

Búsqueda de alimentos ricos en provitamina D (Ergosterol)

Tatiana Giráldez Sánchez, Eva Reyes Aguirre, Elena Berraquero Calero, Julia Kazakova, Rut Fernández Torres y Rocío Benítez García.

Resumen: En este trabajo se presentan los resultados obtenidos para el contenido en provitamina D2 (ergosterol) en diferentes muestras de origen vegetal. Muestras de lechuga, dátiles, uvas, arroz y champiñones fueron sometidas a un tratamiento de extracción con hexano y el contenido en ergosterol medido mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta de diodos en fila, obteniéndose los mayores contenidos en ergosterol en las muestras de champiñón y lechuga.

Palabras claves: Arroz, champiñón, dátiles, lechuga, Provitamina D2.

1. Introducción

La existencia de la vitamina D como una sustancia presente en los alimentos fue descubierta en 1922 por Elmer McCollum, pero no fue hasta 1930 cuando Adolf Windaus descubrió su estructura química y su relación con los esteroides. Recibió por ello el premio Nobel en 1928.

Al describir a la vitamina D o calciferol nos referimos a una familia de seco-esteroides que presenta actividad vitamínica similar, la cual presenta hasta veinticinco formas biológicas diferentes, de las cuales dos son las más importantes en nutrición: el ergocalciferol o vitamina D₂, de origen vegetal, y el colecalciferol o vitamina D₃, de origen animal. Ambos vitámeros, con idéntica actividad biológica, se diferencian en la cadena lateral fijada al C17: saturada para la D₃ e insaturada (C22 y C23) y metilada (C24) para la D₂, aunque sus 1,25-

dihidroxi-metabolitos tienen una potencia biológica equivalente.

Tanto el ergocalciferol (D₂) como el colecalciferol (D₃) derivan de sus respectivas provitaminas: ergosterol vegetal (provitamina D₂) y del 7-dehidrocolesterol de la piel (provitamina D₃). Dichas provitaminas se activan por los rayos ultravioletas convirtiéndose en previtaminas y, sucesivamente, a través de una isomerización térmica, en vitaminas.

La provitamina D₂ está muy presente en muchos alimentos tanto de origen animal como vegetal, como por ejemplo en el pescado, los huevos o las setas, pero durante el proceso de síntesis y por acción de luz ultravioleta en algunos de ellos, cuya ingesta es especialmente recomendada, como ocurre con el champiñón, se generan sustancias tóxicas tales como taquisterol (Tachy) y lumisterol (Lumi). Estas sustancias tóxicas presentes en el champiñón son perjudiciales en cantidades y es por eso que se debe moderar su ingesta.

En este trabajo se planteó como objetivo encontrar alimentos de origen vegetal ricos en ergosterol, para ello se seleccionaron diversas muestras de alimentos como lechuga, dátiles, arroz, uva y champiñón. Estas se sometieron a un tratamiento de extracción con hexano, así la provitamina D2 fue aislada de cada muestra y posteriormente medida en un cromatógrafo líquido de alta resolución con detección de ultravioleta-visible mediante diodos en fila. La cromatografía líquida es una técnica instrumental muy empleada en laboratorios de análisis químico que consiste fundamentalmente en hacer pasar los compuestos a analizar a través de una columna de separación rellena de un sólido particulado (fase estacionaria) empleando una mezcla de disolventes en proporciones variables a lo largo del tiempo de medida (fase móvil) lo que recibe el nombre de gradiente de elución. Transcurrido el tiempo de análisis que puede durar desde unos pocos minutos hasta horas, los compuestos salen de la columna a tiempos distintos y son dirigidos hacia un sistema de detección que medirá una propiedad física de estos que en nuestro caso es su capacidad de absorber luz a una longitud de onda característica, proporcionándonos el instrumento un gráfico que recibe el nombre de cromatograma en el que se muestran Absorbancias (luz absorbida) frente a tiempo de análisis, obteniéndose picos en aquellos tiempos en los que los compuestos alcanzan el detector y absorben luz. Cuanta más concentración de compuesto analizado haya en la muestra, mayor será la señal que proporciona el detector, lo cual nos permite por comparación con referencias de concentración conocidas preparadas por nosotros en el laboratorio saber con exactitud qué

cantidad de compuesto había en la muestra: Este procedimiento recibe el nombre de calibración.

2. Desarrollo experimental

2.1. Materiales

Dátil, lechuga, champiñón, uva y arroz.

Espátulas, microviales de inyección, balanza analítica de precisión, vaso de precipitado de 50 mL, viales de vidrio de 10 mL, papel de plata, matraz de 10 mL, probetas, molinillo de café, micropipetas de 10-100 μ L y 100-1000 μ L, frasco lavador, microfiltros de jeringa de 0.45 μ m, tubo Falcon de 15 mL, parafilm, ácido fórmico, metanol, hexano, patrones de Vitamina D3, Vitamina D2 y Provitamina D2 (Ergosterol).

Ultracongelador, liofilizador, centrifugadora, baño de ultrasonidos, sistema de extracción en fase sólida (Vacuum Manifold), Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) acoplado a un sistema de detección ultravioleta-visible de diodos en fila, y columna de separación cromatográfica (Synergi 2,5 μ m Hydro-RP 100 Å 100 \times 3.00 mm).

2.2. Procedimiento experimental

2.2.1 Preparación previa de las muestras

Las muestras adquiridas en fruterías locales fueron limpiadas y cortadas en trozos. Posteriormente, fueron congeladas en ultracongelador a -80 °C. previamente a su liofilización hasta extraer totalmente el agua, y finalmente se trituran en el molinillo para obtener un polvo fino.

2.2.2 Procedimiento de extracción

Se pesaron en la balanza analítica de precisión 0.5 g de cada muestra en tubos Falcon a los que se le añaden 6 mL de hexano y 1 mL de una disolución de Vitamina D3 de 1mg/L (patrón interno). Se procede a agitación manual durante 5 minutos y posteriormente se centrifuga a 3200x g durante 15 minutos. El resultado será un líquido (sobrenadante) y un sólido en el fondo del tubo Falcon. El sobrenadante se traspasó a un vial de vidrio de 30ml, se tapó con papel de aluminio para evitar la degradación de los compuestos y se añadieron otros 6 mL de hexano al sólido repitiendo el proceso explicado anteriormente. El sobrenadante se recogió de nuevo y se unió con el vial de la primera extracción. Finalmente, se procedió a la evaporación del hexano bajo corriente de nitrógeno hasta casi sequedad. Las muestras evaporadas se reconstituyeron con 1 mL de metanol y se trataron 15 minutos en ultrasonidos para homogeneizar las mismas. Posteriormente, se microfiltraron las muestras con un microfiltro de jeringa de 0.45µm previamente a su medida en el sistema cromatográfico.

2.2.3 Determinación en el sistema cromatográfico

Para el análisis de las muestras en el sistema cromatográfico se procedió a preparar una recta de calibrado que nos permitiera mediante comparación de referencias de concentración (patrones de calibrado) preparadas de los compuestos a analizar establecer la concentración de ergosterol. Para ello, se prepararon disoluciones stock de ergosterol,

vitamina D2 y vitamina D3 de 100 mg/L. A partir de estas disoluciones stock se prepararon disoluciones diluidas (patrones de calibrado) en metanol de concentraciones 0,5; 1; 2,5; 5 y 10 mg/L en ergosterol y 1 mg/L en vitamina D3 para poder llevar a cabo una calibración mediante el método del patrón interno.

2.3. Condiciones instrumentales de medida

La separación de los distintos componentes a analizar (ergosterol, vitamina D2 y vitamina D3, siendo esta último nuestro patrón interno de referencia para poder cuantificar), se llevó a cabo aplicando un gradiente de separación cromatográfica, con el que conseguimos separar los distintos componentes de la muestra a analizar. Dicho gradiente consistió en modificar la composición de la fase eluyente (fase móvil) a través de la columna de separación cromatográfica a un flujo constante de 0,5 mL/min y de acuerdo a las composiciones en cada tiempo de medida que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de separación cromatográfica

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

Bajo estas condiciones y seleccionando en el detector de ultra-violeta las longitudes de onda características de cada compuesto, estos

atravesan el sistema cromatográfico en un tiempo característico denominado tiempo de retención. En la tabla 2 se muestran los tiempos de retención, así como las longitudes de onda características de cada uno de los compuestos analizados mediante la técnica de medida:

Tabla 2. Condiciones de medida instrumental

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

Así pues, se obtuvieron los correspondientes cromatogramas para cada compuesto a cada concentración de la recta de calibrado y para las muestras analizadas. En la figura 1 se muestra un cromatograma tipo para una muestra de lechuga.

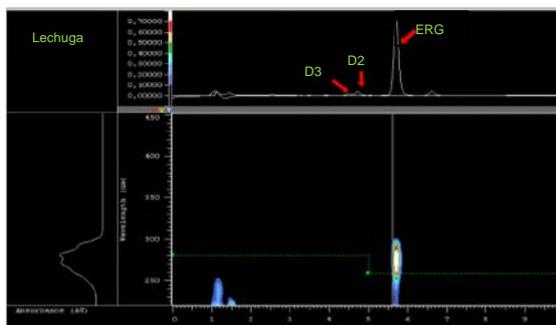


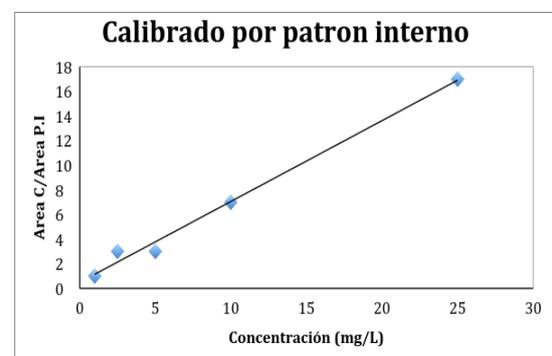
Figura 1. Cromatograma muestra Lechuga.

3. Resultados y Discusión

Una vez registrados los cromatogramas, se procedió a obtener las señales de las áreas que genera cada pico cromatográfico que corresponde con los tiempos de retención de nuestros compuestos a su longitud de onda

característica.

Para poder cuantificar la cantidad de ergosterol obtenida en las muestras analizadas, se procedió a realizar un procedimiento de calibración mediante patrón interno, este consiste en usar un compuesto de similares características estructurales a aquel a analizar en concentración siempre constante en todas las disoluciones medidas. En nuestro caso se empleó vitamina D3 de 1 mg/L ya que esta es de origen animal y no estará presente en nuestras muestras. Así, cualquier variación del área de este compuesto nos permite corregir las áreas del resto de compuestos cuando se producen fluctuaciones no deseadas debidas a errores aleatorios en el procedimiento de tratamiento de muestra o de medida. Con este procedimiento se representan en el gráfico de calibración las (áreas compuesto/área patrón interno) vs concentración compuesto en mg/L, obteniéndose una línea recta cuya ecuación matemática podemos obtener mediante el ajuste lineal por el método de mínimos cuadrados tal y como se muestra en la figura siguiente:



La ecuación obtenida para ergosterol fue:

$$A_{\text{Ergosterol}} / A_{\text{Patron Interno}} = 0,6568 C (\text{mg/L}) + 0,4857$$

Una vez obtenida la recta de regresión lineal del calibrado, se procedió a calcular la concentración del ergosterol para cada muestra medida despejando el valor C en la expresión anterior.

Los resultados obtenidos para las muestras analizadas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados obtenidos de muestras analizadas.

A	B	C	D
<0,28	14	<2	Arroz
<1,62	82	<2	Uva
<1,46	73	<2	Dátil
1191,0 ± 10	94	1890,5 ± 16	Lechuga
3563,5 ± 201	63	3790,9 ± 213	Champiñón

A: contenido ergosterol (mg/g); B: % humedad; C: contenido medio en ergosterol(mg/g) extracto seco y D: muestra.

Para el cálculo del contenido en ergosterol en muestra se tuvo en cuenta el porcentaje de humedad de cada alimento tal y como se muestra en la columna C.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran en la muestra de champiñón una concentración de 3563,5 ± 201 mg de ergosterol por gramo de champiñón comercial, mientras que en la lechuga se observa una concentración de 1191,0 ± 10 mg de

ergosterol por gramo de lechuga consumido. El resto de productos vegetales analizados no mostraron contenidos elevados de ergosterol a pesar de la creencia popular extendida sobre su contenido.

De este estudio podemos concluir que, además de alimentos ricos en vitamina D de origen animal cuyo consumo no puede ser excesivo por la alta cantidad de lípidos que contienen, existen alimentos de origen vegetal como el champiñón cuyo consumo debe ser moderado ya que contienen numerosas toxinas, o lo que es más importante, la lechuga, que aportan alto contenido en ergosterol, lo que permite a los consumidores tener una fuente natural rica en vitamina D y de fácil asimilación por el organismo.

Este trabajo abre la posibilidad de considerar estas matrices vegetales para la elaboración de suplementos alimenticios ricos en vitamina D.

5. Agradecimientos

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

A la Facultad de Química por permitirnos utilizar los laboratorios y todo el material e instrumentos que hemos necesitado.

6. Bibliografía

- [1] Michael F. Holick, " Vitamin D: A millenium perspective", vol.88, issue 2, pag. 296-307, 1 February 2003,

doi: 10.1002/jcb.10338

[2] Quesada Gomez JM, Sosa Henríquez M.,
“Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D”,
Rev. Osteoporos Metab Miner 2011 3; 4:165-182.

[3] Web de Ecoagricultor.
<http://www.ecoagricultor.com/la-vitamina-d-funcion-fuentes-y-cantidades-recomendadas/> (enlace web)

[4] Web de Te Interesa.
http://www.teinteresa.es/Microsites/Pregunta_al_medico/Alimentacion/vicentelahera/importante-vitamina-tomamos_0_915508566.html



Julia Kazakova, estudiante de Doctorado de la Universidad de Sevilla, realizando la tesis doctoral en el Departamento de Química Analítica.



Eva Reyes Aguirre, estudiante de 1º Bachillerato de Ciencias en IES Galileo Galilei (Montequinto, Sevilla).



Rut Fernández Torres, Profesora Titular Universidad de Sevilla del Departamento de Química Analítica.



Elena Berraquero Calero, estudiante de 1º Bachillerato del IES Juan Ciudad Duarte, Bormujos, (Sevilla).



Mª Rocío Benítez García, profesora de Física y Química en el IES Galileo Galilei (Montequinto, Sevilla).



Tatiana Giráldez Sánchez, estudiante de 1º de bachillerato en el IES Ítaca Tomares (Sevilla).