

**Análisis de estabilidad de vitaminas A, B12 y C,
en premezclas con diferentes fuentes de los
minerales Fe, Zn y Cu, en la planta de Nutreo**

Antonella Mishelle Andrade Estrella

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Análisis de estabilidad de vitaminas A, B12 y C, en premezclas con diferentes fuentes de los minerales Fe, Zn y Cu, en la planta de Nutreo

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Antonella Mishelle Andrade Estrella

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Análisis de estabilidad de vitaminas A, B12 y C, en premezclas con diferentes fuentes de los minerales Fe, Zn y Cu, en la planta de Nutreo

Antonella Mishelle Andrade Estrella

Resumen. Existe en la industria la necesidad de agregar valor nutricional a materias primas para obtener alimentos que ayuden en el desarrollo de productos funcionales. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis de la estabilidad de vitaminas A, B12 y C en premezclas con diferentes fuentes de minerales tales como Hierro (Fe), Zinc (Zn) y Cobre (Cu), en la planta de Nutreo-Colombia, a partir de la preparación de premezclas simples cuyas composiciones estuvieron integradas por vitamina, mineral y un compuesto vehicular. Se evaluó la pérdida de vitaminas en el tiempo (%) mediante separación con LSD (diferencias mínimas significativas), y la cuantificación de las vitaminas fue realizada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Las unidades experimentales evaluadas fueron 45 premezclas simples en total, conformadas por 15 tratamientos y cada uno con tres repeticiones. Las premezclas simples fueron codificadas para facilitar el manejo de información de los resultados. Se tomó la pérdida de vitamina en el tiempo (%) como la variable dependiente bajo estudio por cada tratamiento. Se demostró que las vitaminas al estar en presencia de un mineral disminuyen su concentración. La cianocobalamina al 2% mezclada con sulfato ferroso anhídrido y maltodextrina presentó una pérdida de $16.84 \pm 2.31\%$. La vitamina A palmitato a 250 UI/g mezclada con maltodextrina presentó una pérdida de $25.40 \pm 2.46\%$. El ácido ascórbico recubierto al 97% mezclado con fumarato ferroso chis y maltodextrina presentó una pérdida de $35.92 \pm 13.61\%$. Se encontró que las vitaminas en premezclas presentan pérdidas durante el almacenamiento.

Palabras clave: Cromatografía, fortificación, maltodextrina, nutricional, palmitato.

Abstract. In the industry, there is a need to add nutritional value to raw materials to obtain food products that can help in the development of functional foods. The objective of the study was to perform an analysis of the stability of vitamins A, B12 and C in premixes with different sources of minerals such as Iron (Fe), Zinc (Zn) and Copper (Cu) in the Nutreo-Colombia processing plant, from the preparation of simple premixes whose compositions were made up of vitamins, minerals and a carrier compound. The loss of vitamin over time (%) was evaluated by means separation using LSD (Least Significant Differences), and the quantification of vitamins was carried out by means of high efficiency liquid chromatography (HPLC). The experimental units were 45 simple premixes, made up of 15 treatments and each with three repetitions. The simple premixes were coded to facilitate the handling of information. Vitamin loss over time (%) was taken as the dependent variable under study for each treatment. Vitamins have been shown to decrease their concentration when they are in the presence of a mineral. Cyanocobalamin (2%) mixed with anhydrous ferrous sulfate and maltodextrin presented a loss of $16.84 \pm 2.31\%$. Vitamin A palmitate at 250 IU/g mixed with maltodextrin presented a loss of $25.40 \pm 2.46\%$. The 97% coated ascorbic acid mixed with ferrous fumarate chis and maltodextrin showed a loss of $35.92 \pm 13.61\%$. Vitamins in premixes were found to exhibit losses during storage.

Key words: Chromatography, fortification, maltodextrin, nutritional, palmitate.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Índice General	iv
Índice de Cuadros y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	17
5. RECOMENDACIONES.....	18
6. LITERATURA CITADA	19
7. ANEXOS	21

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de tratamientos.....	9
2. Resultados de las concentraciones de Cianocobalamina obtenidas por HPLC.....	10
3. Resultados de las concentraciones de vitamina A palmitato obtenidas por HPLC.....	11
4. Resultados de las concentraciones de Ácido ascórbico recubierto obtenidas por HPLC.	12
5. Resultados del porcentaje de pérdida de Cianocobalamina después de 17 días de almacenamiento.....	13
6. Resultados del porcentaje de pérdida de vitamina A palmitato después de 17 días de almacenamiento.....	14
7. Resultados del porcentaje de pérdida de Ácido ascórbico recubierto después de 17 días de almacenamiento.....	16

Anexos	Página
1. HPLC modular utilizado.....	21
2. Muestras de tratamiento B1.....	21
3. Muestras de tratamiento B2.....	22
4. Muestras de tratamiento B3.....	22
5. Muestras de los tratamientos A1, BA, y A.....	23
6. Muestras de tratamiento BC.....	23
7. Muestras de tratamiento C3.....	24
8. Muestras de tratamiento C4.....	24
9. Muestras de tratamiento C5.....	25
10. Muestras de tratamiento C6.....	25
11. Muestras de tratamiento C7.....	26

1. INTRODUCCIÓN

Las premezclas de la compañía Nutreo son diseñadas a la medida de las necesidades de sus clientes. Nutreo brinda beneficios tangibles para las compañías de sus clientes, tales como: soporte técnico especializado, procesos que aseguran la homogeneidad de sus componentes, entre otros beneficios. (Comunicaciones 2015). Nutreo crea premezclas para la elaboración de otros productos funcionales. Así mismo, trabaja en el desarrollo de productos de otras empresas de Colombia tales como: Postobon, Vidalia, Comfenalco, entre otras; muchos de estos productos son bebidas en polvo. Sin embargo, también realizan la producción de barras para otras empresas como: "Go Rigo Go!", "Taeq", entre otros.

En la actualidad, las personas se preocupan más por su salud, por esta razón al momento de adquirir un producto alimenticio buscan algún tipo de beneficio para su salud. Consecuentemente, las industrias dedicadas a la producción de alimentos buscan dar un valor agregado a sus productos enfocados al beneficio de la salud de sus consumidores. Por lo tanto, en su producción agregan micronutrientes como: vitaminas y minerales, y macronutrientes como: agua, carbohidratos, grasas y proteínas (Menza y Probart 2013). Las premezclas son mezclas uniformes de uno o más micronutrientes con un diluyente y/o un vehículo, que no está destinado a aportar una función en la alimentación, únicamente en la mezcla; son utilizadas para facilitar la dispersión uniforme de micronutrientes en una mezcla mayor (Nations 2003).

Los micronutrientes son importantes debido a que participan en la actividad normal del cuerpo, facilitan muchas reacciones metabólicas que ocurren en el cuerpo, sin embargo, no proporcionan energía al cuerpo, y dentro del organismo se las requiere en pequeñas cantidades (Carlesi 2015). Los minerales se pueden encontrar en algunos alimentos y son relativamente resistentes a diferentes tratamientos tecnológicos y/o culinarios, asimismo, debido a su estructura no son afectados por la luz y el calor (FEN 2015). Por otro lado, la pérdida de actividad de las vitaminas en premezclas puede ocurrir durante el almacenamiento o en la mezcla, debido a que muchas vitaminas son compuestos inestables que pueden degradarse bajo condiciones normales (Shurson *et al.* 2011). Las vitaminas son compuestos sensibles a muchos factores fisicoquímicos, entre ellos: oxígeno, luz, humedad, calor, minerales, metales iónicos, grasas insaturadas, agentes oxidantes, ambientes ácidos y alcalinos entre otros (Rosales 2017).

En la planta de Nutreo se manejan las siguientes vitaminas: A, B12, B1, B2, B6, C, B3, B5, B9, H, D, K1 y E, también los siguientes minerales: Zinc, Magnesio, Yodo, Potasio, Selenio, Fósforo, Cloro, Cromo, Manganeso, Cobre, Molibdeno, Hierro, Calcio, Sodio, Inositol y Flúor. En esta planta se cuenta con diversas fuentes de cada uno de los micronutrientes, las cuales varían en su concentración y composición química estructural. Según investigaciones realizadas por Rosado *et al.* (1999), diversos tipos de vitaminas y minerales son adicionados cuando se formulan premezclas, con la finalidad de enriquecer la estructura alimenticia de las mismas a utilizar en el procesamiento industrial de alimentos y/o bebidas. La adición de vitaminas y minerales en premezclas restaura los nutrimentos que podrían perderse durante el proceso de manufactura de los alimentos; además, la adición de estos también se debe a la necesidad de aumentar una posible proporción deficiente de nutrientes en la composición del alimento.

Es importante resaltar que la adición de vitaminas y minerales en formulaciones de premezclas se realiza considerando los niveles de absorción de los diferentes nutrientes presentes, la interacción entre vitaminas y minerales, de manera que se elimine cualquier riesgo de algún efecto adverso en la salud, aún en los niveles de ingestión de los alimentos. En base a lo descrito anteriormente, la adición de vitaminas y minerales en premezclas constituye una medida relativamente sencilla y barata, que contribuye a mejorar el estado de nutrición de los consumidores de alimentos, en base al conjunto de interacciones que toman lugar entre las vitaminas y los minerales cuando ambos son incluidos en una mezcla. Por otro lado, es importante mencionar que la adición de vitaminas y minerales en premezclas parece ofrecer las mejores características de estabilidad, biodisponibilidad y composición nutricional en los alimentos a manufacturar.

Debido a esto, varios países ya han invertido en desarrollar tecnologías para la adición de vitaminas y minerales en premezclas, y así aprovechar los beneficios de sus interacciones en la mayor medida posible; incluso, ya existen legislaciones nacionales que rigen estos procesos. Según lo establecido por el decreto número 3863 del 2 de octubre de 2008 bajo el Ministerio de la Protección Social de Colombia se tiene lo siguiente: Las áreas destinadas a la fabricación de alimentos que vayan a ser compartidas para la elaboración de suplementos dietarios deberán obtener en forma previa a la certificación de Buenas Prácticas de Manufactura – BPM para suplementos dietarios, las autorizaciones respectivas de acuerdo con la reglamentación vigente para alimentos. (Ministerio de la Protección Social 2008).

Del mismo modo, según Ramírez y Rodríguez (2011), la adición de vitaminas y minerales en premezclas responde a un proceso de fortificación o enriquecimiento de alimentos, el cual se define como la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento, tanto si está como si no está contenido normalmente en el alimento, con el fin de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o en grupos específicos de la población. Asimismo, los tipos y cantidades de vitaminas y minerales que han de añadirse a las premezclas y los alimentos enriquecidos dependerán de los problemas nutricionales concretos que haya que corregirse, de las características de las poblaciones a las que se destinan y de los modelos de consumo de alimentos de la zona.

Dado que las vitaminas son compuestos inestables, se han presentado casos de inconformidad con la cantidad de vitamina en la premezcla final para entrega. Las premezclas formuladas son complejas, sin embargo, existen vitaminas que se usan con mayor frecuencia, en diferentes premezclas al igual que minerales. Es por ello por lo que en este el estudio se establecieron los siguientes objetivos:

- Formular premezclas simples de vitaminas (A, B12, C) y minerales (hierro, zinc y cobre) para su análisis de acuerdo con las necesidades de Nutreo.
- Realizar análisis químicos a las premezclas simples que permitan conocer la concentración de vitaminas A, B12 y C.
- Determinar el porcentaje de pérdida en el tiempo de las vitaminas A, B12 y C.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El pesado, mezclado de muestras, análisis químicos y almacenamiento se realizó en el laboratorio de investigación y desarrollo de Premex ubicado en la Universidad EAFIT, en Medellín, Departamento de Antioquia, Carrera 49, número 7 sur 50, Colombia.

Compuestos

Las vitaminas que se utilizaron fueron B12, cianocobalamina, a una concentración de 2%, vitamina A de la fuente palmitato a una concentración de 250 UI, y vitamina C, ácido ascórbico recubierto a una concentración de 97%. Los minerales que se utilizaron fueron Zinc de la fuente de Sulfato de Zinc, Cobre de la fuente Sulfato de cobre y Hierro de las fuentes de Sulfato ferroso anhídrido, Hierro aminoquelado al 14.4%, Fumarato ferroso, Fumarato ferroso chis (Chis tipo de fumarato ferroso manejado en la planta de Nutreo) y Pirofosfato férrico. Las vitaminas y minerales son adquiridas mediante compra directa al proveedor externo, Merquimia Colombia, S.A.

El vehículo que se utilizó para todas las premezclas fue la maltodextrina, la cual es un aditivo alimenticio que consiste en una mezcla de sacáridos con una amplia distribución del peso molecular entre polisacáridos y oligosacáridos. Por otro lado, según Rosado *et al.* (1999), la maltodextrina es producto de la hidrólisis parcial del almidón con valores de dextrosa equivalente (DE) menor que 20, y puede ser obtenida de almidones de diferentes fuentes botánicas. Cabe destacar que la dextrosa equivalente (DE) es una medida que caracteriza la extensión de la hidrólisis del almidón y también indica un promedio del peso molecular. Para el desarrollo de la presente investigación, las vitaminas, minerales y vehículo fueron pesados y tomados de la planta de Nutreo ubicada en Rionegro, Departamento de Antioquia, Parque empresarial multicentro, bodega 9, Colombia.

Formulación de premezclas

Se utilizó una plantilla en "Microsoft Excel" para registrar la formulación de premezclas utilizadas por Nutreo, en la cual se determinó la proporción de vitamina, mineral y maltodextrina para un peso final de 20 g en base a 20% de VDR (Valor Diario Recomendado) de vitamina y mineral en cada premezcla. Se cumplieron los aspectos legales y reglamentarios como los establecidos en la resolución 3803 de 2016 del Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia, en la cual se establecen las recomendaciones de ingesta de energía y nutrientes (RIEN) para la población colombiana y se dictan otras disposiciones.

Asimismo, cumpliendo con lo establecido en la resolución 3096 del mismo tipo, en la cual se establece el reglamento técnico sobre las condiciones y requisitos que deben cumplir los suplementos diarios que declaren o no información nutricional, propiedades nutricionales, propiedades de salud o cuando su descripción produzca el mismo efecto de las declaraciones de propiedades nutricionales o de las declaraciones de propiedades en salud (Ministerio de la Protección Social 2007). Del mismo modo, siguiendo los mismos parámetros fueron formulados

los blancos o tratamientos control para un peso total de 8 g, siendo este peso menor al peso final de 20 g en base a 20% de VDR (Valor Diario Recomendado) de vitamina y mineral en cada premezcla. Los blancos o controles consistieron en una mezcla de vitamina y vehículo, donde el vehículo suplía la cantidad de mineral que debía tener la muestra. Luego, los blancos se analizaron para determinar si el vehículo influye en la estabilidad de las vitaminas. Del mismo modo, los blancos también fueron analizados para determinar el efecto que tienen los minerales en la estabilidad de las vitaminas, ya que estos tienden a interactuar cuando se mezclan en pro del enriquecimiento de alimentos.

Preparación de muestras

Las muestras fueron preparadas cumpliendo con lo establecido en el protocolo de secuencia de mezclas en la planta de Nutreo, en función de las siguientes composiciones porcentuales y secuencia de mezclas: 50% vehículo, 50% mineral, 100% vitamina, 50% mineral, 50% vehículo. Es importante resaltar que este protocolo de secuencia de mezcla cumple con procedimientos de la planta Nutreo para la preparación de premezclas, y la secuencia de mezcla mencionada presenta el beneficio de que permite una integración más equilibrada y uniforme de todos los componentes, y también considerando que el proceso de mezclado se realiza en equipos de tamaños industriales. Posteriormente, los compuestos fueron agregados en la secuencia mencionada dentro de una bolsa Doy Pack laminada con cierre. Una vez que los compuestos se encontraron en el interior de la bolsa, esta se cerró dejando un espacio libre para proceder a mezclar. La mezcla fue realizada de forma manual durante cinco minutos, después se dejó reposar la bolsa durante un minuto, luego se abrió para eliminar el aire acumulado durante la agitación, y por último se cerró la bolsa.

Equipos

Las vitaminas, los minerales y el vehículo se pesaron con una balanza analítica (marca “Shimadzu”, AUY 220. 220 g x 0.1 mg) en las instalaciones del laboratorio de Premex, la cual cumple con un programa diario de calibración. El pesaje se realizó bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura ambiente de 27 °C, y se consideró una presión ambiente ideal de 1 atm. Para realizar el análisis químico se utilizó un cromatógrafo líquido (marca “Shimadzu Prominence con DAD”, modelo LC10A). El análisis de vitaminas se realizó bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura ambiente de 27 °C, y se consideró una presión ambiente ideal de 1 atm.

Además de los equipos mencionados, también se utilizaron otros junto con una serie de insumos, los cuales permitieron realizar satisfactoriamente los métodos de ensayo para la determinación de las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, que en este caso de estudio las vitaminas en cuestión son A, B12 y C. El conjunto de estos equipos e insumos se muestra a continuación:

- Columna Agilent Zorbax C18 15 cm × 4.6 mm, 5 µm
- Ultrasonido LC30 H
- Baño con agitación
- Cronómetro Casio
- Tubos falcón de 15 mL
- Centrifuga Eppendorff

- Agitador vortex Scilogex MX-S
- Pipetas volumétricas (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL)
- Balones volumétricos (10 mL, 50 mL y 100 mL)
- Filtro Jeringa de 0.2 µm Whatman
- Jeringas de 5 mL
- Beaker de 250 mL y 1000 mL

Asimismo, para llevar a cabo los métodos de ensayo que permiten determinar las vitaminas liposolubles e hidrosolubles bajo estudio se requiere de un conjunto de reactivos y materiales de referencia, los cuales se enlistan a continuación:

- Agua tipo I
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo
- Ácido acético glacial
- Hidróxido de Potasio
- Ácido ascórbico
- Fenolftaleína
- Cloruro de sodio
- Etanol absoluto
- Hexano grado reactivo
- Ácido tricloroacético (TCA)
- Tris[2-carboxietil] fosfina (TCEP)
- Acetonitrilo
- Decilamina
- Ácido fosfórico
- Acetato de sodio trihidratado

Análisis químicos

Concentración inicial y final de las vitaminas. Se utilizaron diferentes metodologías de acuerdo con la naturaleza de la vitamina, si esta era hidrosoluble o liposoluble, los cuales se describen a continuación:

Método para determinación de Vitaminas liposolubles. Método interno Cuantificación de vitamina A (Retinil acetate) y vitamina E (alfa tocoferol acetato) en materia prima, producto vehiculizado y premezcla por HPLC.

Métodos para determinación de Vitaminas hidrosolubles. AOAC Official Method 2014.02 Vitamin B12 (Cyanocobalamin) in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula. AOAC Official Method 2012.22 Vitamin C in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula.

A continuación, se explican las metodologías empleadas por cada uno de los métodos mencionados anteriormente en relación con los métodos de ensayo para determinar las vitaminas

liposolubles e hidrosolubles en muestras de análisis. En el presente estudio, las vitaminas A, B12 y C en premezclas que contienen vitaminas, minerales y compuesto vehicular.

Método interno para cuantificación de vitamina A (Retinil acetate) y vitamina E (alfa tocoferol acetato) en materia prima, producto vehiculizado y premezcla por HPLC. En relación con equipos utilizados, se utilizó un equipo de cromatografía líquida marca Shimadzu con DAD, modelo LC10A, con inyector automático, bomba con sistema de degasificación, con integrador o sistema de registro, software para el procesamiento de datos cromatográficos, detector de arreglo de diodos (DAD, longitud de onda variable). La columna cromatográfica fue de acero inoxidable LC-18 para fase reversa, de 25 cm × 4.6 mm de diámetro interno, 5 µm de diámetro de partícula, y guarda columna con cartucho C18, Supelco. Las condiciones típicas de operación fueron: sistema isocrático, flujo 1.2 mL/min, volumen de inyección de 20 µL, detección UV a 242 nm, temperatura de ambiente en el horno, y tiempo de corrida de 15 minutos. La fase móvil fue metanol grado HPLC, al 100%.

En cuanto a los reactivos empleados para el análisis, se utilizó Metanol grado HPLC (Merck), estándar "all-trans Retinol": Vitamina A (Sigma-Aldrich), Hexano p.a. (Merck), Etanol absoluto p.a. (Merck), solución de hidróxido de potasio al 50%, butilhidroxitolueno (BHT) o Ácido Ascórbico como antioxidantes, y agua tridestilada o grado HPLC. Para la preparación de la solución del estándar de vitamina A, se disolvieron 100 mg del estándar en 100 mL de etanol absoluto, con aproximadamente 2 mg de BHT, y se guardó la solución en refrigeración (8 °C) hasta su posterior análisis. Se verificó la pureza del estándar mediante la medición de su espectro de absorción (la vitamina A y los correspondientes ésteres muestran un espectro de absorción característico, donde la posición del pico máximo depende del solvente): en etanol, el retinol a 325 nm, tiene un coeficiente de extinción ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) de 1843).

En relación con el procedimiento del análisis, se pesaron 50 mg de la muestra de materia prima, producto vehiculizado y premezcla en un tubo Falcon, y se adicionó 5 mL de etanol absoluto. Se colocaron los tubos de reflujo y se agitó la mezcla hasta su ebullición con corriente de nitrógeno. Luego, se adicionó 1 mL de solución de KOH al 50% y se saponificó la mezcla por 30 minutos con agitación moderada. Antes de finalizar esta etapa, se enjuagó el contenido con 50 mL de agua en tres porciones. La solución se enfrió a temperatura ambiente y luego se filtró utilizando una bomba de vacío. Se colocó inmediatamente el contenido en un embudo de separación de 50 mL y se adicionó 5 mL de hexano p.a. para proceder a la extracción. Se agitó la mezcla por 20 segundos y al separarse las fases se colocó la capa superior (fase orgánica) en un balón de 25 mL de base redonda que contenía aproximadamente 0.5 g de ácido ascórbico. Se efectuó dos veces más la extracción y se juntaron los extractos en el balón de 100 mL. Se evaporó a sequedad el solvente, haciendo uso de un evaporador rotativo con baño de agua a 40 °C, se diluyó inmediatamente con metanol grado HPLC el residuo, y se llevó a volumen en un matraz volumétrico de 10 mL. Finalmente, se pasó la solución final por un filtro de 0.2 µm, llenándolos en viales ámbar de 1 mL para colocarlos en el inyector del cromatógrafo.

AOAC Official Method 2014.02, Vitamin B12 (Cyanocobalamin) in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula (Giménez y Martín 2018). En relación con los equipos e insumos utilizados, se tienen los mismos que se emplearon para el desarrollo del método de ensayo anterior. En cuanto a los reactivos y materiales de referencia empleados para el análisis

químico y procedimiento del análisis se tienen los siguientes: Metanol, acetonitrilo, ácido acético, agua destilada, cianuro de potasio, y acetato de sodio anhidro.

AOAC Official Method 2012.22, Vitamin C in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula (Campos-Giménez et al. 2013). En relación con los equipos e insumos utilizados, se tienen los mismos que se emplearon para el desarrollo del método de análisis anterior. En cuanto a los reactivos y materiales de referencia empleados para el análisis químico y procedimiento del análisis se tienen los siguientes: Metanol, acetonitrilo, ácido acético, agua destilada, cianuro de potasio, y acetato de sodio anhidro.

Concentración teórica

Fue establecida una concentración teórica dentro de las premezclas simples con base a la concentración teórica las vitaminas. Para la concentración teórica de cianocobalamina al 2%, y ácido ascórbico recubierto al 97% se utilizó la Ecuación 1 y para la concentración teórica de vitamina A palmitato 250 UI se utilizó la Ecuación 2.

$$\text{Concentración teórica} = (\text{PV}) \times (\text{CTV}) \div (\text{PTM}) \times 100 \quad [1]$$

Donde:

PV = Peso de la vitamina en la muestra.

CTV = Concentración teórica de la vitamina (% descrito en la ficha técnica).

PTM = Peso total de la muestra.

$$\text{Concentración teórica} = (\% \text{VM}) \times (10000) \times (\text{CTV}) \times (0.3) \div 100 \quad [2]$$

Donde:

% VM = Porcentaje de la vitamina en la muestra.

CTV = Concentración teórica de la vitamina ($\mu\text{g/g}$)

Pérdida de vitaminas en el tiempo

Se determinó la estabilidad de las vitaminas A, B12 y C durante el tiempo de almacenamiento (17 días); para ello se evaluaron los resultados obtenidos de los análisis químicos por cromatografía líquida. Para determinar la pérdida en el tiempo se utilizó la Ecuación 3.

$$\text{Pérdida en el tiempo} = (\text{CI} - \text{CF}) \div (\text{CI}) \times 100 \quad [3]$$

Donde:

CI = Concentración inicial.

CF = Concentración final.

Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar la pérdida de vitaminas en los tratamientos preparados de vitaminas, minerales y vehículo, estando cada vitamina en diferentes combinaciones con los minerales y vehículo, donde también se realizaron análisis de las

vitaminas individuales para establecer la concentración real inicial. Se realizaron tres repeticiones a fin de tener resultados significativos y los tratamientos se analizaron en dos tiempos (3 y 17 días). El análisis de los resultados se realizó en el programa SAS® mediante un ANDEVA a un nivel de significancia del 0.05, lo cual representa una prueba paramétrica para comparación de medias para datos independientes. Para el desarrollo de la investigación se tuvo un total de 45 unidades experimentales en las que se prepararon las premezclas simples para aplicarles posteriores tratamientos.

Es importante mencionar que durante el desarrollo de los métodos de ensayo aplicados a cada tratamiento de premezcla compuesta por vitaminas, minerales y vehículo se llevó a cabo un proceso de separación de medias con LSD (mínimas diferencias significativas) de varios tipos de vitaminas. En este proceso se tiene como objetivo determinar la pérdida de vitaminas en el tiempo. Por otro lado, es importante señalar que la nomenclatura utilizada para identificar a los tratamientos fue seleccionada directamente por el investigador, con la finalidad de lograr un mayor control de las premezclas simples que se formularon, y de esta manera tener una mayor organización durante el análisis en el laboratorio (Cuadro 1). La nomenclatura para identificar a los tratamientos enlistados en el Cuadro 1 fue seleccionada bajo criterios que permiten una identificación más sencilla y mucho más manejable para realizar los métodos de ensayo en el laboratorio.

Cuadro 1. Descripción de tratamientos.

Componentes de premezclas simples						
Tratamientos	Vitamina	Masa de Vitamina (g)	Fuente de mineral	Masa de Fuente de mineral (g)	Vehículo	Masa de Vehículo (g)
B1	Cianocobalamina 2%	0.120	Sulfato de Zinc	17.143	Maltodextrina	2.737
B2	Cianocobalamina 2%	0.800	Sulfato de Cobre	16.667	Maltodextrina	2.533
B3	Cianocobalamina 2%	0.086	Sulfato ferroso anhídrido	17.143	Maltodextrina	2.771
BB	Cianocobalamina 2%	0.320	N/A	0	Maltodextrina	7.680
B12	Cianocobalamina 2%	1.000	N/A	0	N/A	0
A1	Vitamina A Palmitato 250 UI	5.333	Sulfato de Zinc	11.429	Maltodextrina	3.238
BA	Vitamina A Palmitato 250 UI	2.131	N/A	0	Maltodextrina	5.869
A	Vitamina A Palmitato 250 UI	0.500	N/A	0	N/A	0
C3	Ácido ascórbico recubierto	8.532	Sulfato ferroso anhídrido	8.276	Maltodextrina	3.192
C4	Ácido ascórbico recubierto	5.623	Hierro aminoquelado 14.4%	11.364	Maltodextrina	3.013
C5	Ácido ascórbico recubierto	8.532	Fumarato ferroso	7.882	Maltodextrina	3.586
C6	Ácido ascórbico recubierto	6.687	Fumarato ferroso Chis	9.979	Maltodextrina	3.334
C7	Ácido ascórbico recubierto	7.498	Pirofosfato férrico	9.091	Maltodextrina	3.411
BC	Ácido ascórbico recubierto	3.413	N/A	0	Maltodextrina	4.587
CR	Ácido ascórbico recubierto	2.000	N/A	0	N/A	0

Tratamientos = Vitamina + Fuente de mineral + Vehículo.

N/A = No Aplica.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de las concentraciones de vitaminas A, B12 y C

En el proceso de toma de datos se calculó una concentración teórica, la cual se basaba en la ficha técnica de cada vitamina utilizada y la cantidad pesada en la premezcla. Para el análisis de concentración inicial y final se tomaron los resultados de los análisis químicos en el HPLC durante los dos tiempos, a los 3 y 17 días de ser preparadas las premezclas.

En el Cuadro 2 se detallan las concentraciones: teórica, inicial y final de la cianocobalamina al 2% y en premezcla con las fuentes de minerales y vehículos, según los tratamientos en el cuadro 1. Con los resultados de las medias de concentración teórica e inicial se puede inferir que la estabilidad de la cianocobalamina en los días de 0 a 3 no varió, ya que es muy similar a la ficha técnica de la vitamina y consistente con lo calculado en la formulación de premezclas. En la concentración final, la cianocobalamina presentó un comportamiento atípico, aumentando su concentración en el tiempo. Se infiere que es atípico, ya que, según Marchetti *et al.* (2002), la cianocobalamina disminuye su concentración en el tiempo al estar en una mezcla con sulfatos. Además, en el tratamiento B12, el cual contenía solamente cianocobalamina al 2%, se obtuvieron resultados atípicos con respecto a estudios anteriores realizados en el laboratorio investigación y desarrollo de Premex, dado que la concentración aumentaba a cantidades >100%, por ello en el informe del laboratorio que reportaba los resultados no se reportó la concentración final de este tratamiento.

Cuadro 2. Resultados de las concentraciones de Cianocobalamina obtenidas por HPLC.

Tratamiento	Concentración teórica (µg/g)		Concentración inicial (µg/g)		Concentración final (µg/g)
	Media ± D.E.		Media ± D.E.		Media ± D.E.
B1	120.38 ±	0.22	128.33 ±	2.23	166.34 ± 5.21
B2	800.39 ±	0.38	789.03 ±	18.83	948.34 ± 16.00
B3	86.17 ±	0.07	95.47 ±	0.83	79.39 ± 2.48
BB	800.33 ±	0.40	799.50 ±	2.92	998.25 ± 12.97
B12	20793.43 ±	732.16	20793.43 ±	732.16	*
C.V.					2.36

D.E. Desviación Estándar.

C.V. Coeficiente de Variación.

*No se obtuvieron resultados de la concentración final.

B1 = Sulfato de zinc + cianocobalamina + maltodextrina; B2 = Sulfato de cobre + cianocobalamina + maltodextrina; B3 = Sulfato ferroso anhídrido + cianocobalamina + maltodextrina; BB = cianocobalamina + maltodextrina; B12 = Cianocobalamina.

En el Cuadro 3 se detallan las concentraciones: teórica, inicial y final de la vitamina A palmitato. Con los resultados de las medias de concentración teórica e inicial se puede inferir que la estabilidad de la vitamina A palmitato se vio afectada al mezclarse con otros compuestos como en el tratamiento A1, el cual contenía zinc y maltodextrina, y en el tratamiento BA con

maltodextrina. Esto debido a que según Hemery *et al.* (2017), la vitamina A al estar en una premezcla con condiciones leves de almacenamiento y mezcla puede llegar a tener una pérdida de hasta 45% y en una mezcla en condiciones severas de almacenamiento y mezcla puede llegar a tener una pérdida del 85%. En el tratamiento A, el cual no contenía ningún otro compuesto, aumentó su concentración a pesar de ser un compuesto muy volátil, por lo que se establece una estabilidad en el tiempo de esta vitamina, así como según Carlotti *et al.* (2002), en un estudio de la vitamina A palmitato expuesta en radiaciones determinó que esta vitamina es estable con el tiempo.

Cuadro 3. Resultados de las concentraciones de vitamina A palmitato obtenidas por HPLC.

Tratamiento	Concentración teórica (UI/g)	Concentración inicial (UI/g)	Concentración final (UI/g)
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
A1	109.89 \pm 0.01	112.19 \pm 11.83	87.38 \pm 15.10
BA	109.76 \pm 0.64	127.25 \pm 19.76	94.62 \pm 11.64
A	250.00 \pm 0.00	369.53 \pm 1.03	385.11 \pm 2.38
C.V.			0.64

D.E. Desviación Estándar.

C.V. Coeficiente de Variación.

A1 = Sulfato de zinc + vitamina A palmitato + maltodextrina; BA = vitamina A palmitato + maltodextrina; A = vitamina A palmitato.

En el Cuadro 4 se detallan las concentraciones: teórica, inicial y final del ácido ascórbico recubierto al 97%. Con los resultados de las medias de concentración teórica e inicial se puede inferir que la estabilidad del ácido ascórbico en los días de 0 a 3 no varió, ya que es muy similar a la ficha técnica de la vitamina. En la concentración final, se obtuvieron los resultados esperados, esto según el estudio realizado por Klu *et al.* (2016), donde se encontró que el ácido ascórbico dependiendo de las condiciones de almacenamiento puede acelerar su degradación; a temperatura ambiente puede disminuir de 4.02 ± 0.14 % de su concentración inicial en un intervalo de 14 días. Según Marchetti *et al.* (2002), el ácido ascórbico podría aumentar su degradación en el tiempo dependiendo de la forma en que se presente los minerales con los que se mezcla, ya sean estos como sulfatos o aminoquelados. Según lo investigado por De Pablo y King (1987), una gran variedad de vitaminas presenta poca estabilidad en presencia de humedad y oxígeno, potencial de hidrógeno (pH), agentes oxidantes, temperatura y presencia de iones metálicos, especialmente cobre y hierro.

Cuadro 4. Resultados de las concentraciones de Ácido ascórbico recubierto obtenidas por HPLC.

Tratamiento	Concentración teórica (mg/g)	Concentración inicial (mg/g)	Concentración final (mg/g)
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
C3	413.87 ± 0.07	393.59 ± 15.04	284.23 ± 28.74
C4	273.53 ± 1.09	223.64 ± 52.06	202.11 ± 15.17
C5	413.90 ± 0.26	421.64 ± 16.03	281.20 ± 18.77
C6	324.44 ± 0.19	282.50 ± 22.90	179.09 ± 23.64
C7	363.26 ± 1.21	338.53 ± 9.88	267.95 ± 43.98
BC	414.26 ± 0.66	365.34 ± 42.79	309.30 ± 7.77
CR	970.00 ± 0.00	883.77 ± 8.13	800.23 ± 9.52
C.V.			0.52

D.E. Desviación Estándar.

C.V. Coeficiente de Variación.

C3 = Sulfato ferroso anhídrido + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C4 = Hierro aminoquelado al 14.4% + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C5 = Fumarato ferroso + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C6 = Fumarato ferroso chis + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C7 = Pirofosfato férrico + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; BC = ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; CR = ácido ascórbico recubierto.

Resultados de pérdida de vitaminas A, B12 y C en el tiempo

A continuación, se ilustran los resultados obtenidos del análisis de vitaminas utilizando separación de medias con LSD:

En el Cuadro 5 se pueden observar los resultados obtenidos para cianocobalamina al 2% (B12), los cuales representan la pérdida de vitaminas en el tiempo en porcentaje (%). En base a los resultados ilustrados, se puede observar que el tratamiento B3, el cual contiene cianocobalamina 2%, sulfato ferroso anhídrido y maltodextrina en su formulación, presentó una pérdida de cianocobalamina del 16.84%, en comparación con lo añadido inicialmente en la premezcla. Esta pérdida puede estar asociada con la temperatura de almacenamiento y la fuente de mineral en conjunto. Según lo reportado por Marchetti *et al.* (2002), la cianocobalamina en presencia de sulfatos a una temperatura de 37 °C disminuye su concentración hasta un 21.6% y a una temperatura de 20 °C hasta un 11.8%.

Los tratamientos B2 y B1, los cuales contienen en su composición sulfato de cobre y sulfato de zinc respectivamente, y el tratamiento BB que contiene maltodextrina y cianocobalamina 2%; no presentaron pérdida de concentración en el tiempo en comparación con lo añadido inicialmente en la premezcla. Por el contrario, estos tratamientos presentaron un incremento en su concentración, por lo tanto, con la ecuación utilizada para calcular la pérdida en el tiempo se obtuvieron porcentajes negativos. Este incremento en concentración se puede atribuir a varios factores, entre ellos una falla de la columna al momento de la lectura en el HPLC, y la más probable a una mezcla no homogénea, la cual pudo representar tomas de muestra para el análisis químico con diferentes concentraciones de cianocobalamina dentro de la misma premezcla. Esto

de acuerdo con De Pablo y King (1987), quienes, tras su investigación sobre las pérdidas de vitaminas durante el procesamiento de los alimentos, afirmaron que las vitaminas son los nutrientes más lábiles, ya que son dañadas en mayor o menor grado por una variedad de factores como el calor, luz, oxígeno, ácido, álcali, agentes reductores, agentes oxidantes, iones metálicos, entre otros. El tratamiento B12, el cual contenía únicamente cianocobalamina al 2%, no se presentó el porcentaje de pérdida en el tiempo debido a que del mismo no se obtuvieron resultados de la concentración final, tal como se presentó en el Cuadro 2.

Cuadro 5. Resultados del porcentaje de pérdida de Cianocobalamina después de 17 días de almacenamiento.

Tratamiento	Pérdida de vitaminas en el tiempo (%)
	Media \pm D.E.
B3	16.84 \pm 2.31 ^A
B2	-20.21 \pm 2.06 ^B
BB	-24.86 \pm 1.17 ^C
B1	-29.60 \pm 1.81 ^D
B12	*
C.V. (%)	0

D.E. Desviación Estándar.

*No se obtuvieron resultados de la concentración final.

(^{A-D}) Medias en la misma columna con letras diferentes representan diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

C.V. Coeficiente de variación

B1 = Sulfato de zinc + cianocobalamina + maltodextrina; B2 = Sulfato de cobre + cianocobalamina + maltodextrina; B3 = Sulfato ferroso anhídrido + cianocobalamina + maltodextrina; BB = cianocobalamina + maltodextrina; B12 = Cianocobalamina.

En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos para vitamina A palmitato o retinol. Cabe destacar que para este proceso se empleó vitamina A palmitato a 250 UI/g, según lo especificado en la ficha técnica. En base a los resultados ilustrados en el Cuadro 6, se pudo observar que el tratamiento BA, el cual contenía vitamina A palmitato y maltodextrina en su formulación, fue la que presentó una mayor pérdida de vitamina A en el tiempo, siendo esta del 25.40%, en comparación con lo añadido inicialmente en la premezcla. El tratamiento A1 compuesto por vitamina A palmitato, sulfato de zinc y maltodextrina presentó una pérdida de 21.64%, en comparación con lo añadido inicialmente en la premezcla. Los tratamientos BA y A1 no presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellos, lo cual indica que la adición de sulfato de zinc no tuvo un efecto significativo sobre la pérdida de vitamina A en el tiempo. Según Hemery *et al.* (2017), en un estudio con harina fortificada con zinc, hierro y vitamina A palmitato, la concentración de esta disminuyó, sin embargo, esta degradación puede variar de acuerdo con las condiciones de almacenamiento, incluyendo el empaque. Si el empaque es aluminizado la vitamina A palmitato puede perderse hasta un 25%, y cuando el empaque es una bolsa de papel puede llegar a perderse hasta un 89%.

El comportamiento de la vitamina A en estos tratamientos comprueba algunos de los resultados obtenidos por De Pablo y King (1987), los cuales afirman que la vitamina A por su estructura hidrocarbonada, generalmente se encuentra asociada a la fase lipídica de los alimentos, por lo que la pérdida por oxidación es función de temperatura, presencia de oxígeno y es catalizada por la luz y los metales al igual que en la oxidación de las grasas. El tratamiento A, el cual contenía únicamente vitamina A palmitato presentó un incremento de su concentración, por lo tanto, con la ecuación utilizada para calcular la pérdida en el tiempo se obtuvo un porcentaje negativo. Este incremento puede resultar de la metodología utilizada en la extracción para el análisis químico, ya que según Carlotti *et al.* (2002), la vitamina A palmitato al ser extraída utilizando BHT o un antioxidante esta se vuelve estable. Así mismo, podría ser un incremento al pesar la muestra, ya que, en su presentación comercial para uso en suplementos, fortificación, lácteos y bebidas, esta vitamina se presenta como un polvo fino de color amarillo claro, por lo que su pesaje exacto es complejo debido a que por ser un polvo fino se esparce en el ambiente rápidamente dificultando su peso de manera exacta.

Cuadro 6. Resultados del porcentaje de pérdida de vitamina A palmitato después de 17 días de almacenamiento.

Tratamiento	Pérdida de vitamina en el tiempo (%)
	Media \pm D.E.
BA	25.40 \pm 2.46 ^A
A1	21.64 \pm 14.67 ^A
A	-4.22 \pm 0.81 ^B
C.V. (%)	14.19

D.E. Desviación Estándar.

(^{A-B}) Medias en la misma columna con letras diferentes representan diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

C.V. Coeficiente de variación

A1 = Sulfato de zinc + vitamina A palmitato + maltodextrina; BB = vitamina A palmitato + maltodextrina; A = vitamina A palmitato.

En el Cuadro 7 se pueden observar los resultados obtenidos para la pérdida en el tiempo de ácido ascórbico recubierto al 97%. Con base en los resultados ilustrados en el Cuadro 7, se pudo observar que todos los tratamientos con ácido ascórbico recubierto al 97% presentaron una pérdida entre 5-35%, variando de acuerdo con la composición de cada tratamiento. Según Marchetti *et al.* (2002) el ácido ascórbico puede aumentar su degradación dependiendo la forma en que se encuentren los minerales con los que se los mezclan. El tratamiento C6, el cual estaba compuesto por ácido ascórbico recubierto al 97%, fumarato ferroso chis (este es un tipo de presentación que disponen en la planta de Nutreo) y maltodextrina fue el que presentó la mayor pérdida, siendo esta de 35.92 \pm 13.61%. Seguido por los tratamientos C5, el cual contenía ácido ascórbico recubierto al 97%, fumarato ferroso y maltodextrina; C3, compuesto por ácido ascórbico recubierto al 97%, sulfato ferroso anhídrido y maltodextrina; C7, compuesto por ácido ascórbico recubierto al 97%, pirofosfato férrico y maltodextrina; BC, compuesto por ácido ascórbico recubierto al 97%, y maltodextrina; los cuales no presentaron diferencia estadística entre ellos. Según Stešková *et al.* (2006), en un estudio con pan fortificado con hierro ferroso y

ácido ascórbico a una temperatura ambiente, perdió el 82% del ácido ascórbico que contenía inicialmente. De acuerdo con los resultados obtenidos se considera que la concentración del ácido ascórbico se puede ver afectada en mayor proporción dependiendo del tipo de hierro utilizado en conjunto con el ácido ascórbico (Marchetti *et al.* 2002). Según Stešková *et al.* (2006), en el mismo estudio con pan, en el cual utilizaron ácido ascórbico recubierto con grasa, presentaba una mayor retención de ácido ascórbico durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

El tratamiento CR compuesto únicamente por ácido ascórbico recubierto al 97%; y el tratamiento C4 compuesto por ácido ascórbico recubierto al 97%, hierro aminoquelado al 14.4% y maltodextrina; difieren estadísticamente de los demás tratamientos, ya que son los que presentaron una pérdida menor. Según Marchetti *et al.* (2002) el ácido ascórbico en una mezcla con compuestos aminoquelados a una temperatura de almacenamiento de 37 °C puede disminuir su concentración hasta un 44% y a una temperatura de almacenamiento de 20 °C puede disminuir su concentración hasta un 9.6%. Los resultados descritos anteriormente sobre la pérdida de vitamina C se fundamentan en los estudios realizados por Ordóñez *et al.* (2013), a partir de los cuales puede concluirse que la degradación de la vitamina C suele incrementarse frente al aumento de temperatura y tiempo del proceso.

La desviación estándar en el tratamiento C4 compuesto por ácido ascórbico recubierto al 97%, hierro aminoquelado al 14.4% y maltodextrina, es casi cinco veces mayor que su media siendo esta de ± 24.95 debido a que por factores externos durante el desarrollo de los análisis se obtuvieron mediciones con dispersión considerable, es decir, se tuvo la presencia de valores muy distantes entre sí, lo cual es evidenciado por el sesgo que indica la diferencia entre la desviación estándar y la media. Por estos datos distantes entre sí en cuanto a las repeticiones, no se reportan datos en el Cuadro 7. De acuerdo con los estudios realizados por Ordóñez *et al.* (2013), actualmente, es necesario realizar otras investigaciones que permitan estudiar el efecto del contenido de humedad, la concentración de oxígeno, el potencial de hidrógeno (pH), y la geometría de las muestras en la cinética de degradación de la vitamina C. Es importante resaltar que los resultados de investigaciones realizadas sobre la degradación de la vitamina C pueden ser de gran interés para la agroindustria procesadora de alimentos, en la optimización de los tratamientos térmicos y en el diseño de equipos.

Cuadro 7. Resultados del porcentaje de pérdida de Ácido ascórbico recubierto después de 17 días de almacenamiento.

Tratamiento	Pérdida de vitamina en el tiempo (%)
	Media ± D.E.
C6	35.92 ± 13.61 ^A
C5	33.16 ± 6.47 ^{AB}
C3	27.75 ± 7.41 ^{ABC}
C7	20.71 ± 13.77 ^{ABC}
BC	14.46 ± 11.59 ^{ABC}
CR	9.44 ± 1.68 ^{BC}
C.V. (%)	66.97

D.E. Desviación Estándar.

(^{A-C}) Medias en la misma columna con letras diferentes representan diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

C.V. Coeficiente de variación.

C3 = Sulfato ferroso anhídrido + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C4 = Hierro aminoquelado al 14.4% + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C5 = Fumarato ferroso + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C6 = Fumarato ferroso chis + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; C7 = Pirofosfato férrico + ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; BC = ácido ascórbico recubierto + maltodextrina; CR = ácido ascórbico recubierto.

4. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron premezclas con un bajo grado de complejidad en su composición, el cual facilitó su extracción y análisis químico en el HPLC.
- Se identificó y cuantificó por medio de HPLC las concentraciones iniciales de las premezclas de vitaminas A, B12 y C, las cuales presentaron concentraciones muy similares a lo teórico.
- Se estableció el porcentaje de pérdida de las vitaminas A, B12 y C, las cuales variaron de acuerdo con las premezclas.

5. RECOMENDACIONES

- La vitamina A palmitato 250 UI/g al pesarse en escalas pequeñas, debe ser pesada bajo condiciones de un ambiente cerrado, el cual, permita tener resultados más aproximado sobre su peso.
- Realizar las premezclas simples dentro de la planta de Nutreo a una escala mayor, la cual, se asemeje a una premezcla compleja de venta comercial.
- Hay que considerar que las premezclas realizadas en este estudio fueron sencillas, por ello es recomendable realizar estudios y análisis con premezclas complejas compuestas por más de una vitamina y un mineral.

6. LITERATURA CITADA

- Campos-Giménez E, Fontannaz P, Redeuil K, Kilinc T, Dowell D. 2013. Vitamin C in infant formula and adult/pediatric nutritional Formula by ultra-performance liquid chromatography with Ultraviolet detection: first action 2012.22. *J AOAC Int*; [consultado el 25 de ago. de 2020]. 96(5):1065–1067. eng. <http://stakeholder.aoac.org/SPIFAN/2012.22.pdf>. doi:10.5740/jaoacint.13-141.
- Carlesi B. 2015. Macronutrientes y micronutrientes; [consultado el 17 de ago. de 2020]. http://www.fao.org/elearning/Course/NFSLBC/es/story_content/external_files/Macronutrientes%20y%20micronutrientes.pdf.
- Carlotti ME, Rossatto V, Gallarate M. 2002. Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. *International Journal of Pharmaceutics*. [consultado 18 de oct. de 2020]. 240 (1-2):85-94. eng. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851730200128X#:~:text=Conclusions,stable than O/W emulsions>.
- Comunicaciones A. 2015. C.I. Nutreo S.A.S. [sin lugar]: [sin editorial]. <https://www.revistaalimentos.com/guia/nutreo.html>.
- De Pablo S, King J. 1987. Pérdidas de vitaminas durante el procesamiento de los alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*. 15(3):-143-152.
- [FEN] Fundación Española de Nutrición. 2015. Principales funciones de los minerales. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 20 de ene. de 2020; consultado el 20 de ene. de 2020]. <https://www.fen.org.es/blog/principales-funciones-de-los-minerales-en-la-alimentacion/>.
- Giménez EC, Martin F. 2018. Vitamin B12 (cyanocobalamin) in Infant Formula Adult/Pediatric Nutritional Formula by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Collaborative Study, Final Action 2014.02. *J AOAC Int*. 101(4):1112–1118. eng. doi:10.5740/jaoacint.17-0452.
- Hemery YM, Laillou A, Fontan L, Jallier V, Moench-Pfanner R, Berger J, Avallone S. 2017. Storage conditions and packaging greatly affects the stability of fortified wheat flour: Influence on vitamin A, iron, zinc, and oxidation. *Food Chemistry*. [consultado el 18 de oct. 2020]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814617312372?via=ihub>
- Klu MW, Addy BS, Oppong EE, Sakyi ES, Mintah, DN. 2016. Effect of storage conditions on the stability of ascorbic acid in some formulations. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 8(4), 26-31. <https://doi.org/10.22159/ijap.2016v8i4.14131>. [consultado el 23 de oct. de 2020]. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijap/article/view/14131/pdf>
- Marchetti M, Ashmead HDW, Tossani N, Marchetti S, Ashmead SD. 2002. Comparison of the Rates of Vitamin Degradation when Mixed with Metal Sulphates or Metal Amino Acid

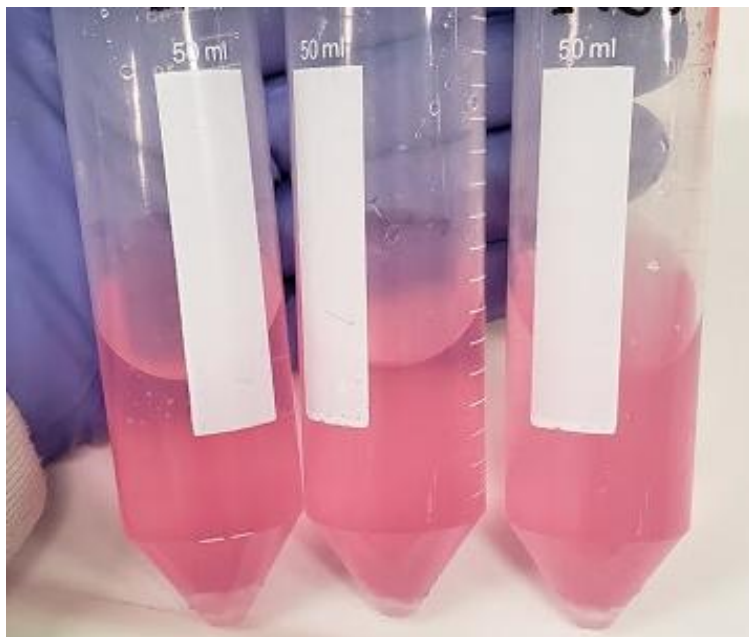
- Chelates. *Journal of Food Composition and Analysis*. [consultado el 12 de oct. de 2020]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157500909177>
- Menza V, Probart C. 2013. *Eating well for good health: Lessons on nutrition and healthy diets*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. xvi, 340. ISBN: 9789251076101; [consultado el 17 de ago. de 2020]. <http://www.fao.org/3/i3261e/i3261e00.pdf>.
- Ministerio de Salud y Protección Social. 2016. Resolución Número 003803 de 2016 (22 de agosto de 2016). *Recomendaciones de Ingesta de Energía y Nutrientes – RIEN para la población colombiana*.
- Ministerio de la Protección Social. 2008. Resolución Número 3863 de 2008 (02 de octubre de 2008). *Suplementos dietarios fabricados en plantas ubicadas en el territorio nacional donde se fabriquen alimentos*.
- Ministerio de la Protección Social. 2007. Resolución Número 3096 de 2007 (05 de septiembre de 2007). *Reglamento técnico sobre las condiciones y requisitos que deben cumplir los suplementos dietarios que declaren o no información nutricional*.
- Nations FAO/OTU. 2003. *Desarrollo de la acuicultura*. [Place of publication not identified]: Food & Agriculture Organi. ISBN: 9789253046133.
- Ordóñez L, Ospina M, Rodríguez D. 2013. Cinética de degradación térmica de la vitamina C en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Revista Lasallista de Investigación*. 10 (2): 44-51.
- Ramírez J, Rodríguez A. 2011. Fortificación de leche y derivados lácteos. *Revista Tecnología Láctea Latinoamericana*. 67(3): 46-55.
- Rosado J, Camacho R, Bourges H. 1999. Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Revista Salud Pública de México*. 42(2): 130-137.
- Rosales D. 2017. *Entendiendo la estabilidad de las vitaminas*. Colombia: Nutreo.
- Stešková A, Morochovičová M, Lešková E. 2006. Vitamin C degradation during storage of fortified foods. *Journal of Food and Nutrition Research*. 45(2): 55-61. [consultado el 23 de oct. de 2020]. <http://www.chemistry-teaching-resources.com/Resources/CfENewHigher/Researching2016/jfnr06-2-p055-061-steskova-3.pdf>
- Shurson GC, Salzer TM, Koehler DD, Whitney MH. 2011. Effect of metal specific amino acid complexes and inorganic trace minerals on vitamin stability in premixes. *Animal Feed Science and Technology*. 163(2-4):200–206. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.11.001.
- Smith C. 2009. *Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables*; [consultado el 3 de sep. de 2020]. <http://www.fao.org/ag/humannutrition/33313-033ebb12db9b719ac1c14f821f5ac8e36.pdf>.

7. ANEXOS

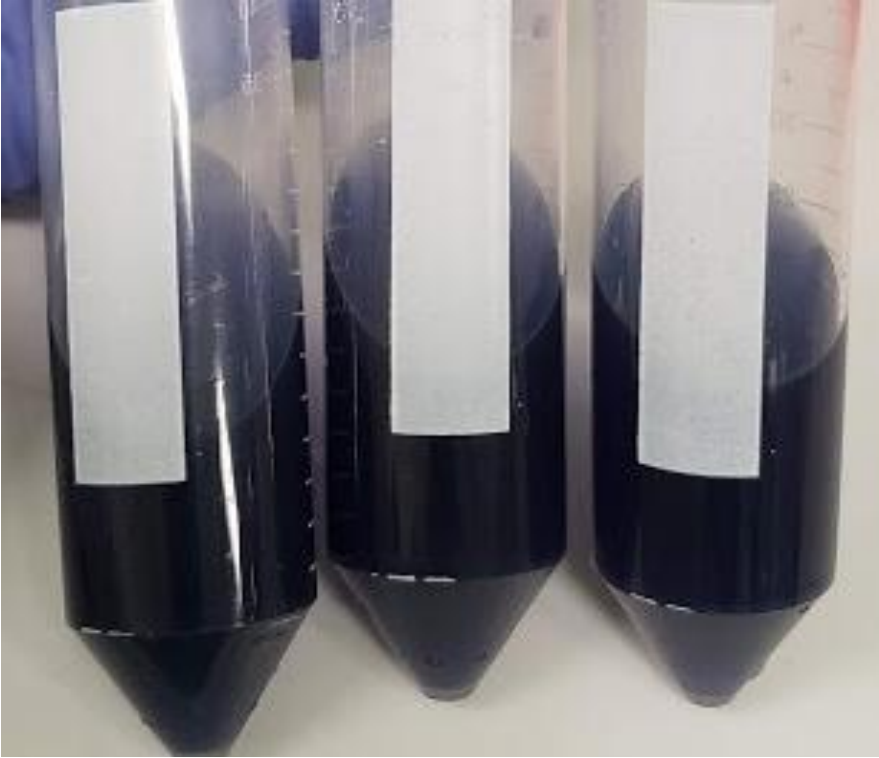
Anexo 1. HPLC modular utilizado.



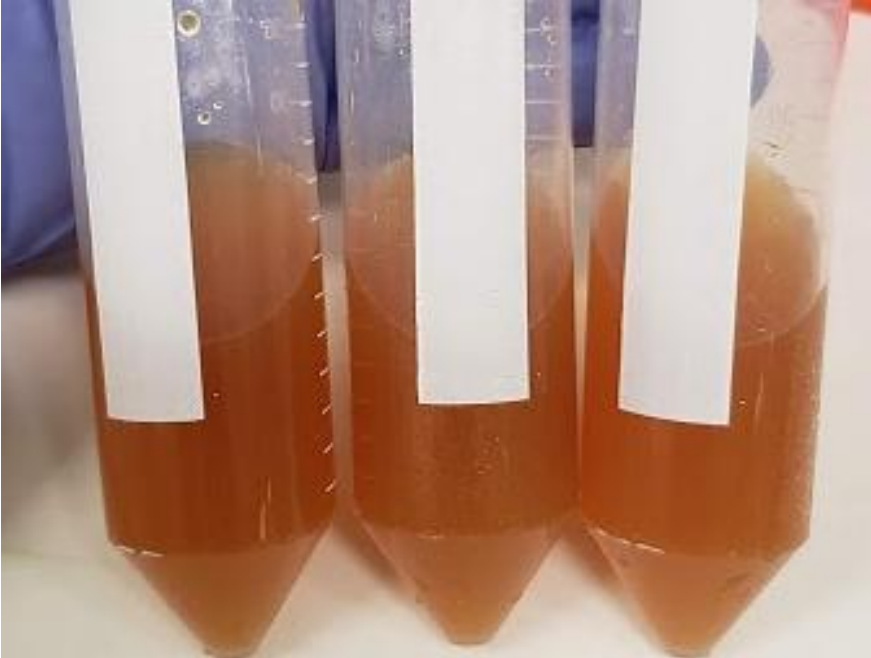
Anexo 2. Muestras de tratamiento B1.



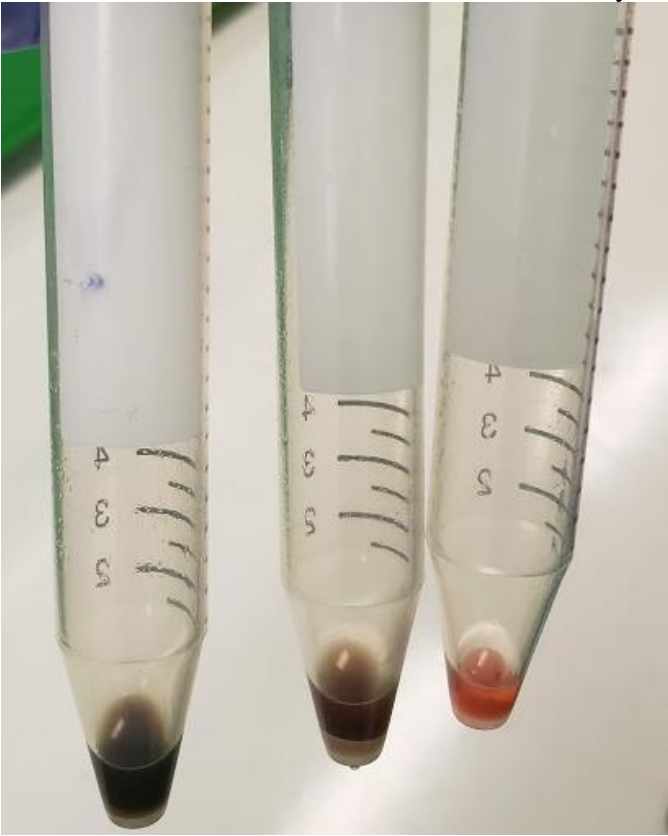
Anexo 3. Muestras de tratamiento B2.



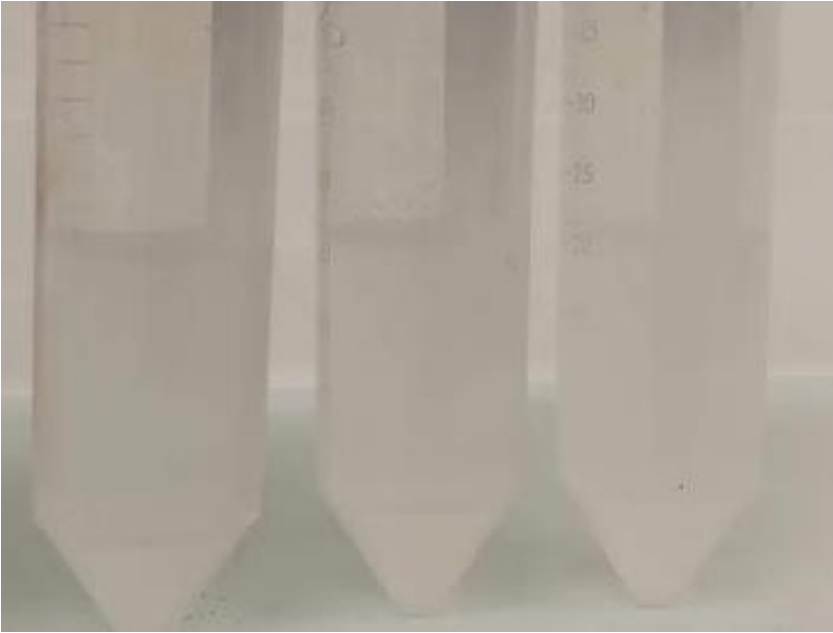
Anexo 4. Muestras de tratamiento B3.



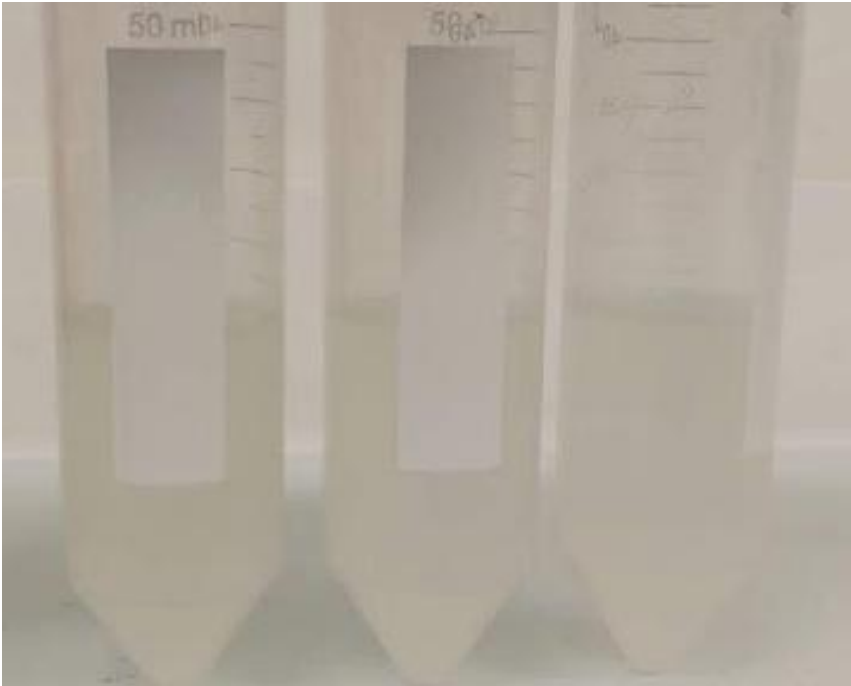
Anexo 5. Muestras de los tratamientos A1, BA, y A



Anexo 6. Muestras de tratamiento BC.



Anexo 7. Muestras de tratamiento C3.



Anexo 8. Muestras de tratamiento C4.



Anexo 9. Muestras de tratamiento C5.



Anexo 10. Muestras de tratamiento C6.



Anexo 11. Muestras de tratamiento C7.

