la deficiencia de vitamina A durante períodos críticos del desarrollo puede alterar la expresión génica y los procesos metabólicos que regulan el almacenamiento de grasas y la homeostasis energética. Además, los carotenoides también pueden influir en la regulación del metabolismo lipídico y la adiposidad corporal (62). En mujeres embarazadas, el sobrepeso y la obesidad representan un riesgo para el desarrollo de múltiples patologías, como diabetes mellitus tipo 2. La vitamina A puede actuar controlando la adipogénesis y/o disminuyendo el estrés oxidativo causado por la acumulación excesiva de tejido graso

(2, 63).

Al igual que la vitamina A, la vitamina E juega un rol fundamental durante el embarazo, siendo la concentración adecuada en sangre de 7 a 23 µg/ml (53, 64). Estudios han destacado el impacto en el desarrollo fetal y protección contra complicaciones gestacionales. Los niveles bajos de vitamina E se han asociado con un aumento en el riesgo de desarrollar diabetes mellitus gestacional (3, 65). Por otra parte, se ha planteado la posibilidad de un efecto protector de la vitamina E contra la preeclampsia; sin embargo, este resultado no ha sido consistente con los hallazgos de otros estudios realizados por Rumbold y Rahnamaei (66-69). Además, se ha asociado la suplementación de vitamina E con un menor riesgo de desprendimiento de placenta (70). En una investigación realizada a partir de muestras de sangre extraídas de mujeres gestantes, se ha encontrado una relación entre concentraciones elevadas de α -tocoferol y la disminución en la cantidad de plaquetas. Estos resultados sugieren una posible acción protectora de la vitamina E contra enfermedades cardiovasculares, estableciendo una conexión entre los niveles de esta vitamina y la regulación de las plaquetas en el organismo (60).

Muestras de sangre extraídas de recién nacidos han revelado concentraciones inferiores de α -tocoferol en comparación al de embarazadas y niveles de retinol aún más bajos. Esto evidencia la función de filtrado y selección que desempeña la placenta en el transporte de las vitaminas. Además, se ha relacionado el déficit de vitamina E durante el embarazo con el retraso del crecimiento en recién nacidos, siendo relevante la ingesta adecuada de esta vitamina durante los primeros mil días de vida, representando un período crítico para su salud y bienestar en la fase adulta (6, 71). La fragilidad del recién nacido, especialmente en el caso de los prematuros, se refleja en su vulnerabilidad a la deficiencia de vitamina E. Durante el parto, los pulmones del neonato se ven expuestos al oxígeno ambiental, demandando una preparación eficiente para contrarrestar posibles efectos adversos. Es crucial garantizar un adecuado nivel de este antioxidante en ese momento, ya que desempeña un papel esencial en la protección contra los impactos negativos del oxígeno como la hiperoxia alveolar, contribuyendo así a una supervivencia sin secuelas (72).

Tal como se mencionó previamente, durante el embarazo factores como el sobrepeso y la obesidad representan un riesgo tanto para la madre como para el recién nacido, siendo un factor desencadenante de diferentes patologías, como diabetes gestacional, trastornos hipertensivos, desprendimiento de placenta, nacimiento pretérmino, cesáreas y macrosomía (73). Las concentraciones de vitamina E en los recién nacidos están

directamente influenciadas por las concentraciones de vitamina E en sus madres y la ganancia de peso durante el embarazo. Estos factores son cruciales para el manejo del estrés oxidativo durante el parto y en la recuperación posnatal del niño. Por lo tanto, las mujeres con sobrepeso u obesidad podrían tener un mayor riesgo de deficiencia de vitamina E, lo que a su vez podría afectar negativamente al recién nacido (74, 75).

Si bien algunas investigaciones han tenido resultados contradictorios, los niveles de vitamina E se han relacionado con un efecto protector frente al desarrollo de sobrepeso y obesidad, reduciendo la masa grasa, peso corporal y concentraciones de ácidos grasos libres, al modular vías de señalización involucradas en la adipogénesis (76). Continuar investigando los niveles de ingesta materna de vitamina E es fundamental ya que los resultados indican la necesidad de mejorar la preparación nutricional de las mujeres en edad fértil y garantizar una ingesta adecuada de vitamina E durante el embarazo (77).

2.2.1. Requerimientos nutricionales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda en mujeres embarazadas, de entre 14 y 18 años, consumir 750 µg de vitamina A al día, y propone 770 µg en la misma población de 19 a 50 años (78, 53). En adolescentes de 14 a 18 años durante el período de lactancia se propone una dosis de 1200 µg por día, y en mujeres de 19 a 50 años 1300 µg diarios (78, 53).

Para la vitamina E la OMS recomienda en mujeres embarazadas, entre 14 y 50 años, consumir 15 mg por día. En recién nacidos, hasta los 6 meses de edad, se aconseja el consumo de 4 mg por día, mientras que entre los 7 y 12 meses esta recomendación aumenta a 5 mg al día (78, 53).

2.3. Determinación de vitaminas A y E.

2.3.1. Métodos analíticos.

En la actualidad existen distintos tipos de métodos analíticos que permiten determinar y cuantificar vitaminas. En particular, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica de referencia para este tipo de análisis, según lo establecido por la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) (79). Los métodos espectrofotométricos también permiten el análisis de vitaminas, siendo el seleccionado para el desarrollo de este trabajo la espectrometría de absorción molecular ultravioleta-visible (UV-VIS), también llamado espectroscopía UV-VIS. Este ofrece ciertas ventajas frente a otros métodos analíticos, como la rapidez en la obtención de resultados, la

facilidad a la hora de manipular el instrumento, su precisión, entre otras (80). Las características mencionadas hacen que este último sea apropiado para las necesidades de este trabajo. Teniendo en cuenta el tiempo disponible para la realización de la investigación, es esencial contar con una técnica analítica que permita un análisis rápido de las muestras, asegurando resultados confiables. Además, debido a que el propósito de este trabajo es el estudio de la estabilidad de soluciones que serán utilizadas como patrones estándar en la determinación de vitaminas en sangre por HPLC, la espectroscopía UV-VIS se adapta a este objetivo y permite ser un método viable para un primer acercamiento al trabajo en laboratorio. Teniendo en cuenta que, si bien se utilizan métodos cromatográficos, estos requieren más tiempo de análisis ya que los equipos cuentan con sistemas de bombeo, área termostatzada, y módulos asociados, entre otros ejemplos. Por otro lado, estos equipos además de ser costosos tienen un alto gasto asociado, debido a los insumos necesarios para llevar adelante la técnica analítica, como la compra de columnas cromatográficas y solventes de una calidad específica. Además, requiere de un dominio de la técnica que implica el conocimiento teórico necesario para el entendimiento del funcionamiento del equipo y la interpretación de resultados dados por el mismo (80).

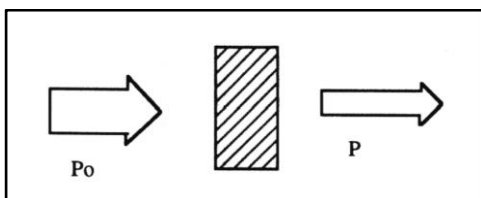
Al igual que en HPLC, la espectrofotometría UV-VIS presenta la desventaja de ser sensible a cambios atmosféricos, como la temperatura y presión, por lo que se debe llevar un control estricto de las condiciones de trabajo para obtener resultados precisos. Es fundamental asegurar que las muestras a medir sean homogéneas y no contengan material particulado que pueda afectar el resultado. Además, es necesaria una correcta limpieza de los materiales a utilizar, como cubetas y materiales de vidrio. En lo que a esto respecta, se debe considerar el tipo de solución utilizada para la misma y en qué cantidad son necesarias. Desde el punto de vista de gestión de residuos, este método puede llegar a generar grandes volúmenes de residuos líquidos, debido a que muchas veces se requieren hacer varias diluciones para alcanzar la concentración de trabajo adecuada (80).

2.3.1.1. Espectrofotometría UV-VIS.

La espectrofotometría UV-VIS se basa en la medida de la transmitancia (T) o absorbancia (A) de disoluciones en una región de longitudes de onda comprendida entre los 160 y 780 nm. Esta técnica analítica permite determinar la concentración de compuestos en solución, a través de la absorción de luz ultravioleta o visible de la muestra. En este sentido, la luz incide sobre la muestra que se desea analizar a una longitud de onda específica, siendo necesario conocer la misma para cada analito que se desea determinar. En este trabajo se obtuvieron por medio de fuentes bibliográficas, siendo las longitudes de onda para el β -caroteno, α -tocoferol, acetato de α -tocoferol y retinol, 453 nm, 292 nm, 290 nm y 325 nm, respectivamente (81, 12). Finalmente, parte del haz de luz es absorbido por la muestra, mientras que la no absorbida continúa su camino óptico, llegando al detector, transformándose en una señal eléctrica (80).

El fundamento de la espectroscopía refiere a la capacidad de absorber radiaciones de las moléculas, entre ellas, las comprendidas dentro del espectro UV-VIS. La eficiencia con la que se absorben las longitudes de onda de las radiaciones depende de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, temperatura), por lo que dicha técnica comprende un instrumento útil para la determinación y caracterización de biomoléculas. En efecto, el espectro de absorción de cada molécula constituye un signo de identidad de la misma (80).

En la *Figura 7* se visualiza un esquema del fenómeno de absorción, donde un haz de radiación monocromático pasa a través de una capa de solución que contiene una especie molecular absorbente, cuya concentración es **c**. La radiación incidente en partículas con capacidad de absorción provoca interacciones, resultando en una disminución de la potencia del haz de **P_o** a **P**. Por lo tanto, la transmitancia (T) de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida o no absorbida por la solución según: $T = P / P_o$ (82).



*Figura 7. - Esquema de fenómeno de absorción, donde **P_o** es la radiación incidente y **P** es la radiación absorbida. Tomado de FAO (82).*

Mediante la ley de Lambert-Beer se establece que la cantidad de energía que absorbe una solución es proporcional al paso de la luz y a la concentración, tal es así que una solución más concentrada va a absorber más luz que una solución más diluída (80). La fórmula matemática de la ley Lambert-Beer relaciona: $A = \epsilon \times d \times c$, donde **A** es la absorbancia, ϵ la absortividad molar, **d** el paso de la luz y **c** la concentración (80).

Para poder establecer una relación proporcional entre concentración y una determinada señal analítica, se preparan curvas de calibración para cada analito de estudio, donde se realizan soluciones de concentraciones exactamente conocidas y crecientes de los mismos, en un rango tal que se cumpla la Ley de Lambert-Beer. Una vez obtenidos los distintos puntos de la curva se debe determinar la ecuación de la recta mediante análisis de regresión lineal (ajuste de la curva por mínimos cuadrados). La ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración es del tipo: $Y = Ax + B$, donde: Y = concentración del analito, A = pendiente del gráfico y B = ordenada en el origen del gráfico. Por otro lado, se utiliza el parámetro estadístico que refleja la calidad de la curva de calibración y se denomina *coeficiente de regresión* (r). En el análisis cuantitativo, r es un indicador de correlación lineal, por lo tanto, para modelos lineales este es utilizado como indicador de ajuste y se interpreta que cuanto más cercano a 1 es el valor de r, mejor es el ajuste (80, 83).

En referencia al equipamiento necesario para la aplicación del método, estos se denominan espectrofotómetros (*Figura 8*). Actualmente, en el mercado se encuentran disponibles diversos diseños de estos equipos, pero su conformación principal siempre es la misma. Constan de una fuente de energía radiante, monocromadores para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda, compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas, tubos o microplacas) que pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico, detector de luz y un sistema de lectura de datos (80).

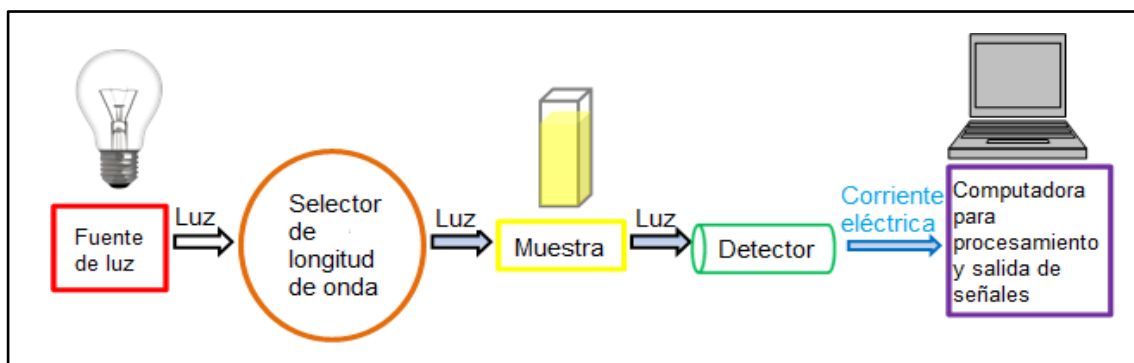


Figura 8. - Representación esquemática de un espectrofotómetro UV-VIS. Adaptado de Tom (84).

2.3.2. Degradación y estabilidad de vitaminas liposolubles.

La degradación y estabilidad de las vitaminas liposolubles, especialmente las vitaminas A y E, son temas fundamentales en la investigación nutricional debido a su impacto directo en la salud humana. En lo que a esto respecta, la determinación de las concentraciones de vitaminas A y E en sangre se han consolidado como método “estándar de oro” para evaluar su estado nutricional en el organismo humano. Las concentraciones en suero o plasma de estas vitaminas reflejan directamente el equilibrio entre la ingesta dietética, la absorción, el transporte y el metabolismo de estos nutrientes esenciales (85), siendo importante considerar la estabilidad preanalítica de las vitaminas A y E en sangre para garantizar resultados precisos en los estudios (86). La medición del retinol en suero ha sido ampliamente aceptada como principal indicador del estado nutricional de la vitamina A. Además, se considera crucial evaluar los isómeros de retinol para obtener información detallada sobre el metabolismo de la vitamina A (87). A su vez, la medición de α -tocoferol en suero sanguíneo, indica la cantidad circulante de vitamina E en el organismo (22).

La cuantificación de vitaminas liposolubles en suero/plasma sanguíneo se realiza mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) o HPLC, lo que requiere de la elaboración de soluciones de estándares a ser utilizados como patrones en el método analítico, de esta manera se adiciona a las muestras una cantidad exactamente conocida del patrón posibilitando la validación y minimización de errores en la cuantificación de las vitaminas liposolubles (12). Por esta razón, es fundamental preservar la calidad de las soluciones que se utilizarán como patrones, ya que serán un factor determinante para obtener resultados confiables (88). En este sentido, es importante considerar que las vitaminas son susceptibles a diversos factores que pueden alterar su estructura molecular. La oxidación es un factor clave de degradación para las vitaminas A y E, incluidos los estándares, por lo que la exposición al oxígeno y la luz puede comprometer su estabilidad (9).

Con respecto a la vitamina A, se ha constatado que se degrada rápidamente frente a la acción directa de la luz solar y radiaciones UV intensas, un proceso en el cual se desencadenan alteraciones en su estructura molecular, dando lugar a la auto oxidación e isomerización geométrica del compuesto. Esto es importante ya que al exponerla a dichas condiciones puede comprometer su eficacia y por lo tanto su capacidad de realizar funciones en el organismo humano. En relación al análisis químico de esta vitamina, es fundamental controlar estos factores para asegurarse de que las medidas obtenidas sean confiables y no se les atribuya un posible error por una inadecuada

conservación de la muestra, siendo indispensable contar con fotoprotección durante el almacenamiento y determinación analítica (11).

Las temperaturas elevadas, la exposición a la luz y la oxidación también contribuyen a la descomposición del β -caroteno, provocando la ruptura de los enlaces carbono-carbono, conduciendo a la formación de numerosos productos, como apocarotenales, epóxidos y aldehídos carotenoides (11, 19, 89). Estos productos de degradación pueden absorber en la región de UV-VIS del espectro del β -caroteno debido a la presencia de sistemas conjugados de sus estructuras moleculares, lo cual podría afectar los valores obtenidos en las mediciones de absorbancia (90-93).

En el caso de la vitamina E, su degradación se ve exacerbada en presencia de oxígeno y radicales libres. La fotoprotección también desempeña un papel crucial en la preservación de esta vitamina, extendiendo su vida útil (11). En condiciones de refrigeración y adecuada fotoprotección, la vitamina E puede mantenerse estable durante períodos que varían entre tres y veinte días. No obstante, a temperatura ambiente, su estabilidad se reduce, limitándose a aproximadamente cuatro días (94). Por otro lado, se ha encontrado que la vitamina E conserva su estabilidad por períodos más prolongados de uno a ocho meses a una temperatura de -80°C (95).

Las vitaminas A y E han mostrado comportamientos similares al ser almacenadas a diferentes temperaturas, ya sea en recipientes transparentes y/o color ámbar, donde a temperaturas más elevadas la fotoprotección cobra un papel más relevante para su estabilidad a lo largo del tiempo (96). Es por ello que, el uso de viales de vidrio de color ámbar para el almacenamiento de las muestras contribuye a preservar su estabilidad frente a la degradación lumínica, ya que estos envases actúan como una barrera eficaz contra la luz ultravioleta, filtrando la radiación que causa la degradación de las muestras (10).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar la estabilidad de soluciones estándar de vitaminas liposolubles.

3.2. Objetivos específicos.

- Adquirir habilidades técnicas en el trabajo de laboratorio para la realización y cuantificación de disoluciones de estándares de vitaminas liposolubles en solventes orgánicos.
- Estudiar la variación de las concentraciones de disoluciones de retinol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferol y β -caroteno almacenadas a diferentes temperaturas durante el periodo de dos meses.
- Analizar el comportamiento de las concentraciones de las disoluciones de estándares de vitaminas liposolubles, almacenados en viales con fotoprotección.

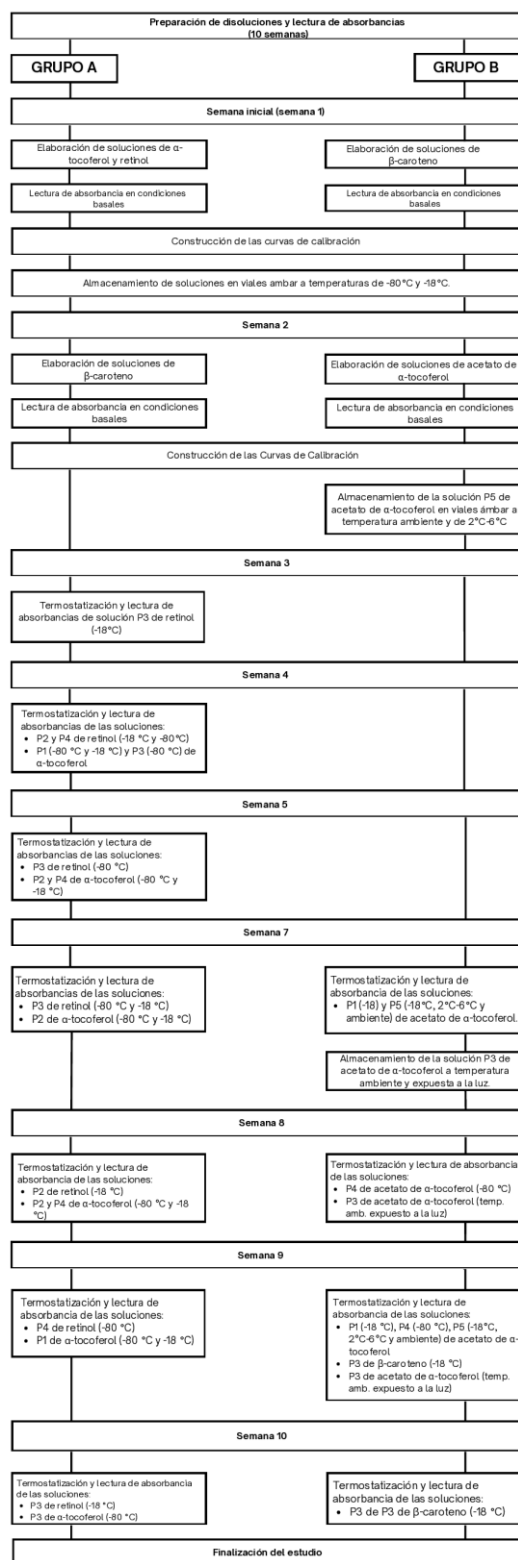
4. METODOLOGÍA

El trabajo presentó una duración de tres meses, estando el primer mes destinado a jornadas de capacitación orientadas por los docentes guía para adquirir las habilidades técnicas del trabajo en el laboratorio, constando de una instancia teórica y otra práctica. Durante las instancias teóricas se proporcionó información detallada sobre elementos de protección personal, uso adecuado de los materiales y las precauciones necesarias para el trabajo en el laboratorio, con el fin de garantizar un entorno seguro. En la fase práctica se emplearon las técnicas presentadas en la jornada teórica, referidas a la manipulación de materiales de laboratorio, sustancias químicas, equipos y trabajo en la sala de metabolitos fotosensibles. Finalizada la etapa de capacitación, se inició con la preparación de las disoluciones de estándares de vitaminas liposolubles y se continuó con el estudio de su estabilidad durante los siguientes dos meses. El grupo de trabajo se dividió en dos subgrupos (A y B), cada uno compuesto por tres personas. El subgrupo A trabajó en la preparación y estudio de las disoluciones de retinol, α -tocoferol y β -caroteno, mientras que el subgrupo B se dedicó a las disoluciones de β -caroteno y acetato de α -tocoferol (*Figura 9*).

Etapla 1: Capacitación



Etapla 2: Trabajo de laboratorio



Condiciones basales: tiempo cero, concentración inicial y temperatura ambiente.
P1: punto 1; P2: punto 2; P3: punto 3; P4: punto 4; P5: punto 5.

Figura 9. - Diagrama de flujo del diseño de estudio.

Para cuantificar la concentración de las soluciones de estándares de vitaminas liposolubles, en función de las condiciones de almacenamiento, se empleó una metodología de tipo experimental, utilizando la técnica analítica de espectroscopía ultravioleta-visible mencionada en la *sección 2.3.1.1*. Las lecturas de absorbancia de las diferentes disoluciones se realizaron semanalmente en ambos subgrupos.

A continuación, se presenta de forma detallada y ordenada la información necesaria para la aplicación de la técnica experimental. Se incluye el procedimiento para la ejecución del método analítico, los reactivos, materiales y equipos requeridos, así como las condiciones particulares para la recolección de datos, entre otros aspectos relevantes.

4.1. Reactivos, materiales y equipos.

4.1.1. Estándares, disolventes y materiales.

Estándares

- Acetato de α -tocoferol Sigma-Aldrich. Porcentaje de pureza $\geq 96\%$.
- α -Tocoferol Sigma-Aldrich. Porcentaje de pureza $\geq 96\%$.
- Retinol Sigma-Aldrich. Porcentaje de pureza $\geq 95\%$.
- β -Caroteno Sigma-Aldrich. Porcentaje de pureza $\geq 95\%$.

Disolventes

- Etanol Supelco $\geq 99,9\%$ de pureza. Calidad HPLC.

Materiales de uso principal

- Matraces aforados de vidrio categoría A 100 ml, 50 ml, 25 ml, 20 ml y 10 ml.
- Pipetas aforadas de vidrio categoría A, 5 ml, 2,5 ml y 2 ml.
- Micropipetas automáticas GILSON pipetman classic 1000 μ l, 200 μ l y 20 μ l.
- Cubetas de cuarzo 3,5 ml; recorrido óptico 10 mm.
- Viales ámbar de vidrio 10 ml y 5 ml.
- Tubo Falcon transparente de 15 ml.

Materiales auxiliares

- Pesa sustancia de vidrio.
- Pera de goma y/o pipeteador de 10 ml.
- Vasos de bohemia de vidrio.
- Varilla de vidrio.

- Pipetas Pasteur de plástico y vidrio de 2 ml.
- Matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 ml.
- Papel absorbente.
- Papel aluminio.

4.1.2. Equipos mayores y menores.

Mayores

- Lector de microplacas UV-VIS TECAN modelo Infinite 200 Pro.
- Ultracongelador Thermo Scientific FDE Series -80°C.
- Congelador de -18°C.
- Heladera 2°C a 6°C.

Menores

- Balanza analítica RADWAG AS 60/220 R2.

4.2. Preparación de soluciones patrón.

A continuación, se detalla el procedimiento para la preparación de las disoluciones de retinol, para ello inicialmente se realizó la solución madre, con una concentración de 500 ppm, a través de una pesada directa en la balanza analítica de 0,02491 g de retinol. Posteriormente, se trasvasó a un matraz aforado de 50 ml, completando con etanol hasta el aforo, para luego homogeneizar agitando por inversión (20 veces).

Luego, se preparó la solución de trabajo de 250 ppm, en donde se tomó 5 ml de la solución madre mediante el uso de una pipeta aforada de 5 ml y se llevó a matraz aforado de 10 ml, agregando etanol hasta el aforo, para luego homogeneizar.

Partiendo de la solución de trabajo de 250 ppm se elaboraron cinco soluciones más, solución 1 de 0,1 ppm, solución 2 de 0,5 ppm, solución 3 de 1 ppm, solución 4 de 2,5 ppm y solución 5 de 5 ppm.

- Solución 1: se trasvasan 10 µl de la solución de trabajo mediante micropipeta automática de 20 µl y se lleva a matraz aforado de 25 ml, completando el volumen con etanol hasta el aforo.
- Solución 2: se trasvasan 50 µl de la solución de trabajo mediante micropipeta automática de 200 µl y se lleva a matraz aforado de 25 ml, completando el volumen con etanol hasta el aforo.
- Solución 3: se trasvasan 100 µl de la solución de trabajo mediante micropipeta automática de 200 µl y se lleva a matraz aforado de 25 ml, completando el volumen con etanol hasta el aforo.

- Solución 4: se trasvasan 250 µl de la solución de trabajo mediante micropipeta automática de 1000 µl y se lleva a matraz aforado de 25 ml, completando el volumen con etanol hasta el aforo.
- Solución 5: se trasvasan 500 µl de la solución de trabajo mediante micropipeta automática de 1000 µl y se lleva a matraz aforado de 25 ml, completando el volumen con etanol hasta el aforo.

Para el resto de analitos (β -caroteno y acetato de α -tocoferol) se realizó el mismo procedimiento, exceptuando al α -tocoferol, del cual se prepararon cuatro soluciones en lugar de cinco. Para el acetato de α -tocoferol, se partió directamente de la solución madre para la realización de dos soluciones (3 y 5). La decisión de no realizar todas las soluciones a partir de la solución hija se debió a la cantidad limitada de esta solución, la cual no era suficiente para preparar todas las soluciones requeridas. Además, no se contaba con una cantidad adicional de analito para la preparación de una nueva solución madre en mayor volumen, lo que a su vez habría incrementado los costos. Por tanto, se optó por emplear la solución madre para preparar directamente algunas disoluciones, optimizando el uso de los recursos disponibles.

En las siguientes tablas se muestra en detalle la realización de las disoluciones del α -tocoferol, retinol, β -caroteno y acetato de α -tocoferol (*Tabla 1*) y la preparación de los puntos para la construcción de las curvas de calibración (*Tabla 2*).

Tabla 1. - Preparación de soluciones madre y de trabajo para el α -tocoferol, retinol, β -caroteno y acetato α -tocoferol.

Analito	Solución	Concentración (ppm)	Masa (g) / Volumen (ml)	Volumen matraz aforado (ml)
α -tocoferol	Madre	10000	0,21178 g	20
	De trabajo	500	1 ml de solución madre	25
Retinol	Madre	500	0,02491 g	50
	De trabajo	250	5 ml de solución madre	10
β -caroteno preparado por el subgrupo B	Madre	500	0,01 g	20
	De trabajo	100	5 ml de solución madre	25
Acetato α -tocoferol	Madre	10000	0,24681 g	25
	De trabajo	500	0,5 ml de solución madre	10
β -caroteno preparado por el subgrupo A	Madre*	500	0,01 g	20
	De trabajo	100	5 ml de solución madre	25

*El subgrupo A utilizó la solución madre preparada previamente por el subgrupo B.

Tabla 2. - Preparación de soluciones a diferentes concentraciones (puntos) para la construcción de curvas de calibración para los analitos de α -tocoferol, retinol, β -caroteno, acetato de α -tocoferol.

Analitos	Puntos de la curva de calibración	Concentración (ppm)*	Toma (ml)	Volumen de pipeta automática y aforada (ml)	Volumen final con etanol en matraz aforado (ml)
α -Tocoferol	1	5	0,25	1,00	25
	2	10	0,5	1,00	25
	3	50	2,5*	2,50	25
	4	100	5	5,00	25
Retinol	1	0,1	0,01	0,020	25
	2	0,5	0,05	0,20	25
	3	1	0,1	0,20	25
	4	2,5	0,25	1,00	25
	5	5	0,5	1,00	25
β -Caroteno preparado por el subgrupo B	1	0,1	0,025	0,20	25
	2	0,5	0,125	0,20	25
	3	1	0,5	1,00	50
	4	2	0,5	1,00	25
	5	5	1,0	1,00	20
Acetato de α -tocoferol	1	5	0,25	1,00	25
	2	10	1,0	1,00	50
	3	50	0,25*	1,00	50
	4	100	5,0	5,00	25
	5	200	2,0*	2,00	100
β -Caroteno preparado por el subgrupo A	1	0,1	0,025	0,20	25
	2	0,5	0,125	0,20	25
	3	1	0,5	1,00	50
	4	2	0,5	1,00	25
	5	5	1,0	1,00	20

*Toma realizada desde la solución madre.

Las concentraciones están expresadas en ppm, donde 1 ppm = 1 μ g/ml = 100 μ g/dl.

Con el fin de proteger las soluciones estándar, la preparación de las mismas se efectuó en la sala de metabolitos fotosensibles. Esta es una zona cerrada del laboratorio de Nutrición, Alimentación y Metabolismo (NAM), de la Unidad Académica de Investigación, de la Escuela de Nutrición, donde se utiliza luz de color rojo, evitando la exposición a la luz artificial blanca o natural.

Al finalizar las preparaciones de las soluciones para cada analito trabajado, estas fueron conservadas en distintos viales de color ámbar de 5 y 10 ml, y almacenadas a diferentes temperaturas, guardándose en ultracongelador a una temperatura de -80°C , en congelador a -18°C , en heladera de 2°C a 6°C y a temperatura ambiente.

Durante la séptima semana de trabajo, se seleccionó una muestra de acetato de α -tocoferol y de β -caroteno, conservadas a -80°C en vial ámbar, y se almacenaron en tubo Falcon transparente a temperatura ambiente, expuestas a luz para evaluar la estabilidad de las soluciones en estas condiciones de almacenamiento.

4.3. Procedimiento para la lectura de disoluciones patrón.

Inicialmente, se realizó una primera lectura de las disoluciones recientemente elaboradas, utilizándose las medidas obtenidas en la construcción de las curvas de calibración.

Para la medición de las absorbancias se tomaron cubetas de cuarzo, realizando entre dos a tres enjuagues de su interior con la disolución a medir, antes de ser completadas con la misma, en la sala de metabolitos fotosensibles. En el caso del blanco, se utilizó etanol, realizando enjuagues con el mismo. Las cubetas se sellaron con su tapa correspondiente evitando la entrada de aire, siendo necesario realizar enjuagues con etanol en las paredes externas y su posterior secado con papel, eliminando así posibles residuos para evitar interferencias al momento de realizar las lecturas. Una vez listas las cubetas, se cubrieron con papel metálico, evitando la exposición a la luz al ser trasladadas a la sala donde se ubica el lector de placa.

Las cubetas se colocaron en el lector de placas y mediante el software del equipo, se configuran las condiciones experimentales y longitudes de onda de absorción correspondientes a cada analito. Posteriormente, se procedió a realizar las lecturas de absorbancia, obteniendo tres valores correspondientes a las regiones distales y central de la cubeta, registrándolos en el cuaderno de laboratorio. Finalmente se desecharon las muestras ya medidas, reiterando el procedimiento para las demás disoluciones a medir. Cuando la siguiente disolución a medir no correspondía al mismo analito se realizó la limpieza de la cubeta con etanol. Con el fin de corroborar la correcta limpieza,

se completó la cubeta con etanol y se realizó la lectura de la absorbancia. Finalizado el proceso de lecturas de las absorbancias de las correspondientes disoluciones, se procedió a almacenar las muestras restantes en ultracongelador, congelador y heladera.

A partir de la tercera semana, como se muestra en la *Figura 9*, las muestras a medir fueron seleccionadas y trasladadas a la sala de metabolitos fotosensibles desde sus respectivos lugares de almacenamiento. En dicha sala se las dejó termostatar hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de proceder con su análisis. Este paso facilitó la manipulación de la muestra, además de asegurar que esté a temperatura ambiente a la hora de realizar las mediciones, debido a como se menciona en la descripción del método analítico 2.3.1., esta variable puede proporcionar un error en la medida. Luego, el procedimiento de medición de las absorbancias se realizó según lo detallado anteriormente, realizando mediciones semanales durante dos meses, considerando las diferentes variables (tiempo, temperatura y concentración) y cantidad de solución disponible de cada analito.

4.4. Construcción de las curvas de calibración.

Para la construcción de las curvas de calibración se realizó una primera lectura de las disoluciones en condiciones basales. A partir de los tres valores de absorbancia obtenidos por cubeta, se realizó la corrección de las mismas con las del blanco, realizando un promedio de los valores, utilizándose para la construcción de las curvas de calibración de cada analito. Por medio del programa Microsoft Office Excel se realizaron las tablas que comprenden los valores de absorbancia y concentración de cada punto. Posteriormente, se procedió a construir una gráfica, donde mediante el programa se obtuvo una línea de tendencia con sus respectivas ecuaciones y valor de R^2 para cada analito, donde el eje de abscisas corresponde a la concentración en partes por millón (ppm) y el eje de ordenadas a la cantidad experimental medida (promedio de absorbancias) (*Figura 10*).

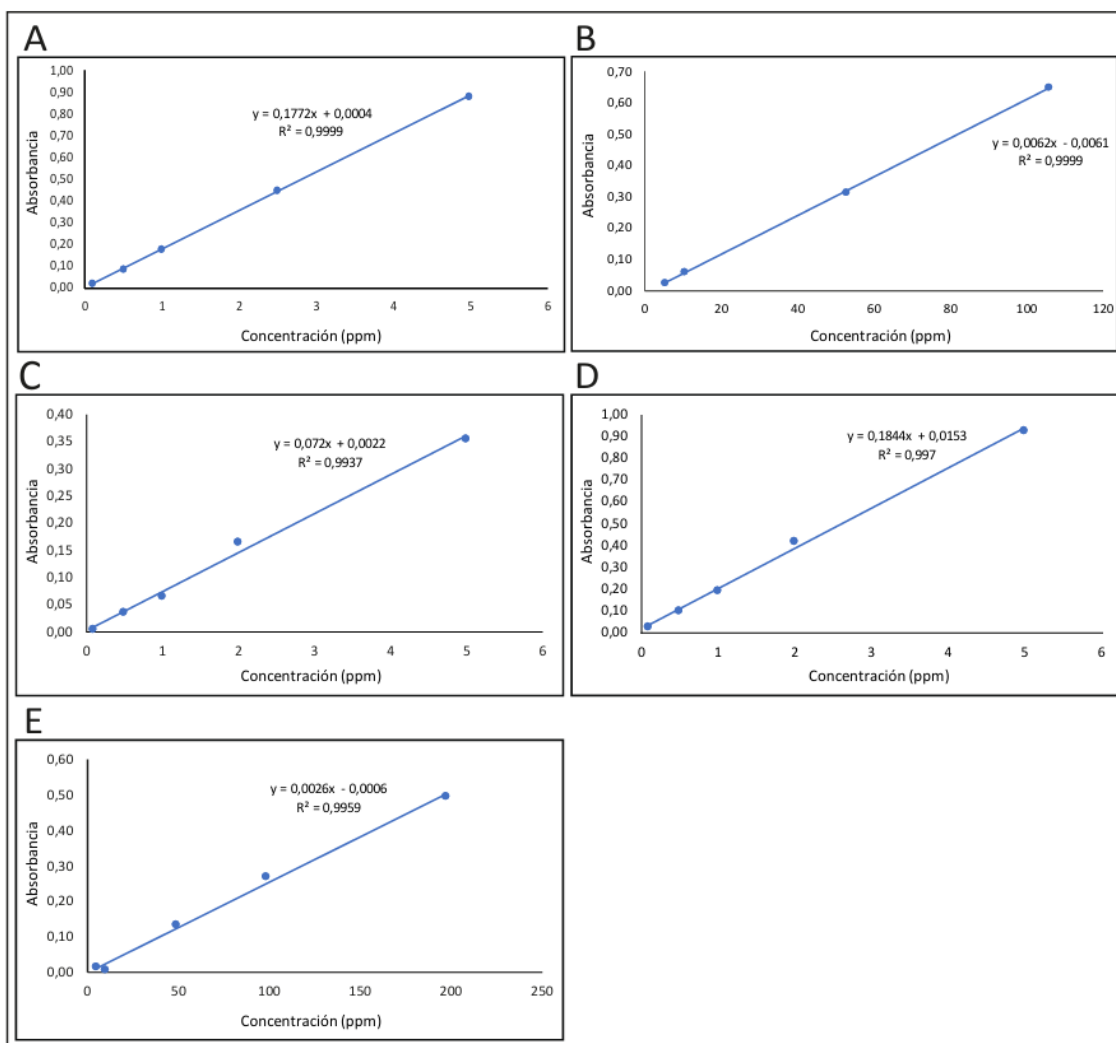


Figura 10. - Curvas de calibración de las disoluciones patrón de retinol **(A)**, α -tocoferol **(B)**, β -caroteno perteneciente al subgrupo A **(C)**, β -caroteno perteneciente al subgrupo B **(D)**, acetato de α -tocoferol **(E)**.

4.5. Análisis estadístico.

Las absorbancias de β -caroteno A y B, obtenidas para la evaluación de las habilidades en laboratorio, fueron utilizadas en la construcción de coeficientes de variación, que fueron expresados en porcentajes. Además, los resultados se expresaron como medias $\pm$ desvío estándar.

Mediante el uso del programa Jamovi, versión 2.3.28 se realizó el análisis de varianza ANOVA mixto de dos factores y la prueba Post-Hoc P-Tukey. De esta forma, se evaluó si había diferencias significativas entre los valores de concentración de las distintas disoluciones preparadas para cada analito a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas de almacenamiento.

5. RESULTADOS

5.1. Habilidades adquiridas para el desempeño en el laboratorio.

En relación al primer objetivo planteado en esta investigación, se buscó adquirir habilidades técnicas para el trabajo efectivo en el laboratorio a través de la participación en capacitaciones, lectura de bibliografía especializada y práctica continua. En la *Tabla 3* se exponen las habilidades técnicas que los integrantes del equipo debieron adquirir para poder realizar un adecuado desempeño durante las jornadas de trabajo en el laboratorio. En ella se detallan dichas habilidades para la correcta manipulación de estándares, disolventes, materiales y equipos, entre otros. De forma cualitativa los integrantes de los subgrupos de trabajo lograron adquirir las habilidades necesarias para el trabajo en laboratorio. Los principales resultados fueron la identificación de las medidas de seguridad y el trabajo en campana con solventes inflamables, correcta preparación de las soluciones correspondientes a cada analito, evitar la contaminación con otras sustancias y mediciones incorrectas de absorbancia. En relación al equipamiento, se logró una adecuada utilización del mismo y de su software para la correcta toma de medidas. Además, al momento de manipular las cubetas se logró disminuir pérdidas innecesarias de disoluciones y valores de concentración alterados por burbujas de aire, contaminación o suciedad.

Tabla 3. - Listado de habilidades adquiridas por los estudiantes.

METAS	RECURSOS	RESULTADOS
Habilidades para el trabajo en el laboratorio		
Conocer las medidas de seguridad para trabajar en un laboratorio.	Bibliografía, jornada de capacitación.	- Identificación de las medidas de seguridad. - Trabajo en campana. - Uso de equipo de protección individual.
Reconocer los lugares de almacenamiento de productos químicos.	Bibliografía y recorrido guiado del lugar de trabajo.	- Optimización del tiempo. - Reducción de riesgos para el operador y/o laboratorio. - Conservación adecuada de sustancias químicas.
Trabajar en zona de fotoprotección.	Jornadas de capacitación.	- Trabajo organizado, con menor riesgo de accidentes de laboratorio. - Evitar la degradación de analitos causada por la luz UV.
Conocer disponibilidad y localización de los diferentes	Bibliografía y recorrido guiado del lugar de trabajo.	- Optimización del tiempo y recursos.

materiales.		
Correcta limpieza de los materiales utilizados.	Jornadas de capacitación.	- Evitar contaminación con otras sustancias y evitar mediciones incorrectas de absorbancia. - Mantener la vida útil de los materiales de trabajo.
Equipos mayores y menores		
Almacenamiento de las disoluciones en ultracongelador y congelador.	Jornadas de capacitación.	Evitar daños en los equipos y posibles alteraciones no deseadas en las disoluciones de trabajo.
Utilización del lector de microplacas.	Jornadas de capacitación.	Utilización adecuada del equipo y software, para la correcta toma de medidas.
Utilización de balanza analítica.	Bibliografía, instructivo de laboratorio y jornada de capacitación.	- Mantenimiento y limpieza de balanza analítica. - Método de pesada adecuado para disminuir errores asociados a las mismas.
Utilización de destilador y purificador de agua.	Jornadas de capacitación.	- Evitar desperdicios de agua destilada y purificada. - Evitar daños y contaminación en los equipos.
Estándares, disolventes y materiales		
Identificar pictogramas de sustancias peligrosas.	Bibliografía.	Evitar posibles daños a materiales y operadores.
Manipulación de material volumétrico: pipetas aforadas, graduadas, automáticas y matraz aforado.	Bibliografía, instructivos del laboratorio y jornadas de capacitación.	- Correcta realización de disoluciones. - Evitar daños en los instrumentos y/o manipuladores.
Llenado y acondicionamiento de cubetas de cuarzo.	Bibliografía y jornadas de capacitación.	Evitar pérdidas innecesarias de disoluciones y valores de concentración alterados por burbujas de aire, contaminación o suciedad.
Manipulación de solvente inflamable en campana.	Jornadas de capacitación.	Evitar daños sobre el operador y al laboratorio.

5.1.1. Evaluación del desempeño de los operadores en el laboratorio.

A continuación, en la *Tabla 4* se muestran los CV obtenidos al comparar las absorbancias de las muestras de β -caroteno, realizadas por los subgrupos A y B de estudiantes, a la semana inicial. De esta forma, se evaluó si ambos subgrupos lograron implementar las técnicas de laboratorio de forma similar, considerándose aceptable una variación menor al 10% entre las absorbancias obtenidas por ambos subgrupos. Los CV de β -caroteno elaborados por el subgrupo A oscilaron entre 0,31% y 0,99%, exceptuando la solución de 0,1 ppm la cual fue de 21,80%, mientras que los CV de las soluciones de β -caroteno del subgrupo B variaron entre 0,02% y 2,59%. Los CV globales de las muestras de β -caroteno preparadas por los subgrupos A y B presentaron un valor de 72,20% en la solución de 0,1 ppm y un valor de 48,66% en la solución de 5 ppm.

Tabla 4. - Variación en las absorbancias obtenidas de los puntos de la curva de calibración de las muestras de β -caroteno realizadas por los subgrupos A y B.

β -caroteno	18/05 (Subgrupo A)						11/05 (Subgrupo B)						Subgrupo A y Subgrupo B		
Conc. (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Medias	Desviación Estándar	CV (%)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Medias	Desviación Estándar	CV (%)	Medias	Desviación Estándar	CV (%)
0.1	0.0047	0.0048	0.0068	0.0054	0.0012	21.80	0.0268	0.0265	0.0255	0.0263	0.0007	2.59	0.0159	0.0114	72.20
0.5	0.0364	0.0368	0.0370	0.0367	0.0003	0.83	0.1006	0.1001	0.1009	0.1005	0.0004	0.40	0.0686	0.0349	50.92
1	0.0660	0.0654	0.0667	0.0660	0.0007	0.99	0.1904	0.1901	0.1897	0.1901	0.0004	0.18	0.1281	0.0679	53.06
2	0.1673	0.1648	0.1658	0.1660	0.0013	0.76	0.4188	0.4204	0.4190	0.4194	0.0009	0.21	0.2927	0.1388	47.43
5.0	0.3559	0.3554	0.3575	0.3563	0.0011	0.31	0.9255	0.9258	0.9259	0.9257	0.0002	0.02	0.6410	0.3119	48.66

Conc.: Concentración.

Lectura: Corresponden a las absorbancias.

CV (%): Coeficiente de Variación expresado en porcentaje

En la *Tabla 5* se presentan los CV obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia de las soluciones de α -tocoferol, retinol y acetato de α -tocoferol. Los CV para el α -tocoferol fueron menores al 1%. En el caso del retinol oscilaron entre el 0,12% y 3,95%. Para la solución del acetato de α -tocoferol de 5 ppm el CV fue 2,01%, y para la solución de 10 ppm alcanzó el 8,11%, mientras que para las demás soluciones (50 ppm, 100 ppm, 200 ppm) fueron menores al 1%.

Tabla 5. - Variación en las absorbancias obtenidas de los puntos de la curva de calibración de las muestras de α -tocoferol, retinol y acetato de α -tocoferol en la semana inicial.

Analito	Concentración (ppm)	CV (%)
α-Tocoferol	5	0,92
	10	0,41
	50	0,41
	100	0,04
Retinol	0,1	2,62
	0,5	3,95
	1	0,19
	2,5	0,32
	5	0,12
Acetato α-tocoferol	5	2,01
	10	8,11
	50	0,34
	100	0,39
	200	0,06

CV (%): Coeficiente de Variación expresado en porcentaje.

5.2. Cambios de las concentraciones de disoluciones de estándares de vitaminas liposolubles en el tiempo.

En la *Figura 11* se muestran los cambios de las concentraciones de las disoluciones de vitaminas liposolubles almacenadas a diferentes temperaturas durante su respectivo tiempo de estudio, preparadas a partir de estándares de retinol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferol y β -caroteno.

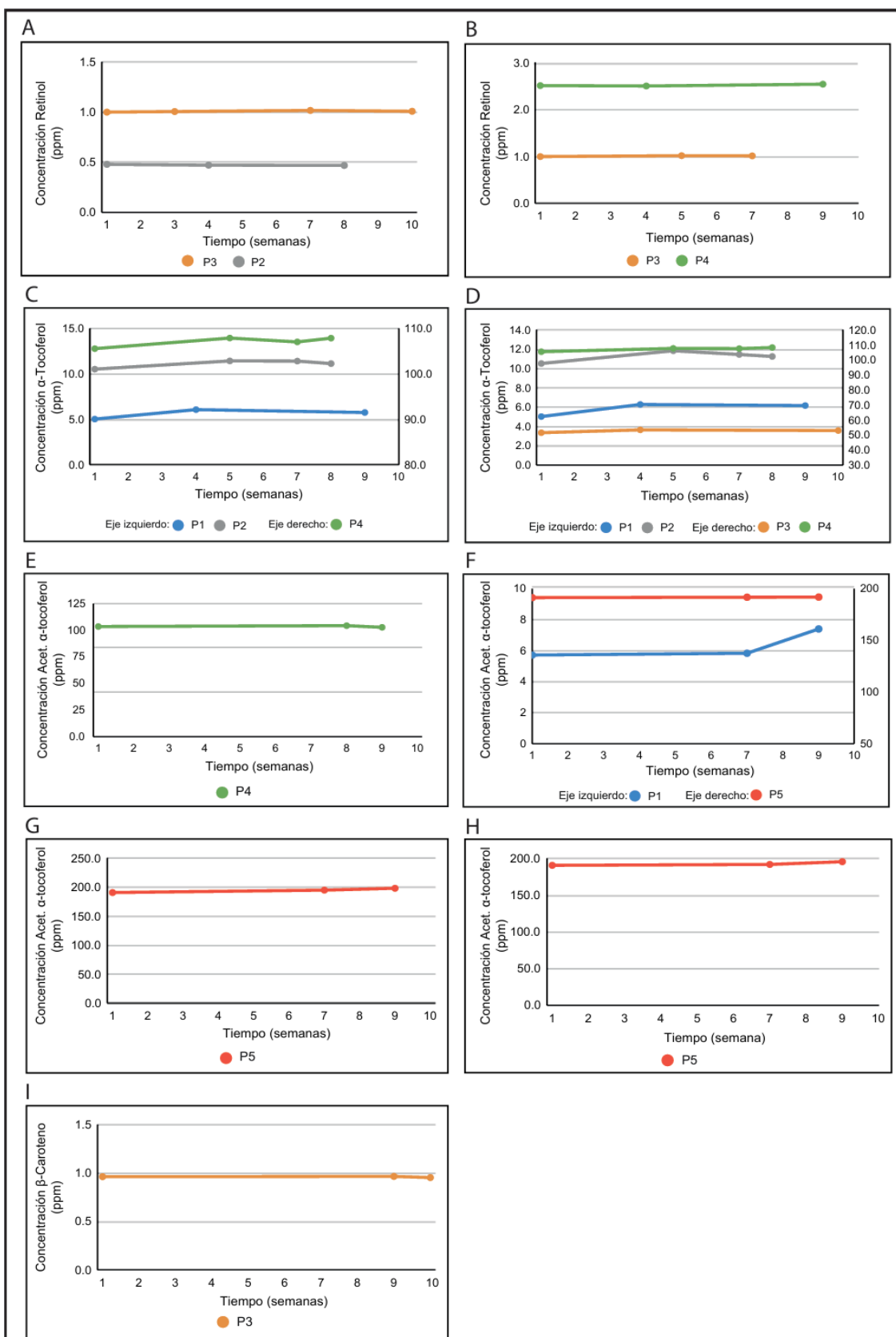


Figura 11. - Cambios en la concentración de las disoluciones de estándares de retinol almacenados a -18°C (A) y -80°C (B); de α -tocoferol a -18°C (C) y -80°C (D); acetato de α -tocoferol a -80°C (E), -18°C (F), 2°C a 6°C (G) y temperatura ambiente (H); y β -caroteno B a -18°C (I).

P1: punto 1; P2: punto 2; P3: punto 3; P4: punto 4; P5: punto 5.

La solución P2 (0,5 ppm) de retinol, almacenada a -18°C, presentó una concentración inicial de 0,4782 ppm, siendo la final de 0,4685 ppm. Por su parte, la solución P4 (2,5 ppm), almacenada a -80°C, mostró una concentración inicial de 2,5119 ppm y finalizó en 2,5425 ppm.

En el caso del α -tocoferol, la solución P1 (5 ppm) almacenada a -18°C tuvo una concentración inicial de 5,0376 ppm y una concentración final de 5,7634 ppm, mientras que la misma solución almacenada a -80°C presentó una concentración final de 6,1774 ppm. La solución P4 (100 ppm) almacenada a -18°C, presentó una concentración inicial de 105,5968 ppm y finalizó con 107,9086 ppm, mientras que la misma solución almacenada a -80°C mostró una concentración final de 108,3978 ppm.

En cuanto al acetato de α -tocoferol, la solución P1 (5 ppm) almacenada a -18°C presentó una concentración inicial de 5,7051 ppm y finalizó con 7,3846 ppm. Las soluciones P5 (200 ppm) almacenadas a -18°C, 2°C a 6°C y temperatura ambiente mostraron una concentración inicial de 191,0000 ppm y una concentración final de 191,5385 ppm, 198,3720 ppm y 195,9615 ppm respectivamente.

En relación al β -caroteno, la solución P3 almacenada a -18°C, presentó una concentración inicial de 0,9648 ppm, finalizando con 0,9558 ppm.

En la tabla siguiente (*Tabla 6*) se detalla entre qué tiempos de evaluación se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

5.3. Evaluación de la concentración de los estándares de vitaminas liposolubles en función del tiempo, temperatura de almacenamiento y exposición a la luz artificial blanca y/o natural.

En la *Tabla 6* se presenta la comparación de las concentraciones de las soluciones de retinol, α -tocoferol, acetato de α -tocoferol y β -caroteno para una misma temperatura en el transcurso del tiempo y para un determinado tiempo entre diferentes temperaturas, estando almacenadas en viales color ámbar. A su vez, se presentan los resultados del comportamiento de la concentración de la solución P3 (50 ppm) del acetato de α -tocoferol almacenado a temperatura ambiente, en tubo Falcon expuesto a la luz durante dos semanas.

Al analizar los resultados obtenidos a partir de las muestras de retinol, se observó que la concentración de la solución P2 (0,5 ppm) almacenada a -18°C no presentó cambios durante el tiempo de estudio. En el caso de la solución P3 (1,0 ppm) almacenada a -18°C y a -80°C se observó un aumento entre la semana inicial y la semana 7. Para la

solución P4 (2,5 ppm) almacenada a -80°C se detectó un aumento entre la semana inicial y 9.

En cuanto al α -tocoferol, la solución P1 (5 ppm) almacenada a -80°C en las semanas 4 y 9, presentó una concentración mayor que la semana inicial, sin embargo, entre las semanas 4 y 9 hubo una disminución de la misma, ocurriendo lo mismo con la solución P1 almacenada a -18°C. Por su parte, la concentración de las soluciones P2 (10 ppm) almacenadas a -80°C y -18°C en las semanas 5, 7 y 8 resultó ser mayor que la semana inicial. Además, la solución almacenada a -18°C presentó una disminución entre las semanas 7 y 8. El comportamiento de la solución P3 (50 ppm) almacenada a -80°C presentó un aumento entre la semana inicial y semana 4, de igual forma con la semana 10. La concentración de la solución P4 (100 ppm) almacenada a -80°C en las semanas 5, 7 y 8 fue mayor que la semana inicial. Además, la concentración de la semana 8 fue mayor a la de las semanas 5 y 7. La concentración de la misma almacenada a -18°C en las semanas 5, 7 y 8 fue mayor que la semana inicial, además entre la semana 7 y 8 presentó un aumento.

Tabla 6. - Concentración de las soluciones de estándares de retinol, α -tocoferol, β -caroteno y acetato de α -tocoferol considerando las variables tiempo, temperatura de almacenamiento y exposición a la luz artificial blanca y/o natural.

Analito	Tiempo (Semanas)	Temperatura (°C)	Concentración (ppm)				
			0.1 (P1)	0.5 (P2)	1 (P3)	2.5 (P4)	5 (P5)
Retinol	Inicial	Ambiente	-	0.478 $\pm$ 0.019	0.999 $\pm$ 0.002	2.512 $\pm$ 0.010	-
	3-5	-80	-	-	1.018 $\pm$ 0.008	2.503 $\pm$ 0.000	-
		-18	-	0.470 $\pm$ 0.004	1.005 $\pm$ 0.024	-	-
	7-9	-80	-	-	1.014 ¹ $\pm$ 0.005	2.542 ^{1 2} $\pm$ 0.003	-
		-18	-	0.468 $\pm$ 0.006	1.016 ¹ $\pm$ 0.005	-	-
	10	-80	-	-	-	-	-
		-18	-	-	1.007 $\pm$ 0.002	-	-
	Valor p1	-80	-	-	0.041	0.001	-
		-18	-	0.068	0.513	-	-
	Valor p2	Sem. 3-5	-	-	0.513	-	-
		Sem. 7-9	-	-	0.513	-	-
α -Tocoferol	Tiempo (Semanas)	Temperatura (°C)	Concentración (ppm)				
			5 (P1)	10 (P2)	50 (P3)	100 (P4)	-
	Inicial	Ambiente	5.038 $\pm$ 0.041	10.538 $\pm$ 0.041	51.634 $\pm$ 0.089	105.597 $\pm$ 0.043	-
	4-5	-80	6.290 ¹ $\pm$ 0.229	11.860 ¹ $\pm$ 0.219	53.516 ¹ $\pm$ 0.308	107.817 ¹ $\pm$ 0.057	-
		-18	6.081 ¹ $\pm$ 0.032	11.446 ¹ $\pm$ 0.145	-	107.930 ¹ $\pm$ 0.298	-
	7	-80	-	11.473 ¹ $\pm$ 0.009	-	107.693 ¹ $\pm$ 0.074	-
		-18	-	11.430 ¹ $\pm$ 0.041	-	107.080 ¹ $\pm$ 0.016	-
	8	-80	-	11.269 ¹ $\pm$ 0.102	-	108.397 ^{1 2 3} $\pm$ 0.107	-
		-18	-	11.150 ^{1 3} $\pm$ 0.052	-	107.908 ^{1 3} $\pm$ 0.061	-
	9-10	-80	6.177 ^{1 **} $\pm$ 0.084	-	53.054 ¹ $\pm$ 0.121	-	-
		-18	5.763 ^{1 2 **} $\pm$ 0.049	-	-	-	-

	<i>Valor p1</i>	-80	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-
		-18	<0.001	<0.001	-	<0.001	-
	<i>Valor p2</i>	Sem. 9-10	0.046	-	-	-	-
Acetato α-tocoferol	<i>Tiempo (Semanas)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Concentración (ppm)</i>				
			5 (P1)	10 (P2)	50 (P3)	100 (P4)	200 (P5)
	Inicial	Ambiente	5.705 ± 0.111	-	-	103.192 ± 0.400	191.000 ± 0.1154
	7-8	-80	-	-	-	104.013 ± 0.579	-
		-18	5.821 ± 0.284	-	-	-	191.397 ± 0.894
		2-6	-	-	-	-	195.179 ¹ ± 0.432
		Ambiente*	-	-	-	-	192.218 ¹ ± 0.609
	9	-80	-	-	-	102.449 ± 0.097	-
		-18	7.385 ± 1.033	-	-	-	191.539 ± 0.038
		2-6	-	-	-	-	198.372 ± 2.907
		Ambiente*	-	-	-	-	195.961 ¹ ± 2.406
	<i>Valor p 1</i>	-80	-	-	-	0.065	-
		-18	0.068	-	-	-	0.485
		2-6	-	-	-	-	0.018
		Ambiente*	-	-	-	-	0.021
	<i>Valor p2</i>	<i>Sem. 7-8.</i>	-18 y 2-6	-	-	-	0.121
			-18 y Amb*	-	-	-	0.650
			2-6 y Amb*	-	-	-	0.121
		<i>Sem. 9</i>	-18 y 2-6	-	-	-	0.121
			-18 y Amb*	-	-	-	0.121

			2-6 y Amb*	-	-	-	-	0.520
β-Caroteno	<i>Tiempo (Semanas)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>		<i>Concentración (ppm)</i>				
				-	-	1 (P3)	-	-
	Inicial	Ambiente		-	-	0.965 ± 0.002	-	-
	9	-18		-	-	0.968 ± 0.001	-	-
	10	-18		-	-	0.956⁴ ± 0.002	-	-
	Valor p 1	-18		-	-	0.001	-	-
Acetato de α-tocoferol	<i>Tiempo (Semanas)</i>	<i>Exposición a luz (SI/NO)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Concentración (ppm)</i>				
				-	-	50 (P3)	-	-
	Inicial	NO	Ambiente	-	-	51.679 ± 0.173	-	-
	8	SI	Ambiente*	-	-	54.256¹ ± 0.146	-	-
	9	SI	Ambiente*	-	-	53.782¹ ± 0.456	-	-
	Valor p 1	Ambiente		-	-	0.001	-	-

Valores expresados en medias ± desvío estándar. Diferencia estadísticamente significativa: las medias con distintos números superíndice y ** son significativamente diferentes (ANOVA de Medidas Repetidas - Post Hoc y de Un Factor), P < 0.05.

* Soluciones almacenadas a temperatura ambiente.

** Concentraciones que presentan una variación significativa entre temperaturas.

¹ Diferencia significativa de concentraciones con la semana inicial.

² Diferencia significativa de concentraciones con semana 3-5 en el transcurso del tiempo a una misma temperatura de almacenamiento.

³ Diferencia significativa de concentraciones con semana 7 en el transcurso del tiempo a una misma temperatura de almacenamiento.

⁴ Diferencia significativa de concentraciones con semana 9 en el transcurso del tiempo a una misma temperatura de almacenamiento.

Valor p1: Comparación de las concentraciones en función del tiempo.

Valor p2: Comparación de las concentraciones entre diferentes temperaturas, en el mismo tiempo.

Las soluciones de acetato de α -tocoferol P1 (5 ppm) y P4 (100 ppm) no presentaron una variación significativa de su concentración a lo largo del estudio. La concentración de la solución P5 (200 ppm) almacenada entre 2°C y 6°C presentó un aumento entre la semana inicial y la semana 7. Al ser almacenada a temperatura ambiente presentó un aumento entre la semana inicial y las semanas 7 y 9.

La concentración de la solución P3 (1,0 ppm) de β -caroteno almacenada a -18°C presentó una disminución entre las semanas 9 y 10.

Respecto al comportamiento de las concentraciones a diferentes temperaturas en un mismo tiempo, se observó que las muestras de retinol almacenadas a -80°C y -18°C no presentaron una diferencia significativa entre ellas durante nueve semanas. La muestra del P1 (5 ppm) de la solución de α -tocoferol almacenada a -18°C presentó una concentración menor que la almacenada a -80°C, en la semana 9. Finalmente, las muestras de acetato de α -tocoferol no presentaron cambios significativos entre las diferentes temperaturas de almacenamiento (-18°C, de 2°C a 6°C y ambiente).

En relación al acetato de α -tocoferol expuesto a la luz, la solución P3 (50 ppm) almacenada a temperatura ambiente, presentó un aumento en su concentración entre la semana inicial y las semanas 8 y 9.

6. DISCUSIÓN

6.1. Habilidades técnicas adquiridas en el laboratorio.

Los resultados obtenidos en el laboratorio subrayan la importancia de las habilidades prácticas en el manejo seguro y eficiente de los materiales y equipos. En ese sentido, un aspecto fundamental fue la correcta identificación y aplicación de las medidas de seguridad, especialmente al trabajar en campana con solventes inflamables, garantizando la protección personal y del entorno de trabajo. El uso de etanol en una campana extractora es crucial en un laboratorio químico debido a su volatilidad e inflamabilidad. Según los manuales de seguridad, los vapores de etanol pueden formar mezclas explosivas en espacios cerrados y causar problemas de salud como irritación ocular y respiratoria y mareos (97-99). Mediante el conocimiento de los riesgos asociados al trabajo con etanol, se adoptaron medidas de protección como el uso de lentes de seguridad y guantes, además de limitar la duración de las jornadas de trabajo y mantener los matraces cubiertos al trabajar en la sala de metabolitos fotosensibles, donde no se contaba con campana extractora, minimizando así la exposición a los vapores (98).

El manejo correcto del equipamiento, material y estándares para el trabajo de laboratorio fue otro aspecto clave destacado en los resultados. La capacitación previa permitió una toma de medidas más precisa y consistente, esencial para la reproducibilidad de los experimentos (100). Además, lograr una correcta manipulación de las cubetas, reduce las pérdidas innecesarias de disoluciones y minimiza los errores en las concentraciones de las muestras causados por la presencia de burbujas de aire, contaminación o suciedad en las cubetas. Estos hallazgos concuerdan con las enseñanzas en ciencias según Hofstein (100) donde se resalta la importancia de una formación en técnicas de laboratorio, no sólo en términos de seguridad y precisión, sino también en la optimización de los procesos para evitar errores que puedan comprometer la fiabilidad de los resultados obtenidos (100, 101).

Por otro lado, se logró una correcta elaboración en la mayoría de las disoluciones específicas para cada analito. No obstante, la imprecisión en algunos casos condujo a errores que afectaron las mediciones de absorbancia, llevando al descarte de las mismas. La correcta preparación de soluciones es fundamental en la química analítica, ya que la precisión en la concentración de los analitos es clave para la fiabilidad de las mediciones, especialmente en técnicas sensibles como la espectrofotometría. Según Harris (102), incluso pequeños errores en la preparación pueden causar variaciones en las mediciones, resultando en datos inconsistentes y desperdicio de recursos. Por ello,

es esencial seguir estrictamente los protocolos de preparación para garantizar la exactitud y reproducibilidad de los resultados en el laboratorio (102).

Con la finalidad de evaluar la reproducibilidad del método analítico, se compararon los resultados obtenidos a partir de dos disoluciones de β -caroteno, una preparada por el subgrupo A y la siguiente por el subgrupo B. Para ambas disoluciones la aplicación del método fue el mismo, variando únicamente el operador que realizó la preparación de la muestra y medición de la absorbancia, permitiendo así analizar la variabilidad de las medidas obtenidas. Las absorbancias obtenidas, a partir del análisis de las muestras realizadas por ambos subgrupos, presentaron coeficientes de variación superiores al 10%. Este valor se encuentra fuera del margen considerado aceptable para este estudio, indicando que las técnicas de laboratorio implementadas por cada subgrupo al elaborar las soluciones de β -caroteno no fueron similares (103, 104). Una posible causa en la variación de los resultados fue el material volumétrico utilizado para la elaboración de la solución de trabajo, específicamente la pipeta aforada. De acuerdo con la metodología, se debería de haber utilizado una pipeta de 5 ml para realizar la solución de trabajo; sin embargo, al analizar las lecturas de absorbancia, se observó que las del subgrupo B eran aproximadamente el doble que las del subgrupo A (*Tabla 4*). Esto sugiere que la toma de solución madre para elaborar la solución de trabajo por parte del subgrupo A fue de 2,50 ml o 2,00 ml, disminuyendo las concentraciones de cada uno de los puntos de la curva de calibración aproximadamente a la mitad. Durante el estudio, hubiese sido beneficioso realizar los CV correspondientes a las lecturas de absorbancia obtenidas en condiciones basales, luego de finalizadas las mediciones. Una validación cruzada de las lecturas, interpolando las del subgrupo A en la curva de calibración del subgrupo B y viceversa, habría facilitado detectar posibles diferencias entre la técnica empleada por ambos subgrupos en la elaboración de las disoluciones. De haberse identificado estas diferencias desde el inicio, se podrían haber preparado nuevamente las soluciones de trabajo para asegurar la calidad en los resultados posteriores (105, 106).

A pesar de los posibles errores en la preparación de la solución de trabajo, se observó que los valores obtenidos de cada coeficiente de determinación, para cada curva de calibración, fueron cercanos a uno, lo que indica un mejor ajuste del modelo a los datos graficados y por lo tanto una relación lineal entre las variables estudiadas (*Figura 10*) (80, 83, 107). Además, al analizar los CV obtenidos por cada subgrupo, a partir de las absorbancias de los diferentes analitos preparados, se observó que la mayor parte de los valores fueron inferiores al 10%. Esto sugiere que las técnicas empleadas para la medición de las absorbancias se realizaron adecuadamente, evitando posibles valores alterados. Únicamente la solución P1 de β -caroteno realizada por el subgrupo A superó

el 10%. Esto pudo deberse a que, durante el procesamiento de los datos, los valores de absorbancia de la solución P1 y las del blanco fueron muy similares. Esta similitud entre los valores podría deberse a un posible error cometido en la realización de la solución de trabajo, mencionado anteriormente, causando una disminución en la concentración de la solución P1, lo cual implica un menor valor de absorbancia, generando un mayor coeficiente de variación (104).

6.2. Comportamiento de las concentraciones de estándares de vitaminas liposolubles a diferentes temperaturas, tiempo y exposición a la luz artificial blanca y/o natural.

En este componente del estudio, se evaluó la estabilidad de diferentes concentraciones de soluciones de retinol, α -tocoferol y β -caroteno, almacenadas en viales ámbar, y acetato de α -tocoferol en viales ámbar y transparentes, a distintas temperaturas durante varias semanas.

En relación a la concentración de las soluciones de retinol, se observó que la de menor concentración almacenada a una temperatura de -18°C se mantuvo estable durante todo su proceso de estudio correspondiente a nueve semanas. Por otra parte, las demás soluciones se mantuvieron estables por aproximadamente un mes independientemente de su temperatura de almacenamiento. Los resultados se asemejan con otros estudios donde las soluciones de retinol almacenadas a -20°C se mantuvieron estables durante un mes (96, 108).

Los resultados obtenidos a partir de las soluciones de α -tocoferol indicaron la inestabilidad de su concentración luego de ser almacenadas durante tres a cuatro semanas (-18°C y -80°C), independientemente de la concentración inicial de las muestras. Estos resultados presentan semejanza con los obtenidos por Karakosta et al. (96) donde las muestras de sangre almacenadas a -20°C comenzaron a manifestar diferencias significativas en su concentración luego de 14 días en comparación a la medición inicial (96). En la solución de α -tocoferol de 5 ppm las muestras presentaron una diferencia significativa dependiendo de las temperaturas de almacenamiento (-18°C y -80°C) luego de nueve semanas. Estos resultados sugieren que las temperaturas de ultracongelación podrían ser un recurso de gran valor en la conservación de soluciones de α -tocoferol. De acuerdo al estudio realizado por Torquato et al. (95), temperaturas de -80°C y -196°C han mostrado preservar de forma óptima la concentración de α -tocoferol

en muestras de plasma humano, evitando la formación de productos de degradación como α -tocoferil quinona (95).

El acetato de α -tocoferol resultó ser estable en la mayor parte de las condiciones evaluadas. En el presente estudio se esperaba una disminución de la concentración en las muestras de acetato de α -tocoferol (95), sin embargo, las diferencias significativas refieren a un aumento de la misma. Debido a la reducida bibliografía disponible, se plantea como hipótesis la posibilidad de que el etanol se haya evaporado durante la manipulación de los viales. Cuando el etanol se evapora, la concentración del acetato de α -tocoferol en la solución podría aumentar, ya que el volumen total de la solución disminuye mientras la cantidad de acetato de α -tocoferol permanece constante (109). Con respecto a las muestras expuestas a la luz, en la solución de 50 ppm almacenada a temperatura ambiente se observó un aumento en la concentración en un período de dos semanas. Este cambio pudo deberse a la exposición continua a la luz, donde la fotooxidación pudo haber generado productos intermedios como las quinonas (95, 110), incrementando la absorbancia de la solución en la longitud de onda utilizada, debido a que la quinona presenta un espectro de absorción en una longitud de onda similar a la del acetato de α -tocoferol (240 nm a 290 nm) (111). Estos resultados son congruentes con la literatura científica encontrada, donde se sugiere la necesidad de almacenar compuestos como el acetato de α -tocoferol a bajas temperaturas con fotoprotección para mantener su estabilidad a largo plazo (95).

Al comparar los resultados obtenidos de la solución de β -caroteno con los presentados en el artículo de Stutz et al. (89), se observó una coincidencia en la degradación del analito, puesto que la solución de 1,0 ppm almacenada a -18°C presentó una disminución en la concentración entre las semanas 9 y 10, lo que sugiere una menor estabilidad del compuesto en las etapas finales del periodo evaluado. Aunque temperaturas como -18°C o -20°C pueden ser adecuadas para almacenamiento a corto plazo, la utilización de temperaturas más bajas como -80°C es recomendable para asegurar una mejor conservación del compuesto a largo plazo, garantizando así resultados más fiables y precisos (89).

6.3. Limitaciones del estudio.

Una de las limitaciones de esta investigación fue la cantidad limitada de soluciones disponibles para el trabajo de laboratorio, lo que impidió exponerlas a todas las variables consideradas y redujo el número de mediciones semanales. Esta restricción se debió al alto costo de los estándares de los analitos y al tiempo limitado de los operadores para realizar el trabajo. Además, la falta de experiencia en el trabajo de laboratorio por parte

del grupo de investigación también representó un desafío. Sin embargo, este estudio ofrece una valiosa oportunidad para que los estudiantes de Licenciatura en Nutrición se introduzcan en el campo del análisis químico. A pesar de esta limitación, el estudio contribuye con conocimientos importantes sobre la estabilidad de las vitaminas A y E.

7. CONCLUSIÓN

Los estudiantes de ambos subgrupos de trabajo lograron adquirir habilidades técnicas adecuadas en la manipulación de materiales de laboratorio y en el seguimiento de protocolos de seguridad. Los CV de la mayoría de las disoluciones de cada subgrupo (A y B) indicaron una correcta manipulación de los materiales y equipos al realizar las lecturas de absorbancia. Sin embargo, los coeficientes de variación globales confirmaron inconsistencias en las técnicas de elaboración entre los subgrupos, lo que sugiere errores en el uso del material volumétrico.

En este estudio se logró estudiar la variación de las concentraciones de las distintas soluciones de trabajo almacenadas a diferentes temperaturas. En el caso de las soluciones de retinol, estas demostraron una estabilidad variable dependiendo de la concentración. A niveles bajos, se mantuvo constante, mientras que a concentraciones más elevadas se incrementó, independientemente de la temperatura de almacenamiento empleada. Por otra parte, los resultados indicaron que la concentración de α -tocoferol aumentó desde las primeras semanas de almacenamiento, independientemente de la concentración y temperatura. Con respecto a las muestras de acetato de α -tocoferol, estas fueron estables a bajas temperaturas, independientemente de la concentración. Sin embargo, a mayores concentraciones y temperaturas fueron inestables, al igual que las expuestas a la luz.

Por último, el β -caroteno mostró ser inestable en relación al tiempo de almacenamiento, en etapas tardías del estudio.

En función de los resultados obtenidos, este trabajo concluye que es recomendable el almacenamiento de las soluciones estándares de vitaminas liposolubles a bajas temperaturas y la aplicación de condiciones de fotoprotección, con el fin de asegurar la estabilidad de las muestras proporcionando precisión y reproducibilidad de los resultados en estudios futuros y análisis clínicos.

8. RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones de estudiantes de Licenciatura en Nutrición, se recomienda centrarse en la estricta estandarización de las técnicas de laboratorio, incluyendo la validación cruzada de las lecturas y el uso adecuado del material volumétrico. Además, sería útil llevar a cabo un análisis detallado de los factores que afectan la precisión de las mediciones, como la calibración de los instrumentos y la capacitación del personal en técnicas de pipeteo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Pereda J, Bove I, Pineyro MM. Excessive maternal weight and diabetes are risk factors for macrosomia: A cross-sectional study of 42,663 pregnancies in Uruguay. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2020;11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2020.588443>
- (2) De Souza Mesquita LM, Mennitti LV, de Rosso VV, Pisani LP. The role of vitamin A and its pro-vitamin carotenoids in fetal and neonatal programming: gaps in knowledge and metabolic pathways. *Nutr Rev*. 2020;79(1):76–87. doi:10.1093/nutrit/nuaa075
<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/79/1/76/6029358?login=false>
- (3) Ma H, Qiao Z, Li N, Zhao Y, Zhang S. The relationship between changes in vitamin A, vitamin E, and oxidative stress levels, and pregnancy outcomes in patients with gestational diabetes mellitus. *Ann Palliat Med* [Internet]. 2021; 10(6):6630–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34118857/>
- (4) Fernandes TF, Andreto LM, Vieira CS, de Arruda IK, Diniz Ada S. Serum retinol concentrations in mothers and newborns at delivery in a public maternity hospital in Recife, northeast Brazil. *J Health Popul Nutr*. 2014 Mar.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4089069/>
- (5) Yang, C., Zhao, A., Ren, Z., Zhang, J., Wang, P., & Zhang, Y. (2022). Vitamin A Nutritional Status of Urban Lactating Chinese Women and Its Associated Factors. *Nutrients*, 14(15), 3184. 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14153184>
- (6) Cruz Manzano EF, Mompié Gómez G, Moreno Mayrelis L, Postigo Osmany E, Milanés Ojea MR, Sanfiel Vasseur L. Adecuación del consumo diario y estado de vitaminas antioxidantes en gestantes de la ciudad de Bayamo. *Rev Cubana Invest Bioméd*. 2018 Sep. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002018000300011
- (7) Pita Rodríguez G, Monterrey Gutiérrez P, Rodríguez Cárdenas A, Pérez Díaz C, Macías Matos C, Serrano Sintés G. Factores que influyen en las deficiencias de vitaminas E y C en embarazadas y recién nacidos. *Rev Cub Salud Publica* [Internet]. 2004; 30(2):0–0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-34662004000200003&script=sci_arttext
- (8) Darnton-Hill I, Webb P, Harvey PWJ, Hunt JM, Dalmiya N, Chopra M, et al. Micronutrient deficiencies and gender: social and economic costs. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2005;81(5):1198S-1205S. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/81.5.1198>
- (9) Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2040110/>

- (10) Ross, A. C., Caballero, B., Cousins, R. J., Tucker, K. L., & Ziegler, T. R. (2014). Modern Nutrition in Health and Disease. Bock, J. L. (2002). Glass containers for pharmaceutical use: composition, properties and tests. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(5), 1217-1225.
- (11) Such Díaz, A. et al. Estabilidad de vitaminas en nutrición parenteral. *Nutr. Hosp.* vol.24 no.1 Madrid ene./feb. 2009. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112009000100001
- (12) Guerediain M, Mayneris-Perxachs J, Montes R, López-Sabater MC, Campoy C, EVASYON Study Group. Relation between plasma antioxidant vitamin levels, adiposity and cardio-metabolic profile in adolescents: Effects of a multidisciplinary obesity programme. *Clin Nutr.* 2015 Nov;34(6):1117-1123. doi: 10.1016/j.clnu.2015.11.001.
- (13) Chazi, C. Las Vitaminas. La Granja; 2006. <https://doi.org/10.17163/lgr.n4.2005.07>
- (14) Carbajal Azcona, A. Manual de Nutrición y Dietética. Universidad Complutense de Madrid, 2013. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/36607>
- (15) Márquez M, Yépez CE, Sutil-Naranjo R, Rincón M. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E. *Invest Clin [Internet]*. 2002; 43(3):191–204. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332002000300006
- (16) Paparella A, Shaltiel-Harpaza L, Ibdah M. B-ionone: Its occurrence and biological function and metabolic engineering. *Plants [Internet]*. 2021 10(4):754. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/plants10040754>
- (17) Vista de Retinoides I: Relación estructura-actividad [Internet]. Ugr.es. [citado el 13 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/25619/23927>
- (18) Gil Hernández, A. Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición, Tomo I, 2005.
- (19) Fennema, O. Química de los Alimentos. 2º Edición, Editorial Acribia S.A., 2000.
- (20) Kawczak P, Feszak I, Brzeziński P, Bączek T. Structure–activity relationships and therapeutic applications of retinoids in view of potential benefits from drug repurposing process. *Biomedicines [Internet]*. 2024;12(5):1059. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/12/5/1059>

- (21) Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development. Development [Internet]. 2012;139(5):843–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.065938>
- (22) Merhan O. The Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids. Published: 14 June 2017. doi: <https://www.intechopen.com/chapters/54253>
- (23) Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin SA, Biesalski HK. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. J Nutr. 2010 Dec. doi: 10.3945/jn.109.119024.
- (24) Kedishvili NY. Retinoic Acid Synthesis and Degradation. Subcell Biochem. 2016. doi: 10.1007/978-94-024-0945-1_5.
- (25) Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients. 2014 Jan 27. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942711/>
- (26) Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Francisco J. H. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Arch Latinoam Nutr [Internet]. 2004; 54(2):149–55. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06222004000200003&script=sci_arttext
- (27) Mustacich DJ, Bruno RS, Traber MG. Vitamin E. Vitam Horm. 2007;76:1-21 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17628169/>
- (28) González-Pérez Ó, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. El alfa-tocoferol y el ácido alfa-lipoico. Una sinergia antioxidante con potencial en medicina preventiva [Internet]. Medigraphic.com. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2008/nn081h.pdf>
- (29) Robinson I, de Serna DG, Gutierrez A, Schade DS. Vitamin E in humans: An explanation of clinical trial failure. Endocr Pract [Internet]. 2006;12(5):576–82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4158/ep.12.5.576>
- (30) Meydani SN, Lewis ED, Wu D. Perspective: Should Vitamin E Recommendations for Older Adults Be Increased? Adv Nutr. 2018 Sep. doi: 10.1093/advances/nmy035. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6140432/#bib23>
- (31) Cuerq C, Bordat C, Halimi C, Blond E, Nowicki M, Peretti N, et al. Comparison of α -tocopherol, α -tocopherol acetate, and α -tocopheryl polyethylene glycol succinate 1000 absorption by Caco-2 TC7 intestinal cells. Nutrients [Internet]. 2020; 13(1):129. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/nu13010129>
- (32) Brigelius-Flohé, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. The FASEB Journal, 13(10), 1145-1155.

- (33) Carazo, A. et al. Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. 2021 May 18;13(5):1703. doi: 10.3390/nu13051703. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34069881/>
- (34) FoodData Central [Internet]. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2024 [citado 13 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/>
- (35) Tang G, Qin J, Dolnikowski GG, Russell RM, Grusak MA. Golden Rice is an effective source of vitamin A. Am J Clin Nutr [Internet]. 2009; 89(6):1776–83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2008.27119>
- (36) Shahidi F, Pinaffi-Langley ACC, Fuentes J, Speisky H, de Camargo AC. Vitamin E as an essential micronutrient for human health: Common, novel, and unexplored dietary sources. Free Radic Biol Med [Internet]. 2021;176:312–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.025>
- (37) Fang Yee, M.M., Vitamin E and bone health: a review on current evidence. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, Cheras 56000, Kuala Lumpur, Malaysia, Marzo 2021. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/6/1757>
- (38) Gudas LJ, Wagner JA. Los retinoides regulan la diferenciación de células madre. J Cell Physiol. 2011 febrero; 226 (2): 322-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315372/>
- (39) Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. Mol Cell Biochem. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7089381/>
- (40) Latham, M. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Ithaca, Nueva York, Estados Unidos; 2002. <https://www.fao.org/3/w0073s/w0073s0j.htm#bm19x>
- (41) Mora, JO y Dary, O. Deficiencia de vitamina A y acciones para su prevención y control en América Latina y el Caribe. Pan American Journal of Public Health; 1994. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/15638/v117n6p519.pdf>
- (42) Neves PAR, Saunders C, Barros DC de, Ramalho A. Suplementação com vitamina A em gestantes e puérperas brasileiras: uma revisão sistemática. Rev Bras Epidemiol [Internet]. 2015 ;18(4):824–36. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/MpX68Hjp9Jrnzv7zNyKMGqd/?lang=pt>

- (43) Zequeira B, Eugenio D. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev cuba investig bioméd* [Internet]. 2006; 25(2):0–0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002006000200010&script=sci_arttext&lng=en
- (44) Lewis ED, Meydani SN, Wu D. Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB Life*. 2019 Apr.doi: 10.1002/iub.1976. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7011499/>
- (45) Lewis ED, Meydani SN, Wu D. Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB Life*. 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7011499/>
- (46) Kowdley KV, Mason JB, Meydani SN, Cornwall S, Grand RJ. Vitamin e deficiency and impaired cellular immunity related to intestinal fat malabsorption. *Gastroenterology*. 1992 p. 2139–2142. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1587435/>
- (47) Apaza Paucara, J.J. Vitaminas Liposolubles. *Revista de actualización clínica*, volumen 41, 2014.
- (48) Wang X, Quinn PJ Vitamin e and its function in membranes. *Prog Lipid Res*. 38, 1999 p. 309–336. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10793887/>
- (49) Jouanne M, Oddoux S, Noël A, Voisin-Chiret AS. Nutrient Requirements during Pregnancy and Lactation. *Nutrients*. 2021 Feb 21;13(2):692. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7926714/>
- (50) Stephensen CB. Vitamina, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2001 [citado el 13 de agosto de 2024];21(1):167–92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11375434/>
- (51) Tafti M, Ghyselinck NB. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* [Internet]. 2007; 64(12):1706. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18071033/>
- (52) Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* [Internet]. 2011; 3(4):385–428. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/3/4/385>
- (53) Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol*. 2009;114(6):1326–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181c2bde8>

- (54) M, Tinz J, Biesalski HK. The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. *Eur J Nutr*. 2007 Jul. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17665093/>
- (55) Loredana Quadro, Elena Giordano, Brianna K. Costabile, Titli Nargis, Jahangir Iqbal, Younkyung Kim, Lesley Wassef, M. Mahmood Hussain. Interplay between β -carotene and lipoprotein metabolism at the maternal-fetal barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Volume 1865, Issue 11. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158591>
- (56) Lira LQ, de Souza AF, Amâncio AM, Bezerra CG, Pimentel JB, Moia MN, Dimenstein R. Retinol and Betacarotene Status in Mother-Infant Dyads and Associations between Them. *Ann Nutr Metab*. 2018;72(1):50-56. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29268273/>
- (57) da Cunha MSB, Campos Hankins NA, Arruda SF. Effect of vitamin A supplementation on iron status in humans: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29336593/>
- (58) Semba RD, Bloem MW. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *Eur J Clin Nutr [Internet]*. 2002;56(4):271–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601320>
- (59) Wang Y, Gao Y, Liu Q, Zhan X, Li Z, Hu H, et al. Effect of vitamin A and Zn supplementation on indices of vitamin A status, haemoglobin level and defecation of children with persistent diarrhea. *J Clin Biochem Nutr [Internet]*. 2016;59(1):58–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3164/jcbs.15-68>
- (60) Liu J, Zhan S, Jia Y, Li Y, Liu Y, Dong Y, Tang G, Li L, Zhai Y, Cao Z. Retinol and α -tocopherol in pregnancy: Establishment of reference intervals and associations with CBC. *Matern Child Nutr*. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7296784/>
- (61) Cabezuelo, M. T., Zaragozá, R., Barber, T., & Viña, J. R. Role of Vitamin A in Mammary Gland Development and Lactation. *Nutrients*, 12(1), 80. 2019 <https://doi.org/10.3390/nu12010080>
- (62) Huang Z, Liu Y, Qi G, Brand D, Zheng SG. Role of Vitamin A in the Immune System. *J Clin Med*. 2018 Sep 6;7(9):258. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30200565/>
- (63) Pinney SE, Simmons RA. Metabolic programming, epigenetics, and gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep [Internet]*. 2012;12(1):67–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-011-0248-1>

- (64) Krinsky NI. Panel sobre antioxidantes dietéticos y compuestos relacionados. Food and Nutrition Board. 2000.
- (65) Shi H, Gong X, Sheng Q, Li X, Wang Y, Wu T, et al. Gestational vitamin E status and gestational diabetes mellitus: A retrospective cohort study. *Nutrients* [Internet]. 2023; 15(7):1598. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/nu15071598>
- (66) Rahnemaei FA, Fashami MA, Abdi F, Abbasi M. Factors effective in the prevention of Preeclampsia: A systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2020;59(2):173–82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2020.01.002>
- (67) Rumbold A, Ota E, Hori H, Miyazaki C, Crowther CA. Vitamin E supplementation in pregnancy. *Cochrane Libr* [Internet]. 2015; 2016(3). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd004069.pub3>
- (68) Fatemeh Alsadat Rahnemaei, Mahta Abbasi Fashami, Fatemeh Abdi, Mahmoud Abbasi. Factors effective in the prevention of Preeclampsia: A systematic review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. Volume 59, Issue 2. 2020. 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.01.002>
- (69) Duan S, Jiang Y, Mou K, Wang Y, Zhou S, Sun B. Correlation of serum vitamin A and vitamin E levels with the occurrence and severity of preeclampsia. *Am J Transl Res*. 2021;13(12):14203–10.
- (70) Rumbold A, Ota E, Hori H, Miyazaki C, Crowther CA. Vitamin E supplementation in pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015, Issue 9. Art. No.: CD004069. . <https://www.cochranelibrary.com/es/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004069.pub3/full/es#CD004069-sec-0133>.
- (71) Traber MG. Vitamin E inadequacy in humans: Causes and consequences. *Adv Nutr* [Internet]. 2014; 5(5):503–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3945/an.114.006254>
- (72) Dushianthan A, Bracegirdle L, Cusack R, Cumpstey AF, Postle AD, Grocott MPW. Alveolar Hyperoxia and Exacerbation of Lung Injury in Critically Ill SARS-CoV-2 Pneumonia. *Med Sci (Basel)*. 2023 Nov. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37987325/>
- (73) Ginecología y Obstetricia de México. Vol. 89. Nieto Editores; 2021.

- (74) Emami MR, Jamshidi S, Zarezadeh M, Khorshidi M, Olang B, Sajadi Hezaveh Z, et al. Can vitamin E supplementation affect obesity indices? A systematic review and meta-analysis of twenty-four randomized controlled trials. Clin Nutr [Internet]. 2021; 40(5):3201–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33632535/>
- (75) Zhao L, Fang X, Marshall M, Chung S. Regulation of obesity and metabolic complications by gamma and delta tocotrienols. Molecules [Internet]. 2016; 21(3):344. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26978344/>
- (76) Pita Rodríguez G, Monterrey Gutiérrez P, Rodríguez Cárdenas A, Pérez Díaz C, Macías Matos C, Serrano Sintés G. Factores que influyen en las deficiencias de vitaminas E y C en embarazadas y recién nacidos. Rev Cub Salud Publica [Internet]. 2004; 30(2):0–0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-34662004000200003&script=sci_arttext
- (77) Cruz Manzano EF, Mompié Gómez G, León Moreno M, Milanés Ojea MR, Sanfiel Vasseur L. Adecuación del consumo diario y estado de vitaminas antioxidantes en gestantes de la ciudad de Bayamo. Rev cuba investig bioméd [Internet]. 2018; 37(3):1–12. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0864-03002018000300011&script=sci_arttext
- (78) Bendich A. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids institute of Medicine Washington, DC: National Academy Press, 2000 ISBN: 0-309-06935-1. Nutrition [Internet]. 2001;17(4):364. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007\(00\)00596-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007(00)00596-7)
- (79) AOAC International. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington (VA): AOAC International; 1990. Disponible en: <https://www.aoac.org/>
- (80) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. 5ta ed. México McGraw-Hill Companies; 2001.
- (81) Greaves RF, Woollard GA, Hoad KE, Walmsley TA, Johnson LA, Briscoe S, Koetsier S, Harrower T, Gill JP. Laboratory medicine best practice guideline: vitamins a, e and the carotenoids in blood. Clin Biochem Rev. 2014 May.
- (82) Castro Campos, E. Control de calidad de insumos y dietas acuicolas. I Curso Regional de Capacitación organizado por el Proyecto AQUILA II y ejecutado por Fundación Chile. FAO-Italia, capítulo 3. Santiago de Chile, 20/9-8/10/1993.

- (83) J. N. Miller, J. C. Miller, "Estadística y Quimiometría para Química Analítica". 4ª Edición. Prentice Hall, Madrid, 2002 Capítulo 5 "Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación".
- (84) Tom J. UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications. [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>
- (85) Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR. "Modern Nutrition in Health and Disease". Wolters Kluwer Health; 2014. Capítulo 10 - "Vitamin A: Nutritional Aspects and Assessment of Status".
- (86) Lemaire S, Jacquot A, Denimal D. Preanalytical stability of vitamins A and E in whole blood. Clin Biochem. [Internet]. 2023;118(110612):110612. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2023.110612>
- (87) Montalvo Velarde I, López Alarcón M, Casique Salvatierra R. Validación de la medición de retinol y tocoferol por HPLC en muestras tomadas en gotas de sangre sobre papel filtro (GSS) y su comparación con sangre venosa y sangre capilar. Rev Cent Investig Univ La Salle. 2006;7(25):33-43.
- (88) World Health Organization. Sistema de Gestión de la Calidad En El Laboratorio: Manual 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2018.
- (89) Stutz H, Bresgen N, Eckl PM. Analytical tools for the analysis of β -carotene and its degradation products. Free Radic Res [Internet]. 2015;49(5):650–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2015.1022539>
- (90) Rodríguez-Amaya DB. Provitamin A determination - Problems and possible solutions. 1990.
- (91) Delia B. Rodríguez Amaya JA-F. Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A. Archivos Latinoamericanos de Nutricion; 1992.
- (92) Pénicau C, Achir N, Dhuique-Mayer C, Dornier M, Bohuon P. Degradation of β -carotene during fruit and vegetable processing or storage: reaction mechanisms and kinetic aspects: a review. Fruits [Internet]. 2011;66(6):417–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2011058>
- (93) Meinhardt-Wollweber M, Suhr C, Kniggendorf A-K, Roth B. Absorption and resonance Raman characteristics of β -carotene in water-ethanol mixtures, emulsion and hydrogel. AIP Adv [Internet]. 2018;8(5). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.5025788>

- (94) George, F.M. Vitamins In Foods, Analysis, Bioavailability, and Stability. 1st Edition, 2005, pp 824. doi: <https://doi.org/10.1201/9781420026979>
- (95) Torquato P, Giusepponi D, Bartolini D, Barola C, Marinelli R, Sebastiani B, Galarini R, Galli F. Pre-analytical monitoring and protection of oxidizable lipids in human plasma (vitamin E and ω -3 and ω -6 fatty acids): An update for redox-lipidomics methods. Free Radic Biol Med. 2021 Nov 20;176:142-148. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34562608/>
- (96) Karakosta T, Wan Y, Truong D. Establishing preanalytical stability of vitamin A and vitamin E. Clin Biochem [Internet]. 2023;115:144–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2022.12.013>
- (97) The Committee on Prudent Practices in the Laboratory: An Update, Board on Chemical Sciences and Technology, Division on Earth and Life Studies, National Research Council. Prudent practices in the laboratory: Handling and management of chemical hazards, updated version. Washington D.C., DC, Estados Unidos de América: National Academies Press; 2011.
- (98) Occupational Safety and Health Administration. Chemical Laboratory Safety and Security. U.S. Department of Labor; 2016.
- (99) Committee on Chemical Management Toolkit Expansion: Standard Operating Procedures, Board on Chemical Sciences and Technology, Division on Earth and Life Studies, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Chemical laboratory safety and security: A guide to developing standard operating procedures. Washington, D.C.: National Academies Press; 2016.
- (100) Hofstein A, Lunetta VN. The Laboratory in Science Education: Foundations for the Twenty-First Century. Science Education. 2004;88(1):28–54.
- (101) Serrano, A y Hernández, M. Manual de Seguridad y Salud en Laboratorios. FREMAP.
- (102) Harris DC. Quantative Chemical Analysis. 7a ed. W. H. Freeman; 2008.
- (103) Kozak, M., & Verma, M. R. A general approach for assessing the adequacy of different sample sizes in a survey. En: Statistics in Transition New Series. 2006.
- (104) Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. Clin Vaccine Immunol [Internet]. 2002;9(6):1235–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/cdli.9.6.1235-1239.2002>
- (105) Stauffer MT. Introductory chapter: The many faces of calibration and validation in analytical methodology in the present day. En: Calibration and Validation of Analytical Methods -

A Sampling of Current Approaches. InTech; 2018.

(106) Yuan L, Gu H, Zeng J, Pillutla RC, Ji QC. Application of in-sample calibration curve methodology for regulated bioanalysis: Critical considerations in method development, validation and sample analysis. J Pharm Biomed Anal [Internet]. 2020;177(112844):112844. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112844>

(107) Rodríguez E. Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. Anuario Jurídico y Económico Escurialense; 2005.

(108) Albahrani AA, Rotarou V, Roche PJ, Greaves RF. Analyte stability during the total testing process: studies of vitamins A, D and E by LC-MS/MS. Clin Chem Lab Med [Internet]. 2016;54(10):1609–18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2015-1034>

(109) Skoog DA, West DM, Holler F, Crouch SR. Fundamentals of analytical chemistry. 8a ed. Andover, Inglaterra: Cengage Learning EMEA; 2003.

(110) Sabliov CM, Fronczek C, Astete CE, Khachatryan M, Khachatryan L, Leonardi C. Effects of temperature and UV light on degradation of α -tocopherol in free and dissolved form. J Am Oil Chem Soc [Internet]. 2009;86(9). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-009-1411-6>

(111) Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. Arch Biochem Biophys [Internet]. 1996;334(2):261–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1996.0454>