



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE VITAMINA A EN HÍGADO DE POLLO Y LAS
VARIANTES EN LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN PARA
HÍGADO DE CERDO Y TIBURÓN.**

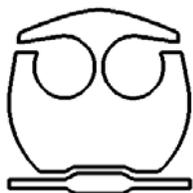
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

NOEMÍ CÁRDENAS RODRÍGUEZ



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente Prof. Adolfo García Osuna

Vocal Profa. Araceli Patricia Peña Álvarez

Secretario Profa. Rosa María Argote Espinosa

1^{er} Suplente Profa. María de Lourdes Osnaya Suárez

2^o Suplente Profa. Thalina Alejandra Rodríguez Fernández

Sitio en que se desarrolló el tema

**Departamento de Química Analítica
Edificio "A" Laboratorio 3B y 3F
Facultad de Química Cd. Universitaria.**

Asesor del tema

Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico

Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano

Sustentante

Noemí Cárdenas Rodríguez

“La vida no tiene sentido sin aprendizaje. La felicidad es aprender a vivir, sabiduría de la vida”



“Quien llega a una conclusión, ha concluido su vida, ha muerto. Vivimos para preguntar, responder, volver a preguntar...Ese es el juego de la autenticidad. El que “ya” sabe está acabado”



“El sentido de la vida no depende del tener, sino del ser”



“Lo correcto es lo ético, y lo ético es el reconocimiento del otro como persona independiente de mi, de sus servicios, de sus utilidades. El ser en cuanto hombre”



“La ciencia no da respuesta a preguntas sobre el hombre, el sentido de la vida, la finalidad de la historia. No es un defecto de la ciencia, es que la ciencia siempre trata de cosas y no del espíritu”



“El hombre es el ser de la pregunta. En eso consiste su ser, precisamente en preguntarse qué es, para que está, que significa”



El Talmud dice: “Contra tu voluntad naciste, contra tu voluntad morirás; queda en tus manos y en tu conciencia, qué haces entre ambos límites”



“Bajo el gran predominio del mundo de la ciencia, como mundo supremo, hemos querido ser científicos también en el amor, también en la familia, también en la crianza de los hijos. Y ahí fallamos. Porque la vida no es científica; no es el ser el que determina el sentido, sino el valer. Ejercitar las virtudes”



“Nos devoran los pensamientos, nos destruyen y luego nos rehacen en una carne sin piel, a flor las venas y la sangre, heridas por todos los rumbos del aire....La inteligencia no nos cura nunca: nos desnuda las cosas, nos las hace más crudas, más claras”



“Siempre hay zonas de podredumbre en las almas más puras, pero creo necesaria esa oscuridad de ciertas cosas para que resplandezcan otras”



“Creces, surges, fuera, dentro, impalpable, en el aire y el alma – un alma como aire mecido en música como un tacto de luz - ; no tu presencia física, sino el clima alucinado que te rodea, la atmósfera que no respiras, sino que te ilumina y penetra, el estremecimiento que te anuncia. Doy gracias a Dios porque existes”

AGRADECIMIENTOS

A MI FAMILIA

A mis papás Víctor y Noemí, a mis hermanos Annia y Víctor Iván y a mis mascotas “Bebito”, “Winsbone”, “Chapis”, “Grace” y los “Negritos”

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA ENP 2 “ERASMO CASTELLANOS QUINTO”

A LA FACULTAD DE QUÍMICA

A MIS PROFESORES

A mi Tutor y Supervisora Técnica Prof. Adolfo García Osuna y Profa. Silvia Mendoza Arellano por su amistad, estímulo y gran apoyo brindado.

A la Profa. Ernestina Cervera por el estímulo y apoyo brindado.

Al Dr. José Pedraza por su apoyo, paciencia, amistad y estímulo brindado.

Al Prof. Hermilo Vargas de la Vega al inculcarme el gusto por la química

A la Dra. Ana Lilia Lastra Santana y al Dr. Mariano Martínez por acercarme y apoyarme en los caminos de la investigación científica.

A los profesores Rosalina Rojas Palomera, Gioconda Ponzanelli, Natalio Aníbal Bascuñan, Jose Luis Carreón, Pedro Villanueva, Luz Elena Vera, Eduardo Cumming, Ignacio Camacho, Maria Teresa Herrera, Yolanda González, Marina Gavilanes, Luis Antonio Frade, María de los Angeles Martínez, René de los Ríos, Pedro Valle, Francisca Iturbe, Orlando Abraján, Gabriela Lucía Cornejo, Rodolfo Landa, Armando Conca, Gabriela Alatorre, Juan Carlos Guevara, Judith Jiménez, Miguel Hidalgo por los conocimientos que cada uno de ustedes

brindó a mi formación profesional y a muchos por su apoyo, amistad, reconocimiento y consejos brindados.

A MIS AMIGOS

Por su apoyo, amistad, cariño, confianza, compañía brindados (en las buenas y en las malas) además por tenerme paciencia y escucharme.

En especial debo nombrar a Nadia, Eva, Guillermo, Lianka, María, Gaby Aldape, Gaby Rojas, David, Mónica, Adriana Daniel, Juan Carlos, Talía, Gina, Perla, Agustín, Miriam, Roberto, Anaid por su apoyo durante la carrera.

A Teresita, Lizbeth, Jose Arturo, Juan Daniel, Guillermo, Carlitos, Tania y Tonantzin por la amistad brindada aún después de haberse disgregado el equipo durante nuestra separación profesional.

A Elizabeth, Susana, Alia, Adriana, Irasema, Marisol, Sabina, Omar, Carolina, Karina, Paola por su apoyo y compañía brindados

Debo agradecer igualmente al Dr. Maximiliano de León González y al Dr. Carlos Torres Saunders por procurarme la fuerza vital que es la salud

A todos mis amigos del taller de Psicología y a los Lic. Francisco, Dalila, Ivi por compartir su amistad, pesares, ilusiones, sueños, opiniones lo que me hizo crecer como persona.

INDICE	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
ANTECEDENTES TEÓRICOS	3
VITAMINA A	3
1. Estructura y propiedades químicas	3
2. Propiedades físicas	4
3. Presencia en alimentos	4
4. Fisiología	5
<i>4.1 Absorción, biodisponibilidad, transporte y distribución.</i>	5
<i>4.2 Metabolismo, almacenamiento y excreción</i>	10
<i>4.3 Función del retinol en el cuerpo humano</i>	11
<i>4.4 Requerimientos e ingesta recomendada</i>	12
<i>4.5 Toxicidad</i>	15
5. Análisis de vitamina A por Cromatografía Líquida	17
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)	19
1. Definición de Cromatografía	19
2. Clasificación de la Técnica Cromatográfica	20
3. Tipos de aplicación de la CLAE	21
4. Fase estacionaria (Adsorbentes)	22
5. Mecanismos de retención	22
6. Cromatografía de líquidos con fases químicamente unidas	23
<i>6.1 Preparación de soportes con fase químicamente unida</i>	23
<i>6.2 Grupos funcionales en los soportes con fase químicamente unida</i>	24

7. Instrumentación	24
7.1 Fuente de fase móvil	25
7.2 Sistema de bombeo	26
7.3 Sistema de inyección	28
7.4 Sistema de separación	29
7.5 Sistema de detección	30
7.5.1 Detector espectroscópico UV / Visible	31
7.6 Sistema de registro	34
PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS	36
1. Constante de distribución	36
2. Tiempo de retención y tiempo muerto	36
3. Eficiencia	37
4. Factor de capacidad	37
5. Selectividad	38
6. Resolución	38
7. Efecto del factor de capacidad y la selectividad en la resolución	39
8. Ecuación de Van-Deemter	40
FUNDAMENTO TEÓRICO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN FORMA DE RETINOL	41
1. Extracción Líquido-líquido	41
2. Extracción en fase sólida	43
PRUEBAS DE VALIDACIÓN ANALÍTICA	50
DESARROLLO EXPERIMENTAL	54
1. Fase I. Desarrollo de la metodología de extracción de vitamina A en hígado de pollo	58

2. Fases II y III. Modificación de la metodología de extracción de vitamina A en hígado de pollo y su aplicación para las muestras hígado de cerdo e hígado de tiburón.	69
3. Fase IV. Análisis cualitativo y cuantitativo por CLAE	78
4. Fase V. Evaluación estadística de la precisión (a partir del estudio de repetibilidad) de la metodología de extracción de vitamina A aplicada a las muestras hígado de pollo,cerdo y tiburón y el análisis de recobro en hígado de pollo aplicando el método base (sin modificaciones) y el método modificado	79
RESULTADOS	81
1. Análisis cualitativo	81
2. Análisis cuantitativo	83
<i>2.1 Resultados de extracción de vitamina A en la muestra de hígado de pollo aplicando la metodología sin modificaciones</i>	85
<i>2.2 Resultados de extracción de vitamina A en la muestra de hígado de pollo aplicando la metodología con modificaciones</i>	87
<i>2.3 Resultados de extracción de vitamina A en la muestra de hígado de cerdo y tiburón aplicando la metodología con modificaciones</i>	89
3. Evaluación estadística (repetibilidad) en las diferentes muestras	92
4. Recobro	100
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	104
CONCLUSIONES	108
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXO	113

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de vitamina A es común en países en vías de desarrollo, tanto en personas adultas así como en niños. Sin embargo, es en los niños donde dicha deficiencia influye notablemente en su crecimiento. El *Fondo Internacional de Ayuda a la Infancia de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud* (UNICEF/WHO por sus siglas en inglés de *United Nations International Children's Emergency Fund and World Health Organization*) consideran que un suplemento de vitamina A en niños con deficiencia marginal de dicha vitamina puede reducir su mortalidad hasta en un 23%.

Debido a esto último, es necesario realizar la determinación de vitamina A en diferentes alimentos, así como en un alimento con diferentes fuentes de obtención, ya que es necesario conocer cuáles de ellos proporcionan las cantidades adecuadas de dicha vitamina, para ello es necesario encontrar un método de análisis adecuado que nos lleve a encontrar resultados válidos.

A nivel mundial se han buscado desarrollar métodos adecuados para el análisis de los alimentos con el fin de encontrar respuesta a los problemas agroalimentarios que han surgido actualmente; además de buscar mejorar el intercambio comercial y la calidad de los alimentos.

La determinación de vitamina A como retinol es en esencia compleja debido a que en matrices vegetales no se encuentra como tal, sino como provitamina A (molécula precursora de vitamina A) y en presencia de otros compuestos como la clorofila y en el caso de las matrices animales se encuentra en presencia de otros compuestos tales como lípidos, otras vitaminas o en forma de ésteres (vitamina A preformada), siendo esta última forma como comúnmente se encuentra, además es bien sabido que el retinol es extremadamente susceptible a la degradación por su estructura altamente insaturada; de ahí que su inestabilidad también sea un problema durante la metodología de análisis. Actualmente, existe un método oficial a nivel mundial para la determinación colorimétrica de vitamina A, como retinol en mezclas de alimentos, por la Asociación Oficial de Químicos Analistas; 1995 (AOAC por sus siglas en inglés de *Association of Official Analytical Chemists*). En este método se requiere de mucho material y reactivos además de largos tiempos de análisis, por lo que resulta poco aplicable como análisis de rutina.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia CLAE (HPLC por sus siglas en inglés) fue el método elegido para el análisis de retinol en hígado, ya que el análisis de retinol fue

validado anteriormente por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP)¹ permitiendo realizar un análisis cualitativo y cuantitativo con buena resolución, linealidad y precisión del sistema, así como una buena estabilidad de estándares. Como parte de los objetivos realizados en este estudio está el tratar de utilizar cantidades pequeñas de muestra, reactivos, y tratando de aplicar nuevas técnicas de preparación de muestra, para esto se utilizará el método de análisis validado por la alumna Susana I. Martínez Sámano en la tesis “Validación de un método de análisis de vitamina A en hígado de res por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE)”² aplicando la técnica de extracción ahora en hígado de pollo y planteando las adaptaciones a la técnica de extracción para desarrollarlo en los hígados de cerdo y tiburón.

OBJETIVOS

- Explicar las diferentes etapas de la metodología de extracción de vitamina A planteados para el hígado de res, dando la explicación teórica de cada etapa aplicada y plantear variaciones a realizar en las diferentes etapas; realizando la metodología en la matriz de hígado de pollo sin y con modificaciones.
- Realizar el estudio de repetibilidad y recobro al análisis de vitamina A en hígado de pollo, optimizando las condiciones en la metodología sin y con modificaciones del método base que se va a utilizar.
- Visualizados los resultados al realizar la metodología para el análisis de vitamina A en el hígado de pollo sin y con modificaciones, plantear las adaptaciones que se tendrían que realizar para el análisis de vitamina A en hígado de cerdo e hígado de tiburón.

ANTECEDENTES TEÓRICOS

VITAMINA A^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10}

Estructura y propiedades químicas.

La molécula de *trans*-retinol es considerada el compuesto padre del grupo de la vitamina A, siendo ésta un compuesto insaturado con un grupo hidróxilo. Su nombre se origina históricamente por la función que desempeña en la visión. La estructura genérica de los retinoides se ilustra en la *figura 1* donde se puede observar el anillo de β -ionona.

La molécula puede sufrir modificaciones químicas y estructurales, que puede generar muchos tipos de retinoides con diferentes propiedades, en la naturaleza; pocos de esos compuestos exhiben una significativa actividad como vitamina A, incluyendo sobre todo formas *trans*- de retinol y sus ésteres, retinal, ácido retinoico e isómeros 9, 11 y 13 *cis*. Cabe mencionar; que los isómeros *cis* son selectivamente interconvertibles a las formas *trans* en el cuerpo.

La actividad de la vitamina A es comúnmente expresada en Unidades Internacionales U.I.; así una U.I. es equivalente a 0.300 μg de retinol *trans* a 0.344 μg de acetato de retinilo ó 0.549 μg de palmitato de retinilo, posteriormente en la sección de *Requerimientos e Ingesta recomendada* se hablará más con respecto a las equivalencias.

La estructura dominante del retinol, se caracteriza por poseer un extenso sistema de dobles ligaduras conjugadas, lo cual le atribuye a la molécula propiedades fisicoquímicas y biológicas, entre ellas la extremada labilidad de la vitamina A, ya que el retinol y sus derivados son particularmente sensibles a condiciones de oxidación y son rápidamente destruidos por calor, luz y ácidos, siendo susceptibles a la isomerización dando productos de su fragmentación que originan sabores en algunos alimentos, sin embargo el retinol o vitamina A es relativamente resistente a los álcalis y es protegido de la degradación si se acompaña de sustancias antioxidantes tal como los tocoferoles y carotenos, y con la ausencia de luz UV.

Los ésteres de retinilo son considerablemente más estables que el retinol, aunque se han encontrado pequeñas diferencias en cuanto a la absorción intestinal, los ésteres de retinilo exhiben idénticas propiedades biológicas que la vitamina A por su conversión a retinol en la pared intestinal como se hablará posteriormente.

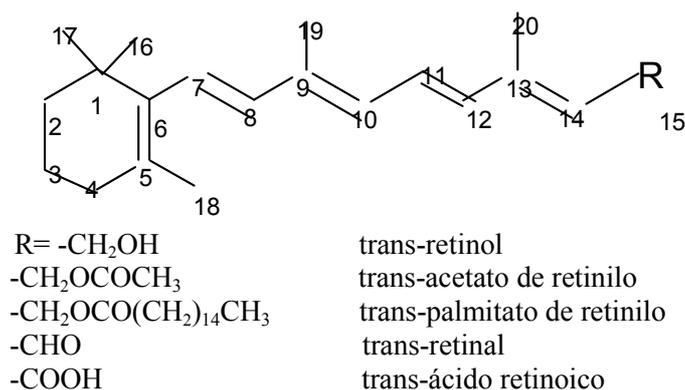


Fig. 1. Estructura de los retinoides básicos.

Propiedades físicas.

El retinol (9,13-dimetil-7-[1,1,5-trimetil-6-ciclohexen-5-il]-7,9,11,13-nonatetraeno-15-ol) es un polvo cristalino de color amarillo pálido o líquido aceitoso, dependiendo de su pureza. Es insoluble en agua pero rápidamente miscible en solventes orgánicos. En la *tabla 1* se resumen algunas otras características y propiedades físicas del retinol así como de dos de sus principales ésteres.

Tabla 1. Propiedades físicas del retinol (*todo-trans*) y de sus ésteres principales.

Propiedad	Retinol	Acetato de retinilo	Palmitato de retinilo
Fórmula condensada	C ₂₀ H ₂₀ O	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	C ₃₆ H ₆₀ O ₂
Peso fórmula (g/mol)	286.46	328.50	524.88
Punto de fusión (°C)	63-64	57-59	28-29
UV λ _{max} . absorción (nm)	325	326	326
Coef. de extinción (E)	1,820	1,530	960
Coef. de absortividad molar (ε)	52,140	50,260	50,390
Fluorescencia:			
λ _{max} excitación (nm)	325	325	325
λ _{max} emisión (nm)	470	470	470

Presencia en alimentos.

Todas las formas de vitamina A encontradas en alimentos se derivan de los carotenoides (provitamina A), que pueden encontrarse en las plantas y animales. Los seres humanos obtienen la vitamina A preformada exclusivamente de fuentes animales.

El retinol y sus derivados no están ampliamente distribuidos en alimentos. El aceite de hígado de pescado es la fuente natural más concentrada de vitamina A, al igual que la leche y los huevos que contienen cantidades significativas de esta vitamina.

Los retinoides en alimentos se encuentran como mezclas de ésteres de retinilo, aunque en menos contribución que el retinol. Las formas predominantes de retinoides son largas cadenas de ésteres siendo notable el éster de palmitato con pequeñas contribuciones de los

ésteres de oleato y estearato, sin embargo, los huevos son una excepción donde el retinol libre se encuentra en mayor proporción. En la *tabla 2* se enlistan alimentos representativos ricos en vitamina A.

Fisiología

“Absorción, biodisponibilidad, transporte y distribución”

Vitamina A es el nombre general que se aplica a los compuestos que muestran las propiedades biológicas del retinol, incluyendo el mantenimiento del tejido epitelial y la función visual.

Su clasificación incluye retinol, ésteres de retinilo y retinal (aldehído de la vitamina A), el ácido retinóico puede incluirse aunque no tiene una función sustancial en el proceso de la visión. Todos son compuestos isoprenoides, que tienen en común una cadena poliénica adjunta a un anillo de seis miembros substituido con tres grupos metilo (*fig. 1*). Cabe mencionar que el término “retinoides” se refiere a todos los compuestos naturales o sintéticos que muestran la misma actividad biológica que la vitamina A tal como promover la diferenciación celular (*tabla 3*), sin embargo no todos los retinoides pueden realizar todas las funciones de la vitamina A tal como contribuir a la función de la visión. Los compuestos del grupo de la vitamina A no se encuentran en las plantas pero son compuestos característicos del reino animal, la excepción más notable es el 13-*cis*-retinal que se encuentra en la membrana celular de ciertas halobacterias.

El consumo de la vitamina A en los humanos; proviene de dos fuentes: de la vitamina A preformada y de los carotenoides (provitamina A). La vitamina A preformada (principalmente ésteres de retinol con largas cadenas de ácidos grasos) provienen de productos animales o de suplementos dietéticos y de ésteres de retinilo tal como el palmitato y acetato de retinilo, que son más estables químicamente que el retinol libre.

Tabla 2. Contenido de vitamina A como retinol para diferentes alimentos vegetales y animales.¹

Alimento	Contenido de Vitamina A en μg (equivalentes de retinol) por 100 g de porción comestible.			
	A	B	C	D
GRASAS Y ACEITES				
Mantequilla	902.0	828.3	3,500	
Margarina	900.0			
Mayonesa	80.0			
Aceite de hígado de bacalao		1,800.0		
Hígado cerdo	17,595.0	17,595.0	20,000	12,000
Patés	8,300.0			
Huevo de gallina entero	16.0	227.0	1,200	1,000
FRUTAS				
Aguacate	41.0		300	59.94
Albaricoque	357.0		2,750	3,000
Cerezas y guindas	218.0			250
Ciruela	288.0			250
Mandarina		106.0		
Naranja	420.0	49.0	200	150
Manzana	480.0		100	75
Melocotón	500			110
DERIVADOS LÁCTEOS				
Yogur natural	10.0	9.8	150	0
Queso de cabrales		300.0		
Queso manchego curado	357.0			
Queso manchego fresco	218.0			
Queso manchego semicurado	288.0			
Queso de bola	30.5			
Crema, natillas y flan	420.0			
Crema dulce				1,600
Helados y mousse	480.0			0
Nata	500			
PESCADOS Y MARISCOS				
Pez espada	500.0			
Almejas, chirlas, etc.	250.0			
Sardina	50.0	62.9		200
VERDURAS				
Endivia	1,100.0			2,500
Escarolas	1,100.0			
Acelgas		183.0		
Espinacas		542.0	8,000	9,000
Perejil	7,000.0			
Tomate	207.0	94.0	900	1,000
Zanahoria	1,333.0		10,000	12,000

A = Mataix, V. J. Nutrición para educadores. Díaz de Santos, S.A., Madrid España.

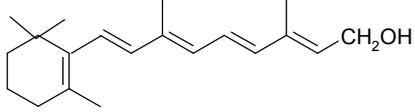
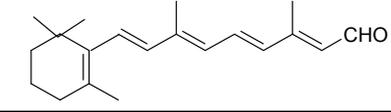
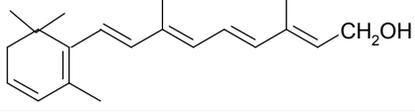
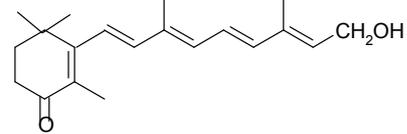
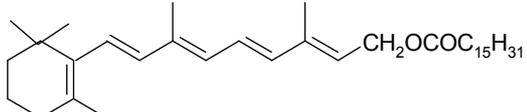
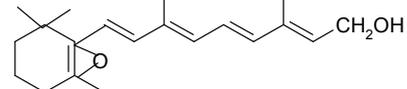
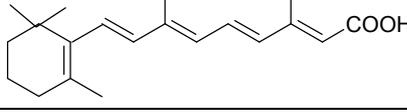
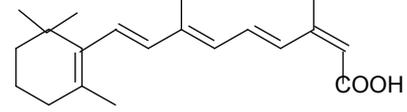
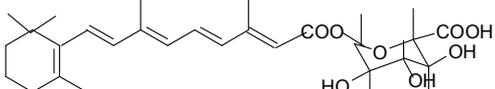
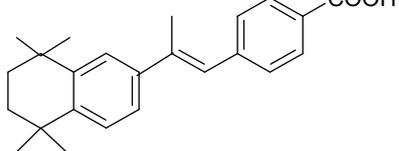
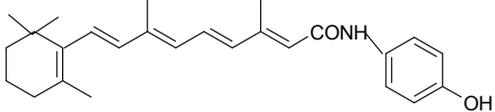
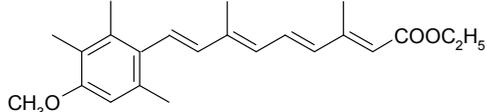
B = Tabla de composición de Alimentos Españoles. Ed. Universidad de Granada, 1998.

C = Tabla de composición de alimentos. Osborne. Análisis de los Nutrientes de los Alimentos. Acibia.

D = Tabla del INN SZ.

Nota: En vegetales, se transformaron las concentraciones de β -caroteno a retinol.

Tabla 3. Algunos retinoides comunes que poseen la actividad biológica de la vitamina A.

Nombre	Fórmula
<i>Todo-trans</i> -retinol	
<i>Todo-trans</i> -retinal	
<i>Todo-trans</i> -3,4-didehidroretinol	
<i>Todo-trans</i> -4-oxoretinol	
<i>Todo-trans</i> -palmitato de retinilo	
<i>Todo-trans</i> -5,6-epoxiretinol	
<i>Todo-trans</i> -ácido retinóico	
13- <i>cis</i> -ácido retinóico	
<i>Todo-trans</i> -retinoil-β-glucurónido	
TTNPB <i>ácido tetrahidrotetrametilnaftalenilpropenilbenzóico</i>	
4-hidroxifenilretinamida	
Acetretina	

Los carotenoides (provitamina A) se obtienen normalmente de vegetales y plantas, siendo el β -caroteno el más distribuido en plantas que otros carotenoides y por lo tanto; la fuente más importante de vitamina A, existen otros carotenoides tal como el α -caroteno, β -criptoxantina y los β -apocarotenales que también son fuentes importantes de esta vitamina. Otros carotenoides tal como el licopeno y las xantófilas son los que se encuentran en mayor proporción en algunos alimentos y tienen importantes funciones fisiológicas aunque no presentan actividad de provitamina A. En la *tabla 4* se enlista la actividad provitamínica de los carotenoides principales en relación con el β -caroteno.

Se estima que de la ingesta diaria de vitamina A se absorbe eficientemente de un 70 a un 85%, aunque usualmente suele ser mucho menor, ya sea por una baja absorción intestinal y/o un rápido metabolismo, además la eficiencia de absorción varía con el metabolismo de los carotenoides dependiendo de la matriz biológica en que se encuentren estos últimos.

Para la absorción de la vitamina A y los carotenoides es esencial la formación de una micela y la presencia de ácidos biliares. En el lumen intestinal los ésteres de vitamina A (retinil ésteres) son hidrolizados para dejar el retinol libre siendo absorbido este último y rápidamente reesterificado dentro de las células intestinales (*figura 2*). Las provitaminas A son convertidas a retinal en las células intestinales por la presencia de una dioxigenasa, este producto es rápidamente reducido a retinol enzimáticamente siendo entonces esterificado.

Se ha observado que el proceso de esterificación del retinol libre dentro de las células intestinales se realiza por medio de una proteína intracelular que enlaza al retinol (llamada CRBP II, con un peso molecular de aproximadamente 14,600 Da), el retinil éster transfiere un ácido graso de la fosfatidilcolina (Lecitin-retinol-aciltransferasa; LRAT), aunque una acil-coenzima-A (acilCoA-retinol y acil-transferasa ARAT) está también presente.

Los retinil ésteres son incorporados al corazón de los quilomicrones y transportados a la linfa, después de la remoción de los triacilglicérols por una lipasa lipoproteica así como de las partículas lipoproteicas que circulan a través de los tejidos periféricos, los quilomicrones son rápidamente tomados del hígado y los ésteres de vitamina A son hidrolizados por una retinil-éster-hidrolasa.

El retinol resultante es entonces reesterificado (primeramente por LRAT) y almacenado en el hígado o enviado al interior del plasma como un complejo proteína-retinol.

Vitamina A,

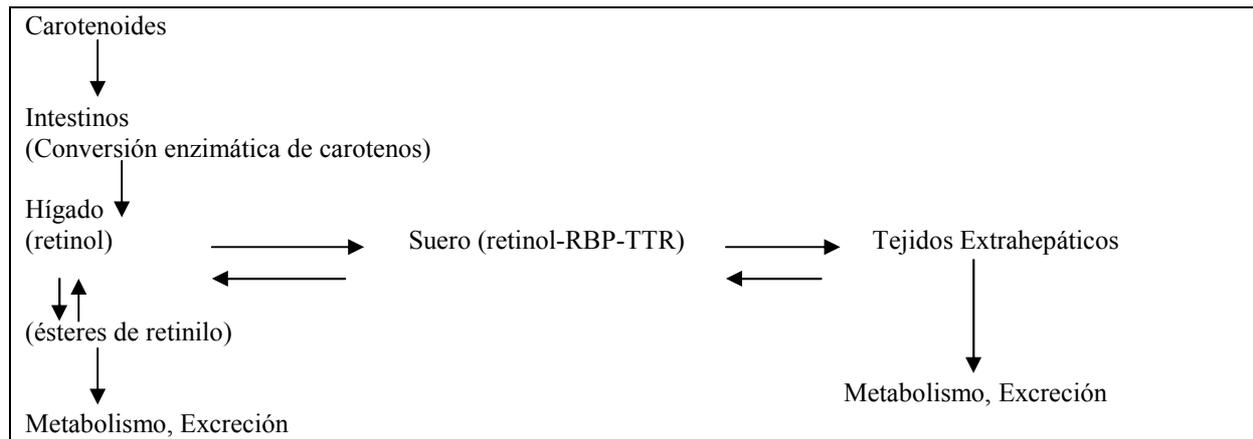


Fig. 2. Absorción de la vitamina A.

Como muchas formas de la vitamina A son hidrofóbicas, el transporte, metabolismo y función de la vitamina A son dependientes de una serie de enlaces con proteínas. El peso molecular del complejo retinol-proteína del plasma (RBP por sus siglas en inglés) es de aproximadamente 21,000 Da en mamíferos, el complejo RBP posee una estequiometría 1:1. La molécula hidrofóbica del retinol se une como “barril” en el interior de la proteína, siendo protegida del ambiente acuoso. Se ha observado que la Holo-RBP enlaza transtiretina en el plasma (TTR formalmente llamada prealbúmina), la TTR es un tetrámero que puede enlazar hasta cuatro moléculas de RBP.

La liberación de la Holo-RBP del hígado es cuidadosamente controlada para mantener los niveles de circulación de retinol, aunque el mecanismo de su control no está aún explicado. En la ausencia de niveles adecuados de vitamina A el RBP es acumulado en el hígado preparado para ser liberado tan pronto como sea posible como vitamina A.

Tabla 4. Actividad de vitamina A en relación con el β -caroteno en carotenoides comunes.

<i>Carotenoide</i>	<i>Actividad (%)</i>	<i>Presencia (lista parcial)</i>
β -caroteno	100	Plantas verdes, vegetales, zanahorias, papas, calabazas, jitomates y frutas amarillas.
α -caroteno	50-54	Plantas verdes, zanahorias, maíz.
γ -caroteno	42-50	Zanahorias, papas, maíz, jitomates, algas, frutas dulces.
Licopeno	Inactivo	Tomates, zanahorias, frutas cítricas rosadas.
Zeaxantina	Inactivo	Espinacas, paprika, maíz, frutas.
Luteína	Inactivo	Hojas verdes, maíz, papas, espinacas, zanahorias, jitomates, frutas.
Astaxantina	Inactivo	Naranjas, algas, pescados.
Cantaxantina	Inactivo	Hongos, algas, crustáceos.
β -Apo2' carotenal, β -Apo10' carotenal, β -Apo8' ácido carotenoico,	Activos	Frutas cítricas, plantas verdes.
β -Apo8' carotenal	36-72	Frutas cítricas, plantas verdes.

“Metabolismo, almacenamiento y excreción”

La vitamina A en exceso es almacenada en el hígado como éster con largas cadenas de ácidos grasos en un 95%, el otro 5% es almacenado como retinol libre. El palmitato de retinol es el éster principal que se encuentra en el hígado del humano, entre otros animales, aunque se han encontrado cantidades significativas de otros ésteres tal como el oleato y estearato. El hígado, es el órgano que contiene el 90% de la vitamina A total que se encuentra en el cuerpo humano, aunque otros órganos tal como el riñón, testículos y glándulas adrenales también contienen cantidades detectables de ésteres de retinilo.

Los dos tipos de células hepáticas involucradas en el metabolismo de la vitamina A son los hepatocitos (células parénquimas) y los lipocitos. En los hepatocitos se sintetiza la mayor cantidad de RBP además de realizarse su liberación, aunque algunos ésteres de retinilo también han sido encontrados. Los lipocitos almacenan los retinil ésteres como gotas de lípidos en el citoplasma donde también se encuentra triacilgliceroles y algunos ésteres de colesterol, además ha sido observado una transferencia de vitamina A como retinol entre los lipocitos y los hepatocitos.

Es cierto que el RBP es la mayor forma de transporte del retinol del hígado hacia los tejidos periféricos, aunque no queda claro el transporte de la vitamina A de otros tejidos hacia el hígado, aunque se piensa que puede ser porque los retinil ésteres son transportados a través de lipoproteínas o es vía RBP sintetizado de tejidos lejanos (a través del mRNA para RBP).

En ratas se ha observado que el catabolismo de la vitamina A involucra la oxidación del anillo ciclohexénico (particularmente en su posición 4), la formación de epóxidos en las posiciones 5 y 6, la hidroxilación de los grupos metilo del anillo y el acortamiento de la cadena (*figura 1*). Los metabolitos resultantes son generalmente inactivos aunque algunos pueden tener una pequeña actividad biológica. Los retinoides más polares son excretados a través de la orina y en la bilis.

El retinol puede ser reversiblemente oxidado a retinal (aldehído de la vitamina A) y ésta a su vez a ácido retinoico, este último no puede ser convertido de nuevo a las otras formas. Por consiguiente el retinol, los ésteres de retinilo y el retinal poseen la misma actividad biológica, ya que son interconvertidos; el ácido retinoico posee algunas funciones del retinol aunque sus derivados no son almacenados. La concentración de ácido retinoico en suero humano es 5-10 nmoles/L y la de retinol es de 1-2 μ moles/L.

“Función del vitamina A en el cuerpo humano”

Las mayores funciones de la vitamina A es en el metabolismo de la visión, la diferenciación de tejidos epiteliales y en el sistema inmunológico. El metabolismo de la vitamina A en la retina del ojo es único.

La vitamina es almacenada en el epitelio de la retina como forma de retinil ésteres. Los *trans*-retinil ésteres son simultáneamente hidrolizados e isomerizados a 11-*cis*-retinol, un compuesto único en el ojo. Este compuesto es oxidado a 11-*cis*-retinal y éste es transferido al epitelio de las células de bastón por medio de una proteína (IRBP: Intersticial Retinoid Binding Protein) de 140,000 Da. En los bastones, el 11-*cis*-retinal se enlaza con la proteína opsina, dando un complejo del pigmento visual llamado rodopsina. Cuando un protón de luz es absorbido por el complejo rodopsina, el 11-*cis*-retinal es isomerizado a *trans*-retinal y liberado del complejo proteínico; el resultado es un cambio de conformación de la proteína iniciando una cascada de reacciones, resultando como una señal neurológica al cerebro. La proteína opsina se encuentra entonces disponible para enlazar otra molécula de 11-*cis*-retinal para iniciar otro ciclo visual. El *trans*-retinal que fue liberado del complejo proteínico es transferido al epitelio vía IRBP, que es enzimáticamente reducida a *trans*-retinol y esterificada. En contraste con el gran tiempo de movilización de la vitamina A en otros

tejidos, la vitamina A en el ojo es conservada, con un pequeño transporte hacia el hígado. Una prolongada deficiencia de vitamina A reduce la sensibilidad a la luz, manifestándose primeramente como una ausencia de visión nocturna, este efecto generalmente es reversible con suplementos de vitamina A.

La córnea del ojo depende de la vitamina A para una correcta diferenciación celular y para la secreción de glicoproteínas protectoras. En la deficiencia de vitamina A, el tejido de la superficie de la córnea y en la retina es susceptible al ataque de bacterias oportunistas dicho ataque no es reversible dando como resultado pérdida de la visión aunque posteriormente se den suplementos de vitamina A. La degeneración de la córnea recibe el nombre general de xeroftalmia.

La acción de los retinoides en la diferenciación celular se manifiesta en varios sistemas, incluyendo el mantenimiento del tejido epitelial (por ejemplo los pulmones, intestinos, piel y la córnea del ojo). En la ausencia de niveles adecuados de vitamina A, las células de los tejidos no se manifiestan en forma normal dando como resultado cambios en su estructura (tejidos estratificados y cornificados) y pérdida en la habilidad de secretar glicoproteínas. El mecanismo común de los retinoides en la diferenciación celular envuelve el enlace del ácido retinoico (y quizás el retinol) con proteínas específicas asociadas con el DNA. Esos receptores proteínicos nucleares (retinoic-acid-receptor-proteína: RARs) pueden unirse a regiones específicas del DNA promoviendo o inhibiendo la transcripción de genes específicos.

Ha sido argumentado aún sin tener pruebas que el ácido retinoico es una forma activa de la vitamina A que se requiere para la diferenciación celular. El ácido retinoico es un metabolito endógeno de la vitamina A, se ha encontrado que este ácido así como sus análogos aminoran varios desórdenes en la piel tal como el acné, irritación de la piel, incremento de colesterol sérico y efectos teratogénicos. Los retinoides han mostrado inhibir el desarrollo de cáncer en varios tejidos.

En estudios con animales se ha demostrado la necesidad de vitamina A para las funciones inmunológicas, aunque la acción molecular de los retinoides no ha sido descubierta.

“Requerimientos e ingesta recomendada”

La concentración de vitamina A en el hígado provee la mejor evaluación del estado de la vitamina A, los niveles de retinol sérico son mantenidos constantes y por ello no se usan para evaluar el estado de la vitamina A, excepto cuando las reservas de vitamina A en el

hígado disminuyen por debajo de 0.07 $\mu\text{mol/g}$ de hígado (los niveles de retinol sérico oscilan normalmente de 1-2 $\mu\text{moles/L}$).

Como la concentración de vitamina A en el hígado no es rápidamente mensurable así como los niveles de retinol sérico no son adecuados indicadores del estado de la vitamina A en el cuerpo humano, se han desarrollado muchos métodos indirectos para su medición, así (además en la *tabla 5* se indican más factores de conversión para dar valores de vitamina A):

1 UI (Unidad Internacional) = 0.3 μg de retinol = 0.344 μg de acetato de retinilo = 0.6 μg de β -caroteno.

Las unidades más convenientes a utilizar son los equivalentes de retinol ER; por lo tanto:

1 ER = 1 μg de retinol = 6 μg de β -carotenos = 12 μg de otros carotenoides.

así:

1 μg de retinol = 3.3 UI.

1 μg de β -caroteno = 0.167 μg de ER.

1 μg de otros carotenoides = 0.084 μg de ER.

Los requerimientos nutricionales de vitamina A aún no han sido muy bien definidos por la diversidad de las funciones de dicha vitamina, sin embargo, para proveer una adecuada y segura ingesta humana de vitamina A actualmente la WHO/FAO sugiere la ingesta diaria recomendada (RDIs: Recommended Dietary Intakes en inglés) para adultos de 9.3 ER/Kg de peso/día y la US National Research Council (1989) recomienda un *nivel óptimo de ingesta* para hombres de 1,000 ER/día y para mujeres de 800 ER/día (por tener menor peso corporal), siendo necesario suplir el 25% de dicha ingesta con carotenoides. En la *tabla 6* se dan los requerimientos de vitamina A en México.

Tabla 5. Diferentes factores de conversión para estimar la cantidad de Vitamina A.

<i>Cantidad</i>	<i>Factor de conversión</i>
1 ER	=1 µg de <i>trans</i> -retinol =6 µg de <i>trans</i> -β-caroteno =12 µg de otras provitaminas A (carotenoides) =3.33 UI de vitamina A =10 UI de provitamina A (carotenoides)
1 UI de vitamina A	=0.3 µg de <i>trans</i> -retinol =0.3 ER =3 UI de provitamina A =1.8 µg de <i>trans</i> -β-caroteno =3.6 µg de otras provitaminas A
1 UI de provitamina A (carotenoides)	=0.6 µg de <i>trans</i> -β-caroteno =0.1 ER =0.33 UI de vitamina A =1.2 µg de otras provitaminas A
Retinol y β-caroteno en µg Retinol y β-caroteno en UI β-caroteno y otras provitaminas A en µg	ER=µg retinol+(µg β-caroteno/6) ER= (UI de retinol/0.33)+(UI de β-caroteno/10) ER=(µg β-caroteno/6)+(µg de otras provitaminas A/12)

Tabla 6. Requerimientos Nutrimientales de Vitamina A en México (2000).*

<i>Edad</i>	<i>Vitamina A en µg de ER</i>
Niños	
0-3 meses	400
3-6 meses	400
6-12 meses	400
1-3 años	400
3-7 años	500
7-10 años	700
Adultos	
Hombres	1,000
Mujeres:	1,000
-Embarazadas	1,000
-Lactancia	1,300

*Fuente: Babinsky, V Bourges, H.. Morales, J. *Tabla de Composición de Alimentos Mexicanos*, INN Salvador Zubirán, p.228.

“Toxicidad”

La toxicidad de la vitamina A es atribuible a dos cosas, a un consumo de grandes dosis de vitamina A en un periodo corto de tiempo o a una ingesta crónica (consumo moderado de grandes dosis de vitamina A en forma frecuente por periodos mensuales o anuales). La toxicidad en humanos es reportada para dosis de 300,000 a 10,000,000 ER, las dosis crónicas se estiman en 15,000-300,000 ER las cuales producen hipervitaminosis A. Los síntomas de hipervitaminosis incluyen dolor de cabeza, vómito, diplopia, alopecia, secado de las membranas mucosas, descamación, anormalidades óseas y daño hepático. Cabe mencionar que dosis masivas de β -caroteno no son tóxicas pues son menos eficientemente absorbidas que la vitamina A.

Los efectos tóxicos de grandes consumos de vitamina A son medidos por los ésteres de retinilo séricos, las concentraciones de RBP son mantenidas a los niveles normales de hipervitaminosis A, pero cuando los niveles de ésteres de retinilo se muestran marcadamente elevados, se bloquea el control homeostático del transporte de la vitamina A.

Las más trágicas consecuencias de un consumo excesivo de vitamina A son los efectos teratogénicos (malformaciones craneales, de la cara, corazón, timo y sistema nervioso central en el embrión) y embriotoxicidad, ya que los altos niveles séricos de esta vitamina traspasan rápidamente la placenta, al igual que un aumento de ácidos retinóicos séricos. Aunque grandes ingestas de vitamina A (mayor a 7,500 ER en mujeres embarazadas) pueden causar defectos de nacimiento (posiblemente como resultado del metabolismo de retinol a ácido retinóico), las concentraciones de retinol y ésteres de retinol sérico se mantienen normalmente a niveles moderados durante la gestación. Los efectos teratogénicos están relacionados con la diferenciación celular y son mediados vía receptores nucleicos proteínicos. En vista de que los efectos teratogénicos ocurren cuando se consume diez veces la adecuada ingesta recomendada inclusive dosis menores, muchas organizaciones profesionales consensaron las dosis adecuadas de suplementos de vitamina A durante el primer trimestre de embarazo los cuales están limitados a 1,500-3,000 ER /día.

Aún en la actualidad siguen las investigaciones sobre la vitamina A, que incluye lo siguiente: (1) desarrollo y confirmación del estado de la vitamina A en el cuerpo humano; (2) elucidación del mecanismo de control de la concentración de RBP sérico; (3) la determinación más exacta de los requerimientos de vitamina A para funciones más específicas (no sólo crecimiento y prevención de la ceguera, si no que también funciones inmunológicas y diferenciación celular en cada tejido) y (4) definición de la función de la vitamina A en la

diferenciación en tejidos específicos para estudiar como se puede prevenir el cáncer así como enfermedades dermatológicas.

ANÁLISIS DE VITAMINA “A” POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA^{3, 7, 11, 12, 13}

La detección del retinol es relativamente fácil por su gran cantidad de dobles enlaces conjugados, lo cual proporciona un intenso grupo cromóforo en la región del UV cercano. Por lo tanto la sensibilidad y selectividad del análisis espectral es consecuentemente eficaz. Igualmente el retinol exhibe una fuerte fluorescencia lo que permite una buena selectividad, ventaja que reduce la necesidad de una purificación.

Sin embargo, se ha incrementado el estudio de la vitamina A en alimentos a través de la cromatografía, en particular para diferenciar los retinoides activos. Muchas variantes de cromatografía han sido utilizadas para separar y cuantificar a los retinoides. Para este caso se planteó la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE por sus siglas en español) que fue la utilizada.

El uso de la técnica de CLAE ha sido utilizado para el estudio de la vitamina A los últimos 20 años y esta técnica ha sido responsable del amplio conocimiento que se ha tenido sobre esta vitamina.

Como es una técnica de separación no destructiva, facilita su rápido análisis con una mínima preparación de las muestras.

Como la isomerización puede ser un fenómeno común durante la producción de alimentos que contienen carotenoides o retinoides, la diferenciación *cis* y *trans* puede ser requerida. En adición, los productos de oxidación tal como los oxiretinoides, epoxiretinoides y sus productos de fragmentación pueden existir en muchas muestras de alimentos. Todos estos compuestos poseen una pobre actividad como vitamina A y pueden distorsionar las medidas no cromatográficas.

En la literatura⁷, se menciona que es posible la determinación de isómeros y ésteres de retinol, el 3-dehidroretinol, retinal y el ácido retinoico en una amplia variedad de alimentos por CLAE. Esos análisis son frecuentemente realizados utilizando una fase normal (fase estacionaria polar) o una fase inversa (fase estacionaria no polar) frecuentemente a través de una técnica de elución isocrática.

Generalmente, la fase normal es eficiente para las separaciones isoméricas, y los ésteres de retinol son resueltos de mejor manera por una fase inversa, aunque cabe mencionar que la estimación de retinal y ácido retinoico no son frecuentemente llevadas a cabo en los alimentos, ya que la contribución de vitamina A es pobre comparado con el retinol. Así el retinol y sus ésteres son generalmente los retinoides de mayor interés durante el análisis de rutina de los alimentos.

La información específica que proporciona la técnica de CLAE en el análisis de vitamina A proporciona detalles numerosos sobre esta vitamina. Sin embargo, hay muchas características comunes en varios esquemas, como la detección por espectroscopia UV y espectroscopia fluorescente.

Las separaciones por fase normal son generalmente realizadas en columnas con partículas de sílica de 5-10 μm , reemplazando el uso de otros adsorbentes tal como la alumina, florisil, etc.

Los grupos amino, ciano y diol son enlazados a la sílica algunas veces para evitar los problemas asociados con la humedad que puede presentarse en la sílica. El componente primario de la fase móvil es un hidrocarburo en combinación con un compuesto orgánico polar modificado.

Para análisis de retinol por cromatografía en fase normal se utiliza como fase estacionaria varios soportes de sílica, como se muestra en la *tabla 7*.

En las separaciones a través de fase inversa son usualmente realizadas con columnas de C18 (octadecil) aunque a veces se utilizan otros derivados hidrofóbicos (C2, C8 y fenil). La fase móvil es frecuentemente una combinación binaria de metanol y agua, aunque en algunos casos puede ser completamente no acuosa.

En la *tabla 8* se presentan algunas condiciones que se han utilizado en forma más usual para la determinación de vitamina A como retinol u otros retinoides por cromatografía de fase inversa.

Tabla 7. Condiciones de análisis por Cromatografía de Líquidos en fase normal para la separación de retinol en diversos tipos de muestras.

<i>Compuesto</i>	<i>Fase estacionaria</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Muestra</i>	<i>Límite de detección</i>	<i>Referencia</i>
Retinol	Micropak Si 10, 10 μ m	Éter de petróleo-diclorometano-isopropanol (80:19.3:0.7)	Suero (100 μ L)	50ng/mL	1
Retinol	Lichrosorb Si 60, 7 μ m	n-hexano-diclorometano-isopropanol (90:9:1)	Suero	15ng	2
Retinol	RSIL Sílica, 5 μ m	n-hexano-isopropanol (99.75:0.25)	Cuerpo lúteo	-	3
	RSIL Sílica, 5 μ m	n-hexano-diclorometano-isopropanol (200:50:1.75)	Cuerpo lúteo	-	3

1. De Ruyter, H. De Leenheer, A. *Clin. Chem.* 22 (1976): 1593-1595
2. Fankel, R. *Mikrochim. Acta.* 1 (1978): 359-361
3. De Leenheer, A. *Experiencia.* 36 (1950): 31-33

Tabla 8. Condiciones de análisis por Cromatografía de Líquidos en fase inversa para la separación de retinol en diversos tipos de muestras.

<i>Compuesto</i>	<i>Fase estacionaria</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Muestra</i>	<i>Límite de detección</i>	<i>Referencia</i>
Retinol	RSIL C ₁₈ HL 10 μ m	Metanol	Suero (100 μ L)	60ng/mL	1
Retinol	Kieselgel ODS C ₁₈ 100 μ m	Metanol-1% solución carbonatada de amonio (95:5)	Farmacéutico		2
Retinol	Permaphase ODS	Isopropanol-etanol-agua (56:16:28)	Suero		3

1. De Loenher, A. De Bever, V. et. al *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 162 (1979): 408-413
2. Ranfft, K. Ruckemann, H. Z. *Lebensm. Unters. Forsch.* 166 (1978): 13-14
3. Parris, N. *J. Chromatogr.* 157 (1978): 1161-1170

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA^{14, 15, 16}

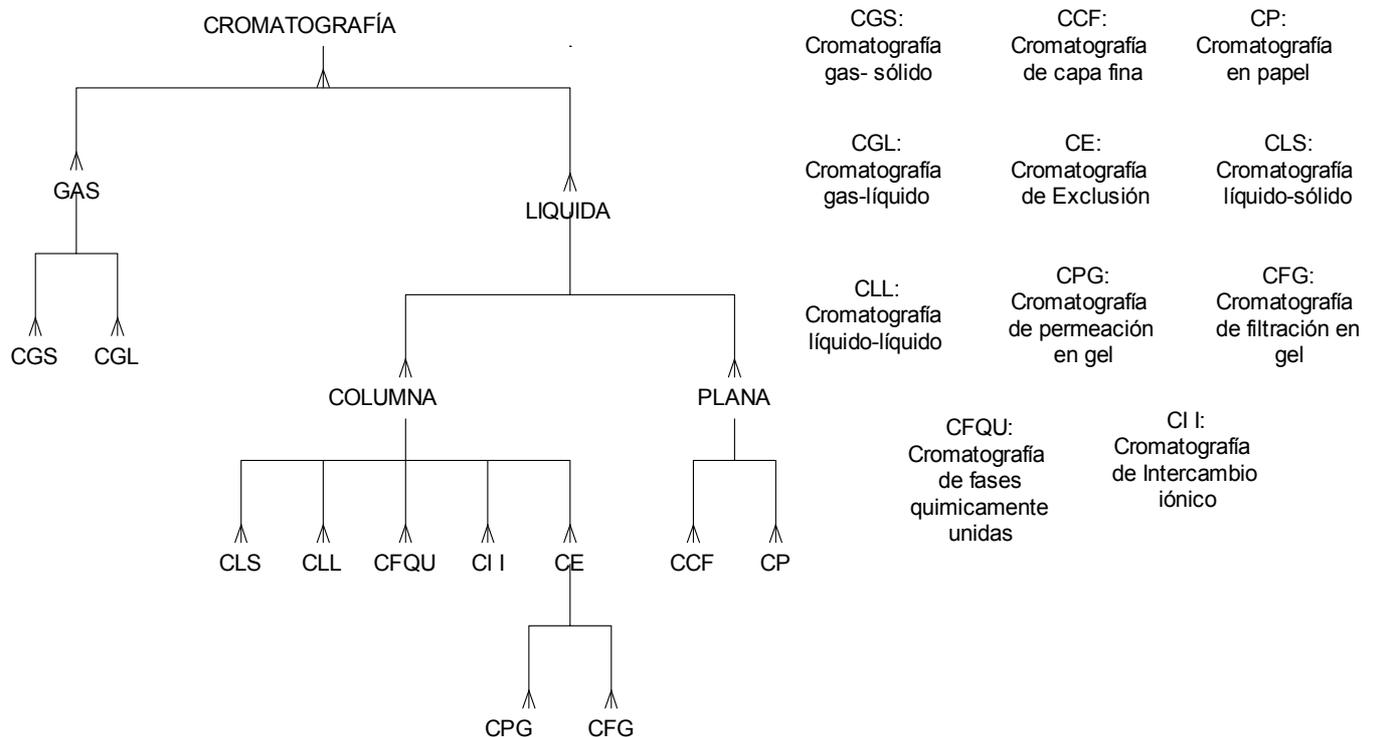
***Definición de cromatografía.**

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra se distribuye entre dos fases: una fase estacionaria y otra móvil de tal manera que la separación de los compuestos

químicos está en función de su interacción (equilibrio) con la fase móvil y la fase estacionaria, siendo retenidos de manera selectiva en la fase estacionaria. Por todo lo anterior la cromatografía puede definirse como una técnica de separación fisicoquímica.

*Clasificación de la Técnica Cromatográfica.

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía como se muestra en el siguiente diagrama:



En este caso; el tipo de cromatografía utilizada fue la cromatografía de líquidos instrumental, la cual recibe los siguientes nombres en español:

- Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE por sus siglas en español)
- Cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP por sus siglas en español)
- Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR por sus siglas en español)

Por su nombre en inglés es comúnmente conocida como High Performance Liquid Chromatographic (HPLC por sus siglas en inglés).

Como es posible observar, existen diversos tipos cromatográficos pero en este caso nos ocuparemos de describir la cromatografía de líquidos con fases químicamente unidas, ya que es el tipo de cromatografía que se ocupó para el desarrollo experimental de esta tesis.

***Tipos de aplicación de la CLAE.**

Dependiendo de la polaridad relativa de las dos fases de trabajo, se pueden tener dos tipos de cromatografía: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa.

- a) Cromatografía de fase normal: La fase estacionaria se caracteriza por tener una naturaleza polar (por ejemplo, sílica-gel) y la fase móvil se caracteriza por ser no polar (por ejemplo, n-hexano o tetrahidrofurano).
- b) Cromatografía de fase inversa: Se caracteriza por tener una fase estacionaria de naturaleza no polar (hidrofóbica) y la fase móvil es un líquido con característica polar.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se caracteriza por:

- Tener columnas con diámetros pequeños (2-5 mm).
- Que el empaqueo de la columna posea partículas con un diámetro muy pequeño (3, 5 y 10 μm).
- Manejar presiones relativamente altas: presiones de más de 6,000 psi (lb/pulg²).
- La introducción precisa de muestras sin la necesidad de utilizar grandes cantidades.
- Utilizar instrumentos estandarizados y automatizados.
- Llevar a cabo un rápido análisis.
- Tener una alta resolución.

Inicialmente, la presión fue seleccionada como el principal criterio en la cromatografía de líquidos moderna de ahí el nombre de “Cromatografía de Líquidos de Alta Presión”, lo que parece indicar que la alta eficiencia de esta técnica es principalmente debido al manejo de altas presiones. Esto último, sin embargo, no es verdad, ya que la gran eficiencia de la cromatografía de líquidos en conjunto es el resultado de muchos otros factores a la par que del manejo de altas presiones; por el uso de empaques de columna de partículas con diámetros muy pequeños y tamaño de poros uniformes, además de que dichas partículas poseen un intervalo de distribución muy preciso, por utilizar bajos volúmenes de muestra, por poseer un buen sistema de bombeo y detectores de gran sensibilidad.

Cabe mencionar, que la presión es parte intrínseca del sistema que se trabaja y el conocerla permite saber si el sistema cromatográfico se encuentra estable para trabajar a los flujos marcados.

***Fase estacionaria (Adsorbentes).**

Las separaciones por cromatografía de líquidos de alta eficiencia están basadas en las interacciones de las moléculas de analito en la superficie de la fase estacionaria y dependen de los tipos de sitios de adsorción (superficie química).

Las fases estacionarias más modernas para la CLAE poseen pequeñas partículas rígidamente empacadas con una gran área superficial.

Los parámetros deseados para los adsorbentes son:

- Tamaño de partícula: 3 a 10 μm .
- Tamaño de poro: 70 a 300 Å .
- Área de la superficie: 50 a 250 m^2/g .
- Densidad de la fase estacionaria (número de sitios de adsorción por unidad de superficie) de 1 a 5 por nm^2 .

Cabe mencionar, que la inmensa mayoría de los adsorbentes tienen como cuerpo general de su estructura base sílice. Los modelos actuales del proceso de adsorción suponen que los sitios de adsorción se encuentran completamente cubiertos ya sea por las moléculas del soluto o las del disolvente. Las moléculas del soluto o del disolvente se adsorben preferencialmente dependiendo de su fuerza relativa en esta interacción competitiva. La competencia entre la molécula del soluto y la de la fase móvil por un sitio activo proporciona la fuerza motriz y la selectividad de las separaciones. Cabe mencionar que la interacción entre una molécula de soluto y la superficie adsorbente es mejor cuando los grupos funcionales se traslapan sobre los sitios de adsorción.

***Mecanismos de retención.**

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se caracteriza por ser un proceso dinámico de adsorción. Las moléculas de analito que se mueven a través de los poros del material de empaque (fase estacionaria) tienden a interactuar con los sitios de adsorción de la superficie. Dependiendo del tipo de cromatografía de líquidos, se pueden mencionar diferentes tipos de fuerzas de adsorción en el proceso de retención de los analitos:

-Interacciones hidrofóbicas que se dan sobre todo cuando se utiliza la cromatografía de fase inversa.

-Interacciones dipolo-dipolo que dominan en la cromatografía de fase normal.

-Interacciones iónicas que son las responsables de la retención en la cromatografía de intercambio iónico.

Todas estas interacciones son competitivas, las moléculas de analito compiten con las moléculas del eluyente (fase móvil) por los sitios de adsorción en la fase estacionaria. Por ello, las interacciones de las moléculas del analito con la fase estacionaria son fuertes y la interacción de las moléculas del eluyente son débiles, por ello gran cantidad de analito puede ser retenida en la superficie.

La cromatografía de exclusión es un caso especial. La separación de los componentes de la mezcla está basada en el peso molecular de cada uno de ellos, por ello las moléculas de eluyente pueden tener una interacción más fuerte con la superficie de la fase estacionaria en comparación con las moléculas de analito, así el principio básico de separación de esta técnica es que las moléculas de analito de mayor peso molecular tendrán menos posibilidad de penetrar en el interior del poro de la fase estacionaria por ello esas moléculas serán menos retenidas que aquellas que posean un peso molecular más bajo.

***Cromatografía de líquidos con fases químicamente unidas.**

Preparación de soportes con fase químicamente unida.

Los soportes con fase químicamente unida se preparan uniéndose covalentemente a la superficie de la sílice (es común que las fases estacionarias sean elaboradas con este material) una especie orgánica de hidrocarburo. El enlace de tipo siloxano (-Si-O-Si-C-) se ha convertido en el estándar de las fases químicamente unidas comerciales. Se forma por las reacciones de alcoxilanos con los grupos superficiales silanol de la fase estacionaria. Las fases enlazadas de este tipo son estables a la hidrólisis en un intervalo de pH de 2 a 7.5, ya que por debajo de pH 2 el enlace tipo siloxano es susceptible a ruptura y por arriba de 7.5 la sílice es susceptible a la disolución en solución acuosa.

La reacción general es:



Las partículas de sílice generalmente tienen un tamaño que abarca el intervalo de 5 a 100 micrones, además las partículas son más bien de forma irregular que esférica, estas

características permiten que la fase móvil fluya rápidamente a través de esta fase. La porosidad nominal de estas partículas es de 60-100 Ångstroms.

La falta de mojado causa una eficiencia pobre, presentándose adsorción en la entrecara sorbente-disolvente.

Por razones estéricas, no es posible que todos los grupos silanol reaccionen durante el enlazado químico así la superficie de sílice está constituida por una mezcla de silanoles y cadenas hidrofóbicas.

Grupos funcionales en los soportes con fase químicamente unida.

Si se varía la naturaleza de la porción orgánica del silanol enlazado, la superficie del soporte con fase enlazada puede variarse desde una esencialmente hidrofóbica, que consiste en una capa hidrocarbonácea hasta una con diversos grupos funcionales colocados en el extremo de afuera de la parte de hidrocarburo. Los grupos funcionales más comunes son:

- Hidrocarburos de cadena lineal: normalmente es el grupo etilo (C-2), octilo (C-8) u octadecilo (C-18) de naturaleza no polar.
- Grupos nitrilo: Como el grupo cianoetilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$) de polaridad intermedia.
- Grupos aminoalquilo para superficies altamente polares.
- Grupo fenilsilano.

***Instrumentación.**

La instrumentación de la CLAE incluye:



- ***Fuente de fase móvil***
- ***Sistema de bombeo***

- *Sistema de inyección*
- *Sistema de separación*
- *Sistema de detección*
- *Sistema de registro*

Fuente de fase móvil

El tipo más común de fuente de fase móvil es un frasco de vidrio, aunque se pueden utilizar recipientes de acero inoxidable o plástico inertes, todos de una capacidad entre 1 y 3 L ya que en la mayoría de los casos es suficiente volumen para un día de operación. Muchos fabricantes adicionan a esos frascos de vidrio capuchones especiales de teflón conectados a la entrada del sistema de bombeo y al tanque de gas de purga (helio comúnmente) para remover el aire disuelto en la fase móvil.



En general las fases móviles con ninguna o muy poca polaridad se utilizan con las fases químicamente unidas polares (por ejemplo: hexano, ciclohexano, disulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y benceno). Las fases móviles para las fases químicamente unidas no polares se seleccionan de entre los disolventes con polaridades altas (por ejemplo: agua, metanol, propanol y acetonitrilo).

Cabe mencionar, que la polaridad de la fase móvil no refleja con gran exactitud la fuerza de solvatación para todos los solutos. Esto último se da porque la fuerza de la fase móvil es el total de todos los tipos de interacciones que actúan simultáneamente (interacciones dipolo-dipolo, fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrógeno, etc.). La fuerza (poder de elución) de la fase móvil es alta cuando existe una buena interacción entre la fase móvil y el soluto.

Se pueden realizar dos tipos de elución dependiendo de la aplicación del poder de elución de la fase móvil:

- a) Isocrática: El poder de elución se mantiene constante durante el tiempo que dura la corrida, en la práctica la composición de la fase móvil permanece constante durante todo el tiempo de análisis.
- b) Gradiente de elución: En este caso el poder de elución varía con el tiempo en que dura la corrida, en la práctica la composición de la fase móvil es cambiada durante el tiempo de análisis, siempre de bajo poder de elución a mayor poder de elución.

La composición de la fase móvil es una de las variables que influyen en la separación, existe una gran cantidad de solventes y mezclas de solventes utilizadas en la CLAE las cuales deben cumplir con las siguientes propiedades:

- Alta pureza.
- Deben solubilizar la muestra.
- Baja viscosidad.
- Químicamente inertes.
- Debe ser compatible con el detector empleado.
- Precio razonable.

Cada modo de trabajo de la CLAE tiene sus propios requerimientos. Para la fase normal se utilizan solventes principalmente no polares (entre los más comunes está el hexano, cloruro de metileno, cloroformo y tetrahidrofurano), para la fase inversa la fase móvil es usualmente una mezcla de agua con algunos solventes orgánicos polares (tal como el acetonitrilo, isopropanol, metanol y agua).

Sistema de bombeo

Las bombas de alta presión son necesarias para introducir a la fase móvil a través de la fase estacionaria (que se encuentra como pequeñas partículas empacadas, lo cual hace que la resistencia al flujo sea muy elevada). La estabilidad del tiempo de flujo es otra importante función que deben desempeñar las bombas, aunque una gran estabilidad de tiempo de flujo no es esencial para la cromatografía analítica, aunque deben permitir que el flujo de la fase móvil sea razonable para que el análisis no sea excesivamente lento.

Ahora, es posible encontrar bombas de control electrónico externo, siendo una característica deseable cuando se trabaja con la técnica de elución por gradiente, sin embargo esta característica no es necesaria cuando se trabaja por la técnica de elución isocrática.

Las bombas modernas cumplen los siguientes parámetros:

- Intervalo de tiempo de flujo: 0.01 a 10 mL/min.
- Estabilidad del tiempo de flujo (reproducibilidad y constancia): no más del 1%.
- Presión máxima: hasta 400 atm.
- Resistencia a líquidos corrosivos y facilidad de limpieza.
- Flujos continuos (no pulsados).

De acuerdo a las características de funcionamiento y diseño se tienen dos tipos de bombas:

1. Bombas mecánicas.
2. Bombas neumáticas.

A su vez, las bombas mecánicas se dividen en dos tipos:

1. Bombas recíprocas (piston o diafragma).
2. Bombas de desplazamiento continuo.

Las bombas recíprocas desplazan flujos de volumen constante en forma pulsante, la máxima presión que se obtiene es de aproximadamente 600 atm. La forma en la que operan consiste en el movimiento de un pistón o diafragma y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, se llena y vacía, de modo alternativo en una pequeña cámara. El volumen que envía la bomba en cada pulso se ajusta variando la distancia a la que se desplaza el pistón o diafragma; el flujo total se ajusta variando el número de desplazamientos por unidad de tiempo.

La desventaja de este tipo de bombas es que el flujo se obtiene como pulsos y no en forma continua lo que puede ocasionar pérdida de la eficacia de la columna e inestabilidad del detector; aunque esto se corrige mediante un sistema amortiguador.

La principal ventaja es el flujo a volumen constante lo que trae como consecuencia una capacidad de alimentar de modo continuo al sistema. Hay que mencionar que este tipo de bomba fue la que se utilizó para la realización de este trabajo.



Las bombas de desplazamiento continuo son aquellas en las que un pistón o émbolo es desplazado en forma continua por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de cierto volumen; así el líquido fluye a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según como se desplace el émbolo. Por las características anteriores el flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo aunque la desventaja es que la capacidad de la bomba es limitada y para rellenar la cámara es necesario suspender momentáneamente la operación de la bomba.

En las bombas neumáticas, el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o sobre el recipiente comprimible que lo contiene. La ventaja de este tipo de bombas, es que se obtienen flujos libres de pulsaciones y de presión constante, las desventajas son que la presión máxima obtenible está limitada por la presión del gas mismo y por el material de fabricación del sistema; además poseen una capacidad limitada en el volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido.

Sistema de inyección

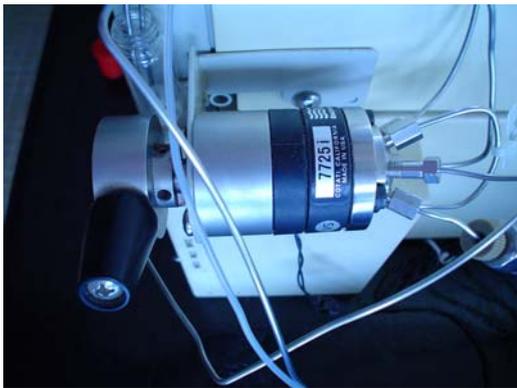
La introducción de muestra al sistema puede realizarse de varias formas. El método más común es a través de una válvula de inyección. En los cromatógrafos de líquidos más sofisticados, la incorporación de la muestra se realiza a través de inyectores automáticos y microprocesadores.

En cromatografía de líquidos, las muestras líquidas pueden ser inyectadas directamente (aunque normalmente éstas son diluidas) y las muestras sólidas y semisólidas necesitan disolverse en un disolvente apropiado que no precisamente debe ser la fase móvil, aunque frecuentemente es escogido alguno de los disolventes que forme ésta para evitar interferencias en el detector o en la columna. Para evitar interferencias se deben remover las

partículas que presente la muestra a inyectar a través de un filtrado o centrifugado, ya que continuas inyecciones con muestras sucias pueden causar eventualmente un bloqueo en el inyector o bien en la columna.

La cantidad de muestra a inyectar puede variar, aunque por la frecuente gran sensibilidad de los detectores se utilizan poca muestra obteniendo una gran resolución.

En este caso, se explicará la introducción de la muestra a través de una válvula inyectora ya que es el sistema que presenta el cromatógrafo de líquidos utilizado en este trabajo.



En las válvulas inyectoras, la muestra se introduce mediante una jeringa que desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar de acero (usualmente el volumen contenido en el tubo es de 10 a 50 μL). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se invierte.

Sistema de separación

El sistema de separación es representado por la columna que contiene dentro de ella a la fase estacionaria (las cuáles ya se explicaron en la parte de fase estacionaria de este capítulo). Las columnas más comunes para cromatografía de líquidos son de 10, 15 y 25 cm de longitud y son llenadas con partículas de un diámetro extremadamente pequeño: 3, 5 ó 10 μm . El diámetro interno de las columnas es usualmente de 4 a 4.6 mm, estas características son consideradas como las más comprometidas entre el volumen de muestra que pasa por la columna, (capacidad de la columna) el consumo de fase móvil, velocidad y resolución. Sin embargo, si son colectadas sustancias puras (escala preparativa), un diámetro interno de columna más grande es necesario.



El empacado de la columna con partículas de diámetro muy pequeño requiere de una gran habilidad y un equipo muy especializado. Por esta razón es generalmente recomendado que un personal con gran experiencia en cromatografía prepare la columna. En general, las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos son bastante durables, a menos que se utilicen de una manera intrínsecamente destructiva, como por ejemplo: eluyentes demasiado ácidos o básicos, o continuas inyecciones de material sucio.

Sistema de detección

El sistema de detección es representado por el detector. Los detectores espectroscópicos son los más usados en forma frecuente en cromatografía de líquidos. Estos detectores, transmiten un haz de luz a través de la fase móvil que sale de la columna y pasa a su vez (en un volumen muy pequeño) a través de una celda. Las variaciones en la intensidad de luz causadas por la absorción en la región ultravioleta y visible (UV-Vis), o la emisión de la fluorescencia en esa región, o el cambio en el índice de refracción (fenómenos más utilizados dependiendo del tipo de detector) de los componentes de la muestra o la fase móvil que pasan a través de la celda, dónde dichos cambios son monitoreados y cambiados normalmente a propiedades eléctricas, estas propiedades eléctricas son registrados en un integrador o computadora (sistema de registro) y transformados en señales dando como resultado un cromatograma.

El tipo de detector más utilizado en cromatografía de líquidos es el detector de absorción UV-Vis.

Otros detectores de uso común son los de: Índice de refracción (IR), fluorescencia (FL), electroquímicos (EC) y de espectrometría de masas (EM). El detector IR es de tipo universal pero es poco sensitivo. Los detectores de FL y EC son bastante sensitivos (detectan por arriba de 10-15 moles de muestra) pero también son bastante selectivos. El detector de EM es más poderoso pero también es más complicado y más caro.

De acuerdo con lo anteriormente discutido se tiene los detectores más comunes para la CLAE:

-Propiedades espectroscópicas:

- Índice de Refracción.
- UV / Visible:
 - Longitud de onda fija.
 - Longitud de onda variable.
 - Arreglo de diodos.
- Fluorescencia.
- Espectrometría de masas CL/EM (sistema acoplado).

-Propiedades electroquímicas:

- Conductimétricos.
- Potenciométricos.
- Amperométricos.

Un detector ideal para cromatografía de líquidos debe de cumplir con las siguientes propiedades:

- ▲ Alta sensibilidad.
- ▲ Rápida respuesta.
- ▲ Alta linealidad (esto simplifica la cuantificación).
- ▲ Insensible a cambios de tipo de disolvente, flujo y temperatura.
- ▲ No destructivo.
- ▲ Capaz de detectar diferentes compuestos.

En este apartado se explicarán los principios del detector de UV / Visible, ya que es el que se utilizó para el desarrollo experimental de esta tesis.

Detector espectroscópico UV / Visible

-Principio

Algunos compuestos químicos tienen la capacidad de interactuar con radiación electromagnética de la región UV-Vis. La radiación electromagnética pasa a través de la celda del detector experimentando cambios en su intensidad debido a la interacción de aquellos

componentes que interactúen con dicha radiación. La medición de los cambios en la intensidad de la radiación son la base del detector de UV / Visible.

La absorción de la radiación depende de las longitudes de onda que la conforman y de los grupos funcionales del compuesto químico. El campo electromagnético dependiendo de su energía (frecuencia) puede interactuar con los electrones causando su excitación y transferencia a un nivel energético mucho mayor o puede excitar los electrones de enlace de las moléculas y causar la vibración o rotación de un grupo funcional. La intensidad de la luz por la energía correspondiente de las diferentes transiciones puede ir en decremento al pasar a través de la celda del detector. De acuerdo a la ley de Lambert-Beer la absorbancia de la radiación es proporcional a la concentración del compuesto en la celda y a la longitud de la misma.

La región de trabajo de la espectroscopia UV / Vis es:

Visible	400-800 nm
Ultravioleta	190-400 nm

La región de UV y del visible del espectro electromagnético corresponden a la excitación de los electrones de relativa baja energía tal como los electrones tipo π o los electrones no apareados de algún grupo funcional, los electrones tipo σ requieren de una radiación de mayor energía para poder ser excitados y mostrar absorción de la radiación.

El cromatograma representa la señal del detector, que de manera general es proporcional a la concentración del analito en la celda.

En el detector de UV / Visible los intervalos de medición se expresan en unidades de absorbancia (AU por sus siglas en inglés de *Absorbance Units*). Una unidad de absorbancia corresponde a la depreciación de la intensidad de luz por 90% de la luz incidente.

El término de coeficiente de absortividad molar (también llamado coeficiente de extinción molar), corresponde a la absorbancia de una concentración molar de la sustancia en una trayectoria de 1 cm de longitud. El coeficiente de absortividad molar es dependiente de la longitud de onda y de las condiciones cromatográficas de trabajo (tipo de fase móvil, pH y temperatura), así el coeficiente de absorción molar es específico para cada sustancia en una longitud de onda. El conocimiento del valor de este término para cada sustancia es importante; porque indica la longitud de onda que debe ser seleccionada para obtener la máxima respuesta.

-Detector de UV / Visible de onda fija

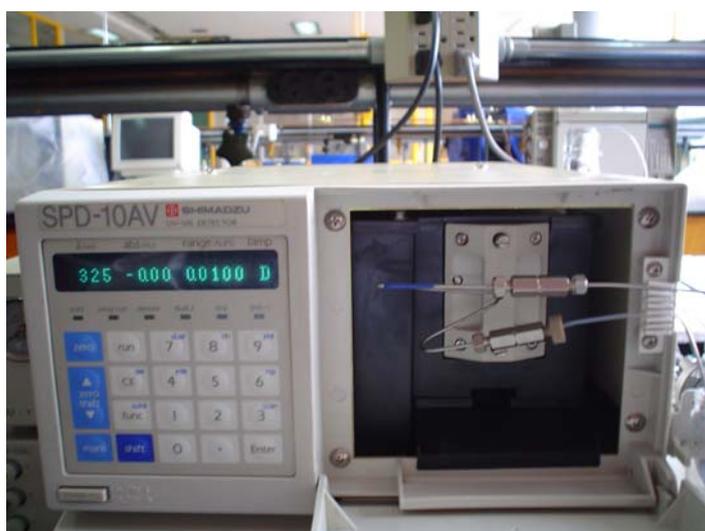
Este tipo de detectores no permite el cambio de la longitud de onda de la radiación durante un análisis, de ahí su nombre de detector de UV / Visible de onda fija. Estos detectores, son usualmente muy baratos, ya es poco común encontrar este tipo de detector en los instrumentos actuales.

En este tipo de detector, se tiene una lámpara de vapor de mercurio a baja presión que emite comúnmente una luz intensa a 254 nm a través de un filtro. Cabe mencionar que existen filtros para ser utilizados en otras longitudes de onda, aunque la longitud de 254 nm es la más estable, pues los detectores de UV / Visible son altamente sensibles a esta longitud, siendo capaces de medir cantidades por abajo del orden de los nanogramos de algunas sustancias que poseen en su estructura anillos aromáticos. La longitud de onda de 254 nm es estable debido a que la línea de luz más intensa de la lámpara de mercurio es a 254 nm, además la mayoría de los compuestos que absorben en la región ultravioleta se detectan bien a 254 nm.

-Detector de UV / Visible de longitud de onda variable

Este tipo de detectores permite la selección de la longitud de onda a la que se va a trabajar, de ahí que sean llamados detectores de UV / Visible de longitud de onda variable. Este detector posee las siguientes particularidades:

- Ofrece mejor sensibilidad, si se selecciona apropiadamente la longitud de onda de trabajo.
- Generalmente, los componentes de una muestra problema absorben a diferentes longitudes de onda, por lo que la operación con un detector de longitud de onda variable aumenta la sensibilidad del sistema cromatográfico.



Dependiendo del grado de sofisticación del detector, el cambio de longitud de onda puede realizarse manualmente o a través de tiempos programados en la memoria del sistema.

-Detector de arreglo de diodos

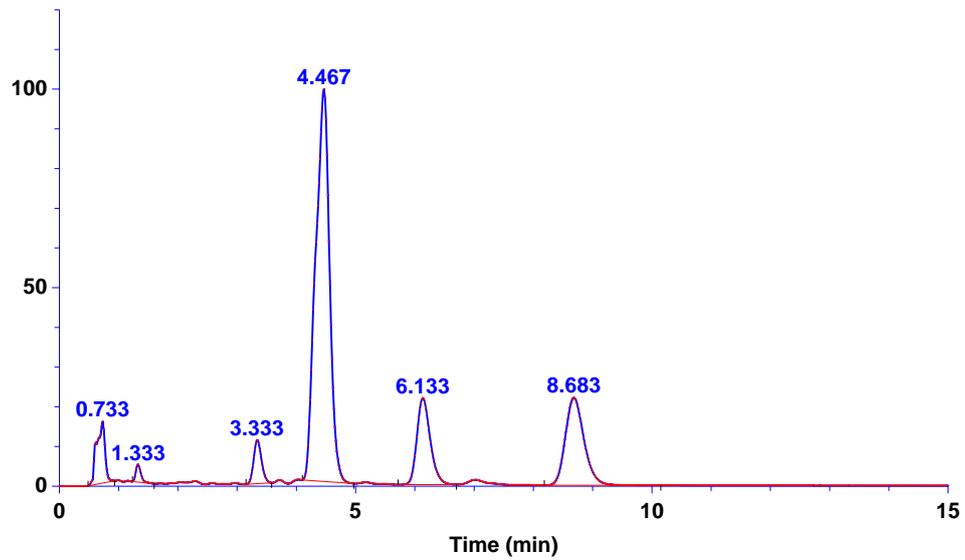
Como ya se mencionó, una característica especial de algunos detectores de longitud de onda variable es la habilidad de realizar una eficiente y precisa lectura espectroscópica de las absorbancias a una gran variedad de longitudes de onda. El detector de arreglo de diodos añade una nueva dimensión a la capacidad analítica de la cromatografía de líquidos porque permite obtener una mejor información cualitativa más allá de la simple identificación del tiempo de retención.

Este tipo de detector posee dos grandes ventajas: En primer lugar, permite una mejor selección de la longitud de onda de trabajo, esto es particularmente importante cuando no hay información disponible de las absorptividades molares a diferentes longitudes de onda de trabajo.

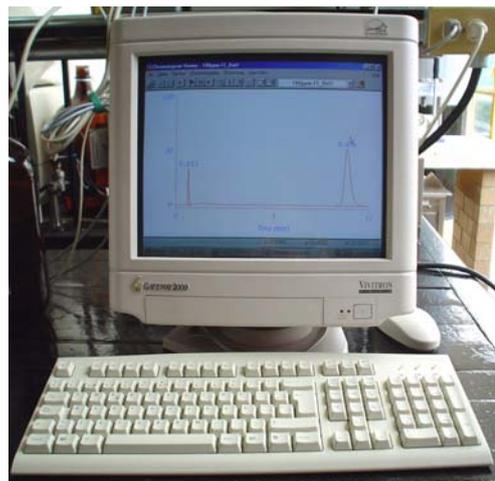
La segunda gran ventaja es la de una mejor relación del (los) analito(s) con el área del pico en el cromatograma. Con frecuencia, la forma del pico no revela si corresponde a uno o más de los analitos separados. En este caso el barrido a diferentes longitudes de onda ayuda particularmente a decidir si el pico representa un único analito o varios de ellos.

Sistema de registro

Al colocar un detector al final de la columna que responde a la concentración de soluto, se obtiene un gráfico de la señal generada en función del tiempo (o del volumen de la fase móvil adicionada), obteniéndose una serie de picos (que representan los perfiles de elución de los compuestos que forman la muestra) dicho gráfico se denomina “cromatograma”, y es útil para realizar análisis cualitativo y cuantitativo. Así la posición de los picos en el eje del tiempo se puede utilizar para identificar los componentes de la muestra y el área bajo los picos proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de cada especie.



Este gráfico se puede obtener por medio de integradores o computadoras que me permiten obtener información en cuanto a tiempos en los que eluyen los picos, sus áreas, alturas, anchos, etc., que permitirán la realización de los análisis cualitativo y cuantitativo.



CONSTANTE DE DISTRIBUCIÓN

Para que exista separación cromatográfica es necesario que exista una diferencia de la cantidad de la distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Para la especie A que es el soluto, el equilibrio implicado es:



y la constante de equilibrio de esta reacción se define como constante de distribución Kd:

$$K_d = [A]_e / [A]_m$$

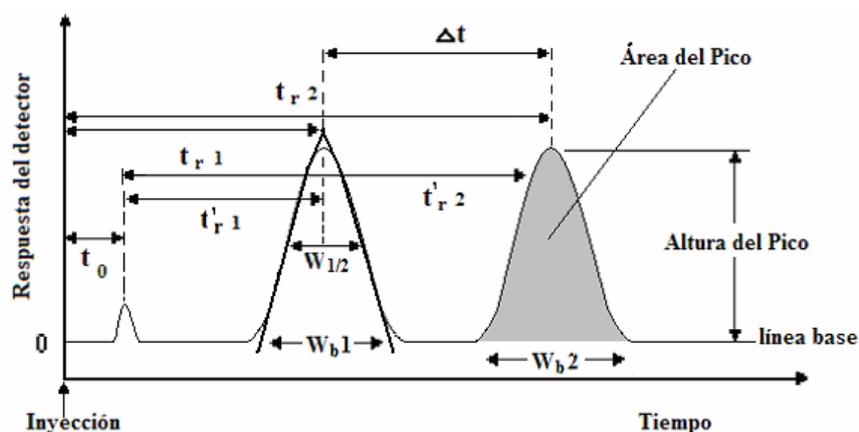
dónde:

[A]_e = Concentración del soluto A en la fase estacionaria.

[A]_m = Concentración del soluto A en la fase móvil.

TIEMPO DE RETENCIÓN Y TIEMPO MUERTO

En el siguiente cromatograma el pico más pequeño, corresponde a una especie que no es retenida por la fase estacionaria, éste me da el tiempo muerto t_0 que es el tiempo que transcurre de la inyección de la muestra hasta el detector, dando una idea del tiempo que los compuestos sólo pasan por el sistema sin interactuar con la fase estacionaria.



Ahora, observando la misma figura uno de los picos grandes corresponde a la presencia de un analito de la muestra, el tiempo necesario para que este pico llegue al detector (incluyendo ya su interacción con la fase estacionaria) después de la inyección de la muestra, se llama tiempo de retención y se representa como t_r , si suponemos que las condiciones de operación son constantes, el tiempo de retención será característico de una sustancia dada, pero no único, ya que no hay que olvidar que dos o más sustancias pueden tener un mismo tiempo de retención. Así, la forma de efectuar una identificación es comparando los tiempos

de retención de las sustancias por identificar con los tiempos de retención de las sustancias patrones, como posteriormente se explicará.

Hay diversas formas de evaluar los tiempos de retención que son más fáciles de reproducir que el tiempo de retención antes definido. En primer lugar se puede considerar el tiempo de retención corregido o ajustado tr' que es igual al tiempo de retención tr menos el tiempo muerto t_0 . Así:

$$tr' = tr - t_0$$

Otra forma para evaluar los tiempos de retención es por medio de los tiempos de retención relativos, que son el cociente obtenido de dividir el tiempo de retención corregido del compuesto analizado entre el tiempo de retención del compuesto patrón, que puede ser uno de los componentes de la muestra.

Cabe mencionar, que los tiempos de retención corregidos son más fáciles de reproducir que los relativos aunque estos últimos son más confiables.

EFICIENCIA

El cálculo de este parámetro me dice que tan bueno es el sistema para separar, ya que indica el número de platos teóricos, es decir el número de equilibrios que tiene en la fase estacionaria:

$$N = 16 (tr' / w_b) = 5.545 (tr' / w_{1/2h})^2 = 2\pi (tr / \text{área} / \text{altura})^2$$

La eficiencia también se puede definir por la altura equivalente de un plato teórico "H", que por definición:

$$H = L / N$$

dónde:

L = Longitud de la columna (generalmente en cm)

N = número de platos teóricos

La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos N y la altura del plato teórico H es menor.

FACTOR DE CAPACIDAD

Este factor se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en las columnas. Se define como la razón entre la cantidad de soluto en la fase estacionaria y la cantidad de soluto de la fase móvil:

$$k' = tr' / t_0$$

Se pueden variar los factores de capacidad en cromatografía al cambiar la temperatura, fase estacionaria y fase móvil. En la CLAE con frecuencia, pueden manipularse los factores de capacidad para obtener mejores separaciones, variando la composición de la fase móvil cuando ya se dejó fija la fase estacionaria.

SELECTIVIDAD

La selectividad de una fase estacionaria para dos solutos, A y B se define como:

$$\alpha = k'_B / k'_A = tr_B' / tr_A'$$

en dónde k'_B es el factor de capacidad de la especie retenida con más fuerza y k'_A es el factor de capacidad para la especie retenida con menos fuerza, es decir la especie A eluye más rápido que la B, de acuerdo con esta definición α siempre es mayor a la unidad.

En consecuencia con lo anterior, la selectividad para los solutos A y B se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza, A. Así, la selectividad para dos analitos en una columna proporciona una medida de que tan bien los separará la columna.

RESOLUCIÓN

La resolución (R_s) de una columna proporciona una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos(en este caso A y B). La resolución de cada columna queda definida como:

$$R_s = 2(tr_B - tr_A) / (w_B + w_A)$$

De acuerdo a la *figura 3* en una resolución de 1.5 se produce una separación de A y B prácticamente completa, mientras que no lo logra una resolución de 0.75, con una resolución de 1, la zona A contiene alrededor de 4% de B y la zona B igual porcentaje de A.

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa el número de platos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir más platos es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes.

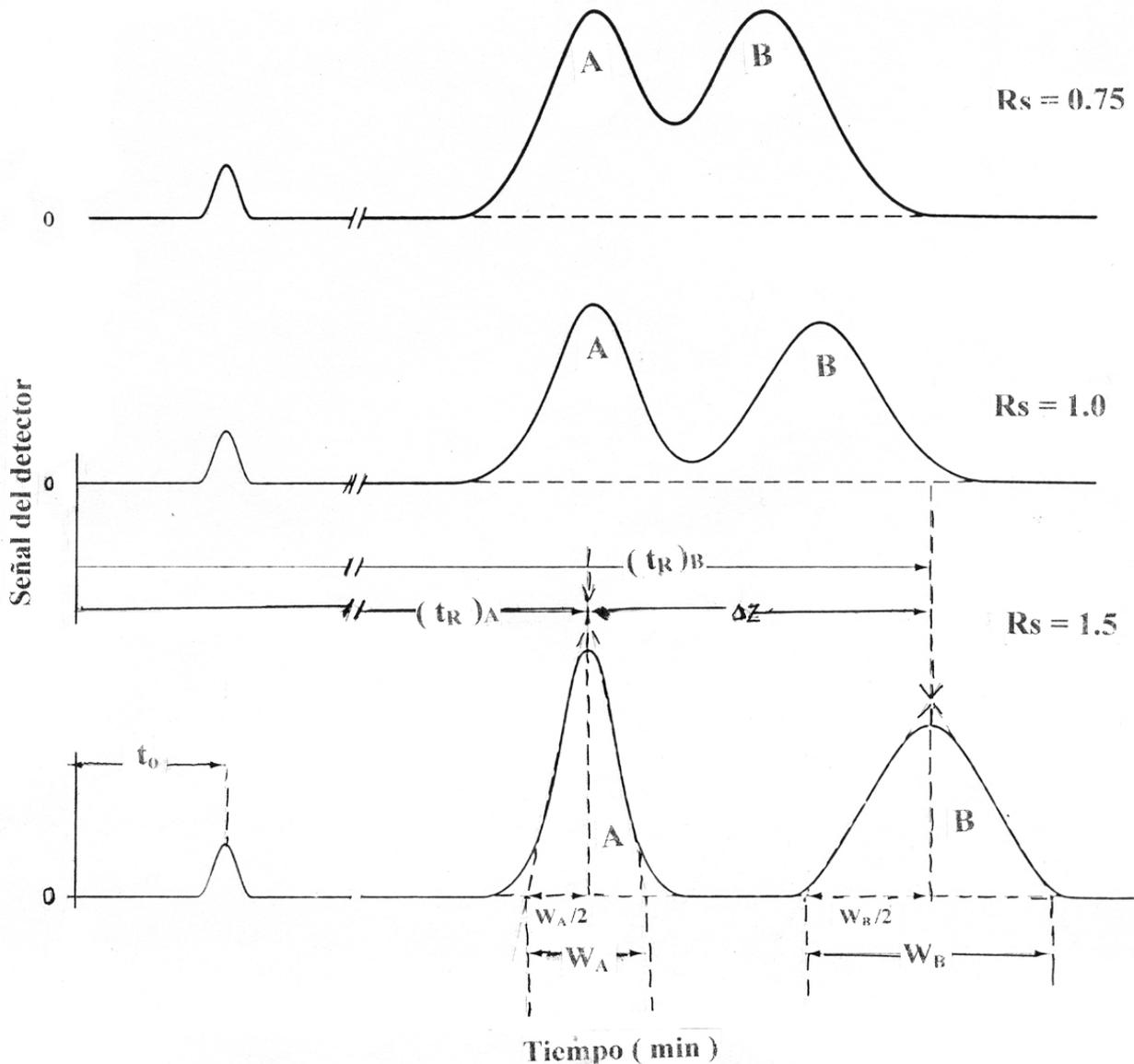


Fig. 3. Efecto de la resolución en la separación de dos picos cromatográficos A y B.

EFFECTO DEL FACTOR DE CAPACIDAD Y LA SELECTIVIDAD EN LA RESOLUCIÓN.

Se ha derivado una ecuación que relaciona la resolución de una columna con el número de platos teóricos que contiene, así como con el factor de capacidad y la selectividad de un par de solutos en la columna. Así, para dos solutos A y B, la resolución está dada por la ecuación:

$$R_s = [(N)^{1/2} / 4] * [\alpha - 1 / \alpha] * [k' / 1 + k']$$

en donde k' es el factor de retención de la especie que se mueve más lentamente.

De esta ecuación se obtienen tres conclusiones:

1. Se observa que a mayor retención (relacionado con el factor de capacidad) mejor es la resolución del cromatograma, aunque llega un punto en que el gráfico se vuelve asintótico. Se ha observado que para tener buenas separaciones, se requiere un factor de capacidad mayor a 2.
2. A una mayor selectividad se tiene una mejor resolución, aunque como en el caso anterior también se tiene una gráfica asintótica, generalmente se trabaja en la zona cercana a una selectividad de 1.
3. Entre mayor número de platos teóricos, se mejora la separación, sin embargo como la resolución está en función de la raíz cuadrática del número de platos teóricos, se necesitan cambios de varias ordenes de magnitud para que la mejora sea importante, por lo cual para mejorar el número de platos teóricos se requiere de un sistema de separación (columna) que posea alturas de plato teórico pequeñas. Sin embargo, es posible observar un comportamiento que ya no es asintótico sino creciente linealmente.

ECUACIÓN DE VAN-DEEMTER

Esta ecuación, analiza las variables que afectan la eficiencia de los sistemas cromatográficos. La forma simplificada de la ecuación es:

$$H = A + B/\mu + C* \mu$$

En la ecuación anterior los términos A, B y C son:

- A es la difusión parásita. En sistemas empacados analiza el efecto del tamaño y forma de las partículas y de la densidad del empacado.
- B es la difusión molecular, depende de la movilidad de las moléculas en las fases, indica que tanto se difunden los analitos en la fase móvil.
- C representa la resistencia a la transferencia de masa, es decir, como se transfiere el analito en la fase estacionaria, se logra con partículas de fase estacionaria uniforme, con fase móvil poco viscosa, espesor de fase estacionaria delgado y columnas con poco diámetro.
- El término μ representa la velocidad de la fase móvil. La velocidad afecta la altura del plato teórico de modo que existe un flujo óptimo de trabajo para obtener una máxima eficiencia.

FUNDAMENTO TEÓRICO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN FORMA DE RETINOL^{17,18, 19, 20.}

Para analizar la vitamina A en muestras reales es necesario al extraerla tomar ciertas precauciones durante el proceso de extracción, como evitar exponerla a la luz, radiación UV, calor y estrés oxidativo, por lo que es necesario agregar antioxidantes así como evitar su contacto con el aire durante todo el procedimiento de análisis. Como la mayor parte del retinol en los alimentos se encuentra en la forma esterificada, por lo tanto por ello es importante la saponificación como paso preliminar.

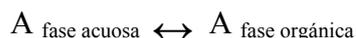
La digestión alcalina (saponificación) es el primer paso durante el análisis de retinol en alimentos. Una muestra representativa es homogenizada y digerida en hidróxido de potasio o en un medio básico similar. La saponificación tiene el efecto de eliminar un gran volumen de material lipídico, liberar la vitamina de la muestra convirtiendo varios ésteres de vitamina A en retinol libre. El procedimiento se hace funcional bajo condiciones de reflujo o a temperatura ambiente (por largos periodos). En algunos alimentos la concentración de vitamina A es muy baja, por lo tanto una primera extracción de la grasa se requiere para mejorar la sensibilidad del ensayo.

El retinol es separado después de la digestión en un solvente no polar comúnmente se utiliza hexano o éter. La solución se lava con agua, se seca, se limpia y usualmente se concentra por evaporación, dando el extracto crudo, posteriormente se redissuelve en la mínima cantidad de solvente adecuado para su determinación por CLAE.

Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es una técnica que se utiliza mucho para separar compuestos orgánicos de las soluciones o suspensiones acuosas o polares en las que se encuentran al agitar dicha solución con un disolvente orgánico inmiscible en el agua y dejar separar ambas capas. Los distintos solutos presentes se distribuyen entre las fases acuosa y orgánica de acuerdo a la constante de extracción de dicho sistema (relacionada a sus solubilidades).

Cuando se agita la solución acuosa o polar en la que está la sustancia a separar con un disolvente orgánico en el que esta sustancia es algo soluble, el compuesto se disuelve parcialmente en cada disolvente. La partición de un soluto entre dos fases inmiscibles es un fenómeno gobernado por la ley de distribución. Así si se permite que la especie de soluto A se distribuya por si misma entre la fase acuosa y la orgánica, el equilibrio resultante puede escribirse como:



De manera ideal, la relación de las actividades para A en las dos fases debe ser constante e independiente de la cantidad total de A, a cualquier temperatura dada. Así:

$$K = (a_A)_{\text{ fase orgánica}} / (a_A)_{\text{ fase acuosa}} \approx [A]_{\text{ fase orgánica}} / [A]_{\text{ fase acuosa}}$$

dónde (a_A) es la actividad de A en cada una de las fases y los términos entre corchetes son las concentraciones molares de A y a K se le conoce como constante de distribución. Por lo general el valor numérico de K se acerca a la relación de solubilidad de A en cada disolvente. Así:

$$K = S_{\text{ fase orgánica}} / S_{\text{ fase acuosa}}$$

En este trabajo experimental se empleó la técnica de extracción líquido-líquido simple, por lo que se procederá a explicarla brevemente. Esta técnica consiste en realizar un único equilibrio entre las fases acuosa y orgánica, se utiliza cuando el valor de la relación de distribución del componente a separar es elevado mientras que el de los restantes es próximo a cero de forma que el factor de separación tiene también un valor alto.

La mezcla de sustancias a separar y los disolventes que forman el proceso extractivo se introducen en un recipiente (lo más apropiado son los embudos de separación) y una vez cerrado se agita vigorosamente para conseguir el mayor contacto posible entre las fases y favorecer así la transferencia de solutos. El tiempo que dura la agitación es una variable que debe optimizarse empíricamente en cada caso concreto ya que depende del tiempo que tarda el sistema en alcanzar el equilibrio de distribución. Si uno de los disolventes es volátil es necesario durante la agitación dejar escapar el exceso de presión abriendo el recipiente. Cuando se alcanza el equilibrio, el sistema se deja en reposo hasta que se separan las fases, lo cual a veces es lento ya que pueden formarse emulsiones. El procedimiento de recoger las fases depende de la densidad relativa de los disolventes que las forman.

Esta técnica de extracción se utiliza ampliamente en Química Analítica con los fines siguientes:

- a. Como técnica de separación, siendo éste, quizás su principal campo de aplicación. Cabe distinguir los siguientes aspectos:
 - i. Aumento de la selectividad de un método ya que de forma simple y relativamente rápida se eliminan las interferencias que perturban la determinación de un componente de una muestra.

- ii. Mejora de las características generales de una determinación analítica, como por ejemplo aumento de sensibilidad al aumentar la señal analítica.
 - iii. Purificación de reactivos que contengan, por ejemplo trazas metálicas.
- b. Para la concentración de trazas, siempre que la relación de distribución para la especie que se desea concentrar sea suficientemente elevada.
 - c. Para realizar estudios teóricos de equilibrios en solución.

Extracción en fase sólida

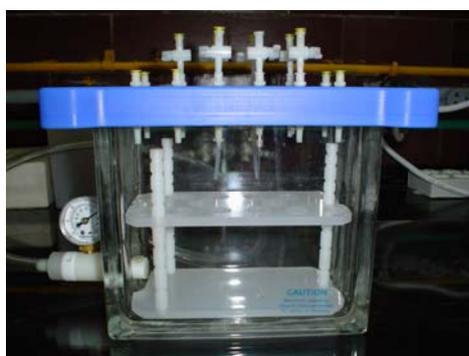
En las técnicas instrumentales de análisis tal como la CLAE y la cromatografía de gases es necesaria la preparación de muestra antes de introducirla al sistema la cual incluye las etapas de limpieza y la concentración, para evitar interferencias producidas por impurezas durante la cuantificación del analito deseado. Por mucho tiempo se ha utilizado la extracción líquido-líquido para preparación de muestra, sin embargo posee varios inconvenientes: es tediosa, costosa y consume bastante tiempo pero además se emplean grandes volúmenes de solvente y pueden formarse emulsiones. Entre otras técnicas que se han utilizado se encuentra la filtración, la destilación y la precipitación por mencionar algunos cuantos ejemplos.

Sin embargo, las regulaciones actuales han reducido al mínimo el uso de disolventes orgánicos y la extracción líquido-líquido está siendo desplazada en la mayor parte de los casos por la Extracción en Fase Sólida (EFS por sus siglas en español). La EFS es otra alternativa para la preparación de la muestra utilizándose para ello pequeñas columnas de extracción rellenas con diversos tipos de adsorbentes sólidos (fase estacionaria) y la elección del adsorbente va a depender del analito a aislar y del mecanismo de separación.

Estas columnas son hechas de polipropileno o vidrio, y son empacadas con diferentes cantidades de adsorbente: 100, 200, 500 ó 1,000 mg, que se encuentran entre dos discos de 20 µm cuyo material también es de polipropileno, igualmente la capacidad de la columna es de 1, 3 ó 6 mL pero incluso pueden existir para volúmenes mas grandes. Para que la solución pase a través de la columna generalmente se aplica una presión negativa es decir una presión de vacío.



Para llevar a cabo la extracción, se utiliza un equipo de extracción al vacío en el cual se coloca la columna o las columnas (en función del número de extracciones que se realicen). El equipo es conectado a un vacío que genera presiones negativas.



La EFS se utiliza para la limpieza y/o la concentración de la muestra, dependiendo del grado de concentración requerido del analito de interés, la complejidad de la muestra, la naturaleza de los analitos y las impurezas presentes en la muestra.

EFS para la concentración de la muestra

Esta modalidad se utiliza para extraer analitos los cuales se encuentren demasiado diluidos en la muestra como para ser cuantificados.

Un ejemplo de la utilidad de la EFS para concentración de muestra es el análisis de agua, donde una fase de extracción inversa es la ideal para concentrar los compuestos orgánicos que se encuentran en agua a concentraciones de partes por billón o trillón a órdenes de partes por millón (ppm).

EFS para limpieza de la muestra

Esta modalidad se utiliza cuando se desea liberar al analito de interés de impurezas, dándose dos casos:

*El primer caso se da cuando se desea retener el analito y liberar las impurezas de la columna, para después reextraer el analito sin impurezas:

1) Cuando el analito de interés es más polar que las impurezas asociadas a la muestra.

En este caso, la extracción en fase normal puede ser utilizada. Para la extracción en fase normal la muestra es disuelta en un solvente menos polar que el adsorbente, así al pasar la solución a través de la columna el analito de interés es absorbido por el adsorbente y en consecuencia las impurezas no polares con gran afinidad al solvente no son retenidas. El analito retenido en el adsorbente es entonces removido de la columna con un solvente polar que reacciona más fuertemente con el analito que el adsorbente, así poco a poco al ir agregando el solvente ocasiona que el analito sea liberado del adsorbente, así se extrae un analito libre de impurezas poco polares.

2) Cuando las impurezas de la muestra son más polares que el analito de interés.

En este caso, la aplicación de una fase inversa es la más adecuada. La muestra se disuelve en un medio polar y la solución se hace pasar por la columna la cual contiene un adsorbente no polar, con ello las impurezas polares son más fuertemente atraídas por el solvente y en consecuencia no son retenidas por la columna. Así el analito retenido por el adsorbente es liberado con un solvente no polar quedando libre de impurezas polares.

El segundo caso se da cuando se desea liberar el analito directamente y retener las impurezas:

Se dan las mismas modalidades que en el primer caso la diferencia es que aquí se invertiría el carácter polar del adsorbente.

1) Cuando el analito de interés es más polar que las impurezas asociadas a la muestra.

En este caso, la extracción en fase inversa es la que se utiliza. La muestra es disuelta en un solvente más polar que el adsorbente, así al pasar la solución a través de la columna el analito de interés no es adsorbido por el adsorbente y en consecuencia las impurezas no polares con gran afinidad al adsorbente son retenidas. El analito sale libre de impurezas no polares.

2) Cuando las impurezas de la muestra son más polares que el analito de interés.

En este caso, la aplicación de una fase normal es la más adecuada. La muestra se disuelve en un medio no polar y la solución se hace pasar por la columna la cual contiene un adsorbente polar, con ello las impurezas polares son más fuertemente atraídas por el adsorbente y en consecuencia son retenidas por la columna. El analito sale libre de impurezas polares.

Tabla 9. Algunas superficies sólidas utilizadas para la EFS.

Nombre	Característica superficial	Tipo de enlaces y condiciones
Octadecilo	Hidrofóbica no polar	Especies hidrofóbicas que proceden de soluciones acuosas. Por ejemplo: aminas, analgésicos, lípidos y vitaminas liposolubles.
Octilo	Hidrofóbica	Especies hidrofóbicas que proceden de soluciones acuosas. Por ejemplo: pesticidas
Sílice	Hidrofílica Polar Neutra	Especies de polaridad baja o moderada que proceden de soluciones no acuosas. Por ejemplo: aflatoxinas, alcoholes, vitaminas y alcaloides.
Florisil	Hidrofílica Polar Levemente básico	Especies de polaridad baja o moderada que proceden de soluciones no acuosas. Por ejemplo: aflatoxinas, alcoholes, vitaminas y alcaloides.
Aminopropilo	Hidrofílica Moderadamente polar Ligeramente básico Enlazador de aniones	Analitos en disolventes acuosos u orgánicos. Por ejemplo: carbohidratos, conservadores, metales y nucleótidos.
Estireno	Hidrofóbico Neutro	Productos orgánicos en agua. Por ejemplo: fenoles, alcoholes.
Diol	Hidrofóbico Casi no polar neutro	Traza de elementos en agua, proteínas y péptidos en disolventes acuosos u orgánicos. Por ejemplo: proteínas, péptidos y algunos agentes surfactantes acuosos.

Mecanismo de retención en la EFS

El mecanismo de retención que ocurre entre las moléculas de analito o moléculas de impureza y los grupos funcionales que presenta el adsorbente se da por la presencia de una o más de las siguientes fuerzas:

Interacciones iónicas:

- Fuerza iónica: interacciones catiónicas e interacciones aniónicas.

Interacciones polares:

- Puentes de hidrógeno.
- Fuerzas dipolo-dipolo.
- Fuerzas dipolo-dipolo inducido.

Interacciones no polares:

- Fuerzas de dispersión (fuerzas dipolo inducido-dipolo inducido).

Los puentes de hidrógeno ocurren con la interacción de los hidrógenos con elementos fuertemente electronegativos tal como el oxígeno, nitrógeno y flúor. Los puentes de hidrógeno pueden ser una importante fuerza de unión entre el adsorbente y las moléculas a ser retenidas. Generalmente después de que reacciona el silanol con los grupos funcionales de enlace, no todos quedan unidos, quedando grupos silanoles remanentes con lo cual sus puentes de hidrógeno pueden interaccionar significativamente con las moléculas de analito y/o impurezas que presenten algún grupo funcional con elementos electronegativos.

Las fuerzas dipolo-dipolo resultan de la interacción de los momentos dipolo de las moléculas polares. Hay que recordar que un dipolo molecular existe cuando hay una diferencia de valores de electronegatividad entre dos átomos unidos dependiendo el valor del momento dipolar de su geometría molecular. De acuerdo con lo anterior, moléculas simétricas compuestas de átomos con diferente electronegatividad no presentan momento dipolo, mientras que moléculas asimétricas presentan momento dipolo. Las interacciones dipolo-dipolo entre las moléculas tienden a ser ligeramente más débiles que los puentes de hidrógeno. Las fuerzas dipolo-dipolo al igual que los puentes de hidrógeno se dan sobre todo en adsorbentes con grupos funcionales tal como los hidroxilos, aminas, carbonilos, anillos aromáticos, sulfidrilos, dobles ligaduras y grupos que contienen heteroátomos.

Las fuerzas de dispersión tal como las fuerzas de Van Der Waals o las fuerzas de London son las interacciones entre moléculas a las cuales se les ha inducido el momento dipolar ocurriendo esto en moléculas no polares. Las fuerzas de dispersión pueden ser atractivas o repulsivas, dependiendo de la distancia intermolecular y generalmente son más

débiles que los puentes de hidrógeno y las interacciones dipolo – dipolo cuando se dan individualmente sin embargo, su fuerza de unión se hace significativa cuando se tienen varias moléculas interaccionando de esta manera. Estas interacciones se dan en adsorbentes no polares tal como el octadecilo.

Finalmente las interacciones iónicas son interacciones que ocurren entre grupos unidos covalentemente y que presentan carga la cual interacciona con la carga opuesta de algún ión en la solución problema, al ser una fuerza electrostática se caracteriza por ser una atracción reversible.

Estas interacciones ocurren en adsorbentes que poseen grupos funcionales tal como los ácidos sulfónicos, ácidos carboxílicos y fosfatos.

Durante el trabajo experimental de esta tesis se utilizó la EFS para llevar a cabo la limpieza del extracto de retinol obtenido, utilizando como adsorbente sílica-gel y como disolvente del retinol (analito) éter etílico. A continuación se mencionan los pasos utilizados para llevar a cabo este proceso:

1. Acondicionamiento de la columna con el disolvente apropiado.
2. Aplicación del extracto al interior de la columna (interacción con el adsorbente).
3. Aspiración del extracto a través de la columna aplicando presión negativa.
4. Lavado de la columna con éter.

La solvatación del adsorbente (acondicionamiento) fue necesaria realizarla antes de la interacción del adsorbente polar con las impurezas (se deseaba retener impurezas polares en la columna y liberar el analito) ya que al humedecer el adsorbente se crea un ambiente satisfactorio para la retención de las impurezas poco polares, constituyendo las interacciones primarias.

Las propiedades de retención del adsorbente sílica-gel son debidas al carácter polar de la sílica, así se crean interacciones entre el adsorbente y las impurezas medianamente polares las cuales constituyen las interacciones secundarias. Estos procesos se explicarán a continuación.

Para llevar a cabo el acondicionamiento, fue necesario entonces considerar:

- i. la selección del adsorbente y
- ii. la selección del disolvente apropiado para llevar a cabo el acondicionamiento del adsorbente.

Estas consideraciones dependieron del tipo de muestra, de las características del analito de interés y de las propiedades de las impurezas de la muestra, considerando que se

deseaba retener las interferencias. Así cuando las impurezas son más polares que el analito de interés la extracción en fase normal es la indicada, mientras cuando las impurezas son menos polares que el analito la fase inversa es la indicada. En este caso la muestra o matriz de trabajo fue el extracto etéreo de hígado y el analito de interés la vitamina A en forma de retinol.

El retinol como se mencionó anteriormente es una vitamina liposoluble por lo cual las impurezas del extracto obtenido presentan principalmente compuestos no polares (colesterol, esteroides y otros pigmentos de alto peso molecular) y compuestos moderadamente polares (tal como antibióticos, hormonas, polipéptidos, etc recordando que el hígado es el órgano que lleva a cabo el proceso de detoxificación de la sangre).

Al acondicionar la columna con éter para posteriormente aplicar el extracto obtenido al interior de la columna con extracción al vacío se espera primeramente que los compuestos poco polares de alto peso molecular que forman parte de las impurezas que sean extraídos por el éter etílico y queden incrustados o agregados entre los poros propios del adsorbente (interacciones primarias). Así aquellas impurezas moderadamente polares de la muestra pudieron ser adsorbidas e interactuar con el adsorbente polar en este caso por sílica-gel lo que constituiría las interacciones secundarias (principalmente por puentes de hidrógeno), mientras que el retinol atravesó por la columna sin ser retenido por el adsorbente. Finalmente con el lavado posterior de la columna con éter se extrajo la mayor cantidad de retinol, evitando que una parte de la vitamina quedara al final de la columna.

Cabe mencionar, que en este proceso de lavado a la par del mecanismo de elución del analito y la interacción adsorbente-impurezas también se considera el peso molecular del retinol y de las impurezas; así el diámetro de las partículas de la columna (53 μm en promedio) y el tamaño de poro de 60 Å no permite el paso de las grasas de peso molecular elevado como lo son los esteroides y los esteroides sin embargo el retinol (con el éter) es capaz de atravesar el adsorbente sílica gel junto con otros compuestos lipídicos de peso molecular muy bajo.

A) Linealidad

La linealidad es una medida que asegura que la relación entre la respuesta obtenida y la concentración de analito tiende a una línea recta en un intervalo dado. Existe la linealidad del sistema y la linealidad del método, en ambas se debe probar que la variable dependiente es directamente proporcional a la variable independiente, por lo cual se realiza el gráfico para visualizar esto y además se realiza una regresión lineal. En este trabajo por la muestra utilizada no se puede realizar la linealidad del método por lo que solo se mencionará la información para realizar la linealidad de sistema.

En el caso de la linealidad del sistema la variable dependiente es la respuesta o señal y la variable independiente es la concentración del analito, el criterio de aceptación internacional exige que además de observarse gráficamente una tendencia lineal el valor de correlación de la regresión lineal aplicada a los datos de una curva patrón sea:

$$r \text{ o } r^2 \geq 0.98$$

además de visualizar si hay una tendencia al origen (tiende al cero) se realiza una prueba de hipótesis a la ordenada al origen, y posteriormente se calcula el intervalo de confianza para la ordenada al origen y a la pendiente.

La prueba de hipótesis para la ordenada al origen para comprobar si los resultados experimentales se ajustan a una línea recta con ordenada al origen ó no, basados en la ecuación:

$$Y = \gamma X + \beta$$

la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen es:

$H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$ (Hipótesis nula)

$H_1: b \neq \beta$ (Hipótesis alterna)

La prueba estadística utilizada es la t de student, por lo que se requiere calcular primero una t calculada por medio de:

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + nX^2}}$$

como se trata de un ensayo de dos colas y tomando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y n-2 grados de libertad, el criterio para rechazar la H_0 es:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

dónde:

b = Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional ($\beta=0$).

Se = Error típico de estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

\bar{X} = Media experimental.

El error típico de estimación se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Se = \sqrt{\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n-2)nSxx}}$$

dónde:

$$Sxx = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2$$

$$Syy = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2$$

$$Sxy = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)$$

Para calcular el intervalo de confianza sobre la ordenada al origen se utiliza la ecuación:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{Sxx + (n\bar{X})^2}{nSxx}}$$

Para calcular el intervalo de confianza sobre la pendiente se utiliza la ecuación:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$

B) Precisión

La precisión se define como el grado de concordancia entre varias mediciones individuales de una misma propiedad. Se calcula tanto para el sistema como para el método, en el caso de este último normalmente se expresa como repetibilidad y reproducibilidad.

En el caso de este trabajo además de realizar la precisión del sistema se trabajó la repetibilidad y no la reproducibilidad aunque se mencionará su definición teórica.

La repetibilidad es el grado de concordancia de las mediciones individuales de una misma propiedad realizadas por un mismo analista utilizando el mismo método, instrumentos y/o aparatos.

Los resultados de error de estos ensayos no deben diferir en más del 5%, por implicar el efecto de varios aspectos, como la habilidad del analista, instrumentación, volúmenes, etc..

La reproducibilidad es el grado de concordancia de las mediciones individuales de una misma propiedad realizadas pero cambiando analistas, alguna parte del método, como instrumentos, técnica de extracción, reactivos, aparatos, etc..

Para comprobar esto se realizan pruebas de hipótesis con los datos obtenidos, con los siguientes criterios.

Para la **precisión del sistema y la repetibilidad del método** la hipótesis nula es:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = \text{será el 5\% de variación del área}$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

que por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza σ_o^2 se utiliza la prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad:

$$\chi_{cal.}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2}$$

dónde:

n = Número de determinaciones.

s = Desviación estándar muestral.

σ_o = Desviación estándar máxima aceptada.

Se consideran dos colas iguales, a pesar de que la distribución χ^2 no es simétrica para evitar cálculos complicados, y se rechaza la hipótesis nula H_0 , sí:

$$\chi_{calculada}^2 > \chi_{\alpha}^2$$

$$\chi_{calculada}^2 > \chi_{0.05}^2$$

El intervalo de confianza al nivel de $1-\sigma$, para s^2 es:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}$$

tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para la desviación estándar s con el mismo nivel $1-\sigma$.

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

C) Recobro

En el caso de muestras o matrices en los que no es simple realizar la linealidad de método y/o la exactitud, es común realizar el cálculo de recobro para tomar a éste como un factor importante de corregir en los cálculos cuantitativos que se realicen sobre las muestras.

El recobro es el resultado expresado en porcentaje de la comparación entre la concentración del analito problema que se obtiene y la concentración que debe obtenerse después de tratar con el método una muestra a la cual se le adiciona una concentración conocida del analito. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación.

$$R = \frac{[\textit{Concentración}]_{\textit{obtenida}}}{[\textit{Concentración}]_{\textit{teórica}}} \times 100$$

DESARROLLO EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA^{1,2}

La metodología experimental de la presente tesis consistió en las siguientes etapas generales:

- I. Desarrollo de la metodología de extracción de vitamina A en forma de retinol aplicada en la muestra de hígado de pollo y optimización de ésta.
- II. Extrapolación de la(s) modificación(es) realizada(s) en la metodología de extracción de vitamina A en hígado de pollo, cerdo y tiburón.
- III. Análisis cualitativo y cuantitativo por CLAE.
- IV. Evaluación estadística de la metodología de extracción de vitamina A aplicada a hígado de pollo, de cerdo y tiburón a partir de un estudio de repetibilidad. Determinación del recobro de vitamina A en hígado de pollo aplicando el método base y el método modificado.

Muestra de hígado de pollo

Cantidad: 4 muestras

Muestras en las que se aplicó el método base de extracción de vitamina A.

Peso:

Muestra 1: 44.0618 g

Muestra 2: 39.2730 g

Muestras en las que se aplicó el método de extracción de vitamina A modificado.

Peso:

Muestra 3: 46.2703 g

Muestra 4: 73.4744 g

Lugar de compra: Pollería ubicada en la calle 2, colonia Agrícola Pantitlán, delegación Iztacalco.

Lugar de origen: Monterrey, Nuevo León.

Muestras de hígado de cerdo

Cantidad: 2 muestras *en las que se aplicó el método de extracción de vitamina A modificado.*

Peso:

Muestra 1: 856 g

Muestra 2: 1,586 g

Lugar de compra: Mercado San Juan ubicado en la colonia Juárez Pantitlán, delegación Iztacalco.

Lugar de origen: La Piedad, Michoacán.

Muestra de hígado de tiburón

Cantidad: 1 muestra *en la que se aplicó el método de extracción de vitamina A modificado.*

Peso:

Muestra 1: 73.1306 g

Lugar de compra: Pescaderías Central de Abasto, delegación Iztapalapa.

Lugar de origen: No se pudo especificar el sitio de origen ya que en los mercados del D.F. el tiburón que se comercializa puede venir de alguno de los siguientes puertos:

Puerto Madero (Chiapas), Guaymas (Sonora), San Francisquito (Baja California) y Mazatlán (Sinaloa). Es común que se pesque en aguas del Océano Pacífico y Golfo de México, siendo el Golfo de California y las aguas de Campeche los sitios con más tradición para la pesca de tiburón. Lo anterior es información recabada de los vendedores de las pescaderías.

-Para la realización de cada una de las etapas mencionadas se hizo uso de lo siguiente:

Reactivos

Compuesto	Grado	Compañía	Lote
Metanol	Nanogrado	Mallinckrodt	5160 T 39404
Agua	ASTM Tipo 1	Obtenida con equipo Millipore	
Hidróxido de potasio (perlas)	ACS	J.T. Baker	N18C52
Alcohol etílico	ACS Absoluto anhidro	Baker	M25C64
Ácido ascórbico		Laboratorio de Desarrollo Experimental de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México.	Donativo
Sulfato de sodio anhidro (granular)	R.A.	Mallinckrodt	8024 T11D03
Cloruro de sodio	Alimentario	“Elefante” sal refinada-yodatada-fluororada	22/12/03 L-38
Éter etílico	R.A.	Mallinckrodt	0850 P34D05/6850P34D05
Vitamina A sintético	95%	Sigma	063K5004

Aparatos y material consumible

- Parrilla Fischer Scientific. Lote 2169770 UNAM.
- Balanza Sartorius, modelo BL 120 S. Max 120 g, precisión= 0.1 mg. Lote: 2136290.
- Aparato de extracción al vacío (Manifold) para cartuchos de Extracción en Fase Sólida. J.T. Baker.
- Columnas de filtración de 3 mL de volumen de capacidad, con filtro dual de 20 µm de polietilén. J.T. Baker. Lote G35552.
- Columna de extracción en fase sólida de sílica gel (SiOH) de 6 mL de volumen de capacidad, (1,000 mg por columna). J.T. Baker. Lote V07551.

- Licuadora marca Osterizer Clásica . Super Deluxe. 3 velocidades. México.

Material volumétrico

- Vasos de precipitado de 25 y 100 mL.
- Equipo para extracción directa por reflujo marca Wheaton el cual contiene:
 - Microviales de 5 mL. Supelco Inc. USA.
 - Microcondensador de 80 mm con rosca de tornillo.
 - Conectores de hule para viales y condensador.
- Pipetas graduadas de 1 mL y 10 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Matraces aforados de 5 mL con un intervalo de tolerancia de ± 0.04 mL. Marca Blaubrand., Certificado ISO 1042. Número de Lote 03.06.
- Matraces aforados de 25 mL con un intervalo de tolerancia de ± 0.04 mL. Marca Blaubrand, Certificado ISO 1042. Número de Lote 03.04.

Instrumento

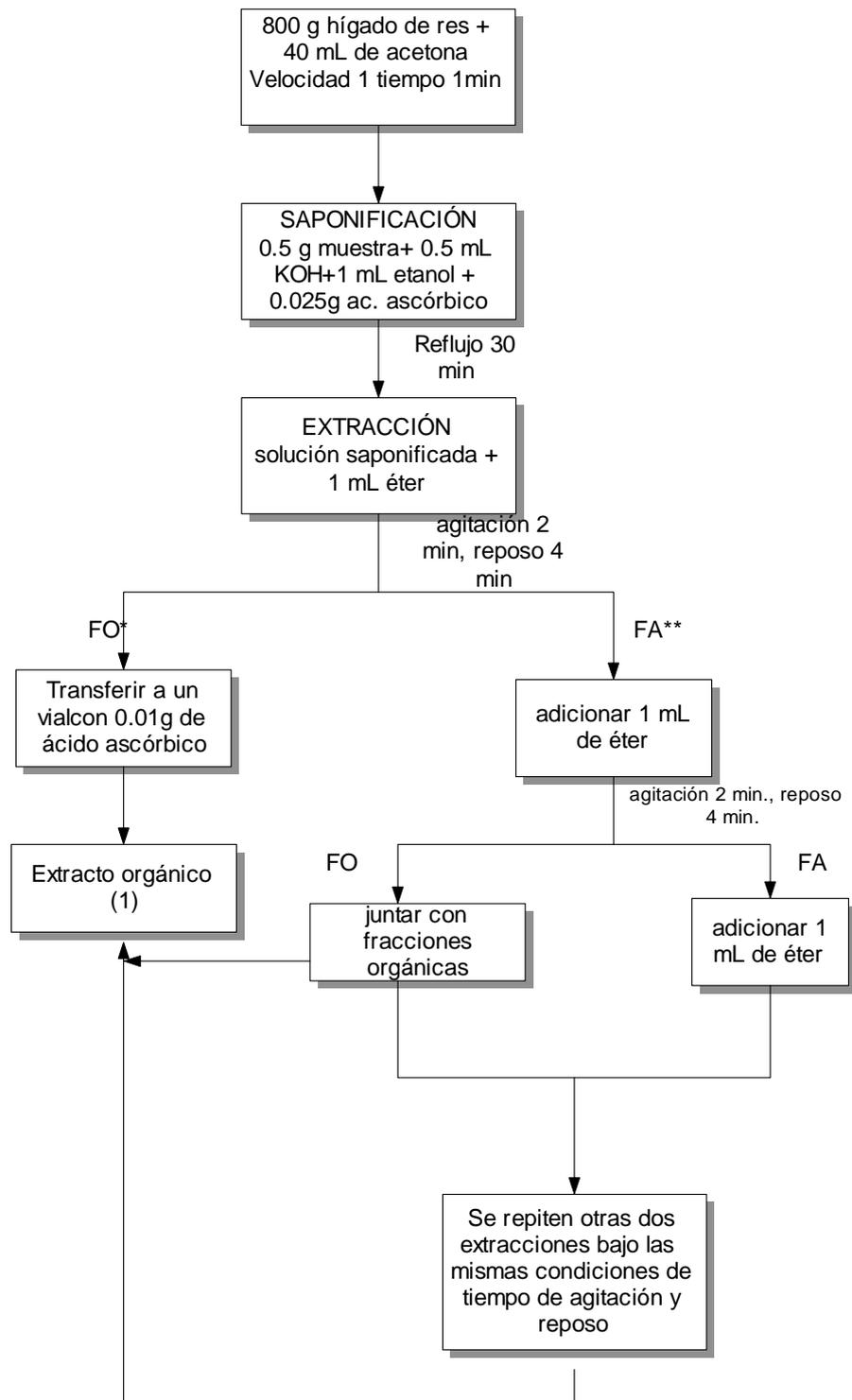
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca Shimadzu que permite gradiente de elución constituido por:
 - Desgasificador modelo HD-1.
 - Mezclador de baja presión modelo FCV-10AL.
 - Sistema de bombeo modelo LC-10AD.
- Válvula de inyección marca Rheodyne con tubería para inyectar 10 μ l de analito/disolvente.
- Columna empacada de fase estacionaria químicamente unida de Nucleosil C-18, de 150 mm de longitud x 4 mm de d.i. y tamaño de partícula de 5 μ m con porosidad de 100 Å.
- Detector UV-VIS modelo SPD-10AV de longitud de onda variable.

Para cumplir con el primero de los objetivos planteados en este trabajo, a continuación conforme se explica el procedimiento experimental de cada etapa se procederá a dar la explicación teórica de cada una de éstas y el planteamiento de las variaciones realizadas en las diferentes etapas.

FASE I. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN HÍGADO DE POLLO.

El método de extracción de vitamina A validado para hígado de res² consistió en cinco etapas y como se mencionó se aplicaron como tales para hígado de pollo. A continuación se procede primeramente a desglosar el diagrama de extracción de vitamina A en hígado de res para tener una visión general del método para posteriormente explicar cada etapa dando a conocer para cada una de ellas el procedimiento empleado. Cabe mencionar que igualmente se plantearán los factores de control propios de cada etapa ya que su mención es necesaria para posteriormente a partir de ellos plantear la(s) modificación(es) realizada(s) al método base de extracción a fin de optimizarlo para hígado de pollo, de cerdo y tiburón.

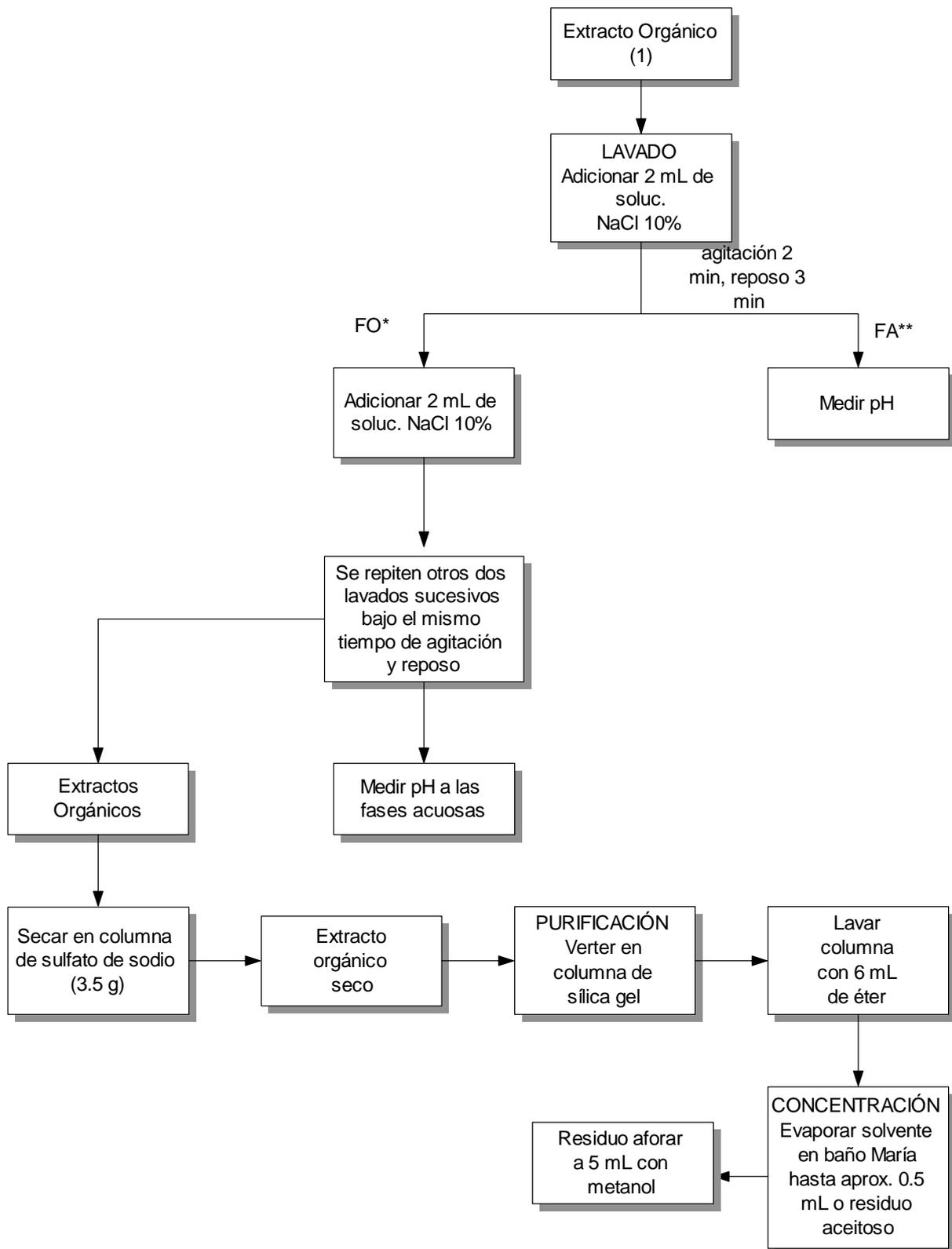
DIAGRAMA DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN HÍGADO DE RES



FO*: fase orgánica

FA **: fase acuosa

Continuación del diagrama:



FO*: fase orgánica

FA**: fase acuosa

Etapa 1. Preparación de la muestra.

Esta etapa consistió en el acondicionamiento previo de la muestra para permitir su análisis en los subsecuentes pasos, en este caso se controló el tamaño y la temperatura de la muestra, además del control de la presencia de luz.

La muestra antes de su uso se mantuvo en una bolsa de plástico oscura y sellada además de almacenarse en un recipiente cerrado lo más herméticamente posible, todas estas precauciones se tomaron para evitar el contacto del aire y de la luz con la muestra y con ello evitar la oxidación de la vitamina A que se encuentra en la fase grasa de cada una de las muestras, cabe mencionar que siempre que no era utilizada la muestra se mantuvo refrigerada.

Esta etapa posee tres factores de control:

- a) Cantidad de la muestra.
- b) Temperatura.
- c) Cantidad de luz.

Cantidad de muestra

Para la muestra de hígado de pollo fue necesario realizar una primera modificación en este factor de control, la modificación en la cantidad de muestra se realizó debido a que el peso promedio de los hígados de pollo fue menor que el peso de un hígado de res. Cabe mencionar que en este caso, como es posible ver en los resultados, se utilizaron dos muestras de hígado de pollo, de la misma región del país y del mismo establecimiento para evitar grandes variaciones en los resultados obtenidos, de acuerdo a esto último se obtuvo el siguiente peso promedio para estas muestras:

Peso: Muestra 1: 44.0618 g

Muestra 2: 39.2730 g

Peso promedio: 41.6674 g

De acuerdo con este resultado, se procedió a modificar la cantidad utilizada para hígado de pollo, ya que el peso promedio de la muestra de hígado de pollo es mucho menor en comparación con el peso de hígado de res. De acuerdo a esto último la cantidad de hígado de pollo que se decidió utilizar para el análisis fue de 40 g.

La muestra una vez que alcanzó la temperatura ambiente, se pesó y se procedió a cortarla en trozos pequeños de aproximadamente 1cm^3 limpia de tejido membranoso, de acuerdo a los pesos registrados para cada muestra se procedió a realizar una segunda modificación en la cantidad de acetona adicionada (en comparación con la cantidad utilizada

para hígado de res), esto se realizó tomando en cuenta la proporción que se usó en la metodología para hígado de res:

$(40 \text{ mL de acetona} / 800 \text{ g de hígado de res}) * (40 \text{ g de hígado de pollo}) = 2 \text{ mL de acetona}$
por tanto el resultado final para el acondicionamiento de la muestra fue:

40 g de hígado de pollo + 2 mL de acetona.

Finalmente los 40 g de muestra fraccionada se licuaron (velocidad de licuado: 1, tiempo de licuado: 1 minuto aprox.) junto con la correspondiente cantidad de acetona hasta que quedó con una consistencia homogénea.

Temperatura y cantidad de luz

Para estos factores de control se respetaron los lineamientos establecidos en la metodología validada para hígado de res es decir, en cuanto a la temperatura se estableció que antes, durante y después de la extracción de vitamina A fuera la temperatura ambiente pero además, que este parámetro se mantuviera constante todo el tiempo (considerando que la parte experimental de esta tesis se realizó en periodo invernal durante los meses noviembre – febrero). La muestra como se mencionó anteriormente- se almacenó en refrigeración antes de su uso (tanto antes de licuarla como después de este proceso) por ello para modificar su temperatura se procedió a calentarla por baño María, cabe mencionar que la temperatura del agua no debió ebulir para evitar la degradación de la vitamina y/o cocimiento del hígado. Cuando la muestra alcanzó una temperatura superior a la ambiente se procedió a enfriarla con un chorro de agua fría hasta que alcanzó la temperatura deseada.

En cuanto a la cantidad de luz con la que se trabajó nunca varió antes, durante ni después de la extracción de vitamina A por dos factores: La metodología de extracción de vitamina A para su posterior análisis y cuantificación se realizó siempre en el mismo laboratorio por tanto recibió la misma iluminación artificial y porque dicha metodología siempre se realizó a la misma hora y durante la misma estación del año.

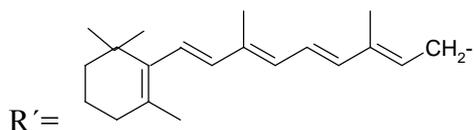
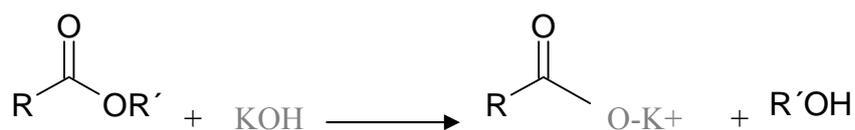


Fig. 4. Preparación de muestra.

Etapa 2. Digestión alcalina.

Consistió en hidrolizar la muestra previamente acondicionada en un medio alcalino utilizando para ello hidróxido de potasio en exceso y etanol como medio de reacción.

Esta etapa se puede considerar fundamental ya que la vitamina A en el hígado se encuentra almacenada en forma esterificada es decir en forma de ésteres de retinilo, como en este caso se cuantificó como vitamina A se utilizó el hidróxido de potasio el cual hidrolizó el enlace éster para dar como producto los ácidos grasos correspondientes en forma de sal de sodio y un alcohol en este caso el vitamina A:



dónde R'OH es el vitamina A.

Esta reacción tiene la peculiaridad de promover la hidrólisis de los ésteres porque proporciona el reactivo fuertemente nucleofílico OH⁻ proveniente del hidróxido de potasio. Además posee la ventaja de que es una reacción irreversible esencialmente, pues dentro del mecanismo de reacción se presenta un anión carboxilato estabilizado por resonancia que demuestra poca tendencia a reaccionar con un alcohol.

El etanol como se mencionó, tiene la función de medio de reacción es decir es el ambiente donde se lleva a cabo la hidrólisis alcalina, ya que en este disolvente es soluble tanto el hidróxido de potasio como el vitamina A.

Después de esta reacción se obtiene una fracción saponificable donde se encuentran los ácidos grasos como sales de sodio, una fracción de etanol (recordando que este solvente orgánico posee también una tendencia polar) y el hidróxido de potasio; y una fracción no saponificable donde se encuentra el vitamina A libre, etanol con una parte de hidróxido de potasio (el exceso agregado, recordando que este último es soluble en etanol) y otras sustancias como esteroides, esteroides, colesterol entre otras grasas sin digerir.

Adicionalmente, para esta etapa se adicionó ácido ascórbico como antioxidante de tal manera que se pudiera proteger el vitamina A de un deterioro por calor, esta sustancia se considera inerte desde el punto de vista que no participa en la reacción de digestión, por lo cual no formó subproductos o derivados.

Cabe mencionar que la digestión alcalina se realiza a través de la técnica de extracción directa por reflujo donde el disolvente -en este caso la mezcla etanol/KOH- es continuamente reflujada, promoviéndose en forma continua y gradual la hidrólisis alcalina en forma indefinida hasta el terminó del tiempo de reflujo y/o la reacción se lleve a cabo totalmente.

Esta etapa posee los siguientes factores de control:

- a) Cantidad de etanol (medio de reacción).
- b) Cantidad de hidróxido de potasio (para la hidrólisis alcalina de los ésteres).
- c) Cantidad de muestra a digerir.
- d) Cantidad de antioxidante (ácido ascórbico).
- e) Tiempo de calentamiento.
- f) Temperatura de calentamiento.
- g) Velocidad de agitación.

Para esta etapa no se realizó ninguna modificación para la muestra de hígado de pollo en ninguno de los factores de control ni en el procedimiento con respecto a la muestra de hígado de res de referencia.

Procedimiento de la digestión alcalina.

Se procedió a pesar aproximadamente 0.5 g de muestra en un vial para microreacción posteriormente se añadió 1 mL de etanol, 0.5 mL de hidróxido de potasio y 0.025 g de ácido ascórbico.

Posteriormente se montó un sistema de extracción directa a reflujo en un sistema tipo Wheaton para microcondensación dejándose la reacción por espacio de 30 minutos una vez iniciado el reflujo sin agitación, el vial con la muestra fue protegido de la luz al envolverlo con papel aluminio (además de asegurar la transmisión de calor en forma más rápida). Al pasar el tiempo de reflujo establecido se procedió a dejar enfriar el vial con la muestra hasta que alcanzara la temperatura ambiente.



Fig. 5. Digestión alcalina.

Etapa 3. Extracción.

Este paso tuvo como función la separación de la fase no saponificable (donde se encuentra el vitamina A) de la fase saponificable después de la digestión alcalina, para ello se utiliza la técnica de extracción líquido-líquido simple lográndose separar dos fases: la fase no saponificable (o fase orgánica) donde se obtiene el vitamina A con el éter etílico y otras sustancias que formen parte de la fase no saponificable (también llamada fase etérea) y la fase saponificable (o fase acuosa) donde se obtienen los ácidos grasos como sales de sodio, etanol e hidróxido de potasio. Como en el caso de la digestión alcalina, alternativamente se adicionó al vial con la fase orgánica ácido ascórbico como antioxidante .

Una vez extraída la fase orgánica y consecutivo al paso de la extracción se considera la realización de otra operación que es la limpieza o lavado de la fase orgánica con una solución de cloruro de sodio al 10% cuya función es la de liberar el vitamina A de un medio alcalino además de las otras sustancias que formen parte de la fracción saponificable.

El cloruro de sodio como tal, tiene la función de ser un agente atractor de moléculas polares estando solvatado en agua por lo que al acomodarse en el seno de la disolución (agua) la ioniza más por tanto se espera que las moléculas polares de la superficie de la fase orgánica se sientan más atraídas al seno de la disolución, es decir provoca una mayor cohesión entre ellas, un aumento en la tensión superficial y una disminución del exceso de superficie en la disolución²⁴.

Para asegurar la eliminación total de cualquier cantidad pequeña de agua que pudiera ocasionar la oxidación posterior de la vitamina A, además del lavado con la solución salina se emplea una columna empacada de sulfato de sodio anhidro que al ser una sustancia altamente higroscópica aseguró la retención de agua que hubiera podido quedar en el extracto.

Esta etapa está constituida por los siguientes factores de control:

- a) Cantidad de éter etílico.
- b) Cantidad de ácido ascórbico (como antioxidante).
- c) Tiempo de agitación.
- d) Tiempo de reposo.

Dichos factores, como en el caso anterior no fueron modificados para la muestra de hígado de pollo, respetándose los mismos lineamientos establecidos en esta etapa para hígado de res.

Procedimiento de la extracción.

Una vez digerida la muestra y a temperatura ambiente se procede a agregar 1 mL de éter etílico se agita por espacio de dos minutos, dejándose reposar por 4 minutos, pasado ese tiempo se transfirió la fase no saponificable (fase orgánica, capa superior) a otro vial con 0.01 g de ácido ascórbico, a la fase acuosa se le adiciona nuevamente 1 mL de éter etílico y se procede a realizar otras dos extracciones iguales de la manera que se mencionó anteriormente.

Adicionalmente el extracto de vitamina A (fase orgánica) pasa por un proceso de lavado sucesivo que tiene como objetivo principal la eliminación de hidróxido de potasio en exceso, el cual posee los siguientes factores de control:

- a) Volumen de solución salina al 10%.
- b) Tiempo de lavado (agitación).
- c) Tiempo de reposo.

Igualmente estos factores, como en los casos anteriores no fueron modificados para la muestra de hígado de pollo, respetándose los mismos lineamientos establecidos en esta etapa para hígado de res.

A la fase orgánica se le adicionan 2 mL de solución salina al 10% se agita y se deja reposar por espacio de 4 minutos, una vez pasado ese tiempo se procede a separar la fase acuosa (capa inferior) de la orgánica transfiriéndola a un primer vaso de precipitado, a la fase orgánica restante (capa inferior) se le adicionan nuevamente 2 mL de solución salina al 10% realizando con ello otros dos lavados sucesivos.

A cada uno de los tres vasos con las soluciones acuosas se procedió a medirles su pH, obteniéndose los siguientes valores promedio: en el primer vaso de precipitados un pH de 8.5 en el segundo vaso de precipitados un pH de 7.5 y en el tercer vaso de precipitados se obtuvo un pH de 7, lo cual indica que es en el tercer lavado con solución salina cuando se obtiene un pH neutro en el medio.

Cabe mencionar un punto muy importante, durante el tercer lavado en algunas ocasiones se observó la formación de una emulsión después de 30 segundos de agitación, lo cual indica que se puede presentar el fenómeno de exceso de superficie, para “romper” la emulsión se puede proceder a realizar alguno de los siguientes procedimientos:

- 1.- Se separa la emulsión en dos fases colocando una de ellas en otro vial y agregando a cada una de ellas 1 mL de solución salina al 10% agitando en forma horizontal por 30 segundos, este tratamiento se realizó en forma individual para cada vial hasta lograr separar la fase acuosa de la orgánica.
- 2.- Se transfiere la emulsión formada en el vial en un vaso de precipitados, posteriormente se agrega sal de grano (sin medir exactamente la cantidad) se agita la solución por espacio de 30 segundos por medio de una espátula hasta lograr la total separación de la fase acuosa y la orgánica.

De la aplicación de estos dos procedimientos en este trabajo se pudo observar que el segundo procedimiento logró ser más efectivo para la ruptura de la emulsión ya que inmediatamente de agregar la sal de grano a la emulsión y agitarla por el tiempo establecido se observa su inmediata ruptura.

Finalmente después de este lavado se transfiere la fase orgánica adicionalmente a un cartucho con 3.5g de sulfato de sodio anhidro como adsorbente; conectado a un sistema de vacío.



Fig. 6. Extracción.



Fig. 7. Deshidratación del analito.

Etapas 4. Purificación.

Al llegar a este paso del proceso de extracción se obtiene en la fase orgánica (o no saponificable) además de la vitamina A (que es la sustancia de interés) éter etílico y todas aquellas grasas y derivados grasos que no fueron digeridos durante la hidrólisis alcalina y no solubles en la parte saponificable, tal como colesterol, esteroides, etc ²⁵; por lo que se utiliza un cartucho de extracción en fase sólida para obtener el extracto de vitamina A libre de estas otras impurezas, ya que estas últimas fueron retenidas en el cartucho mientras que la vitamina A eluye por la columna. Se respetó el procedimiento de purificación realizado para el extracto de vitamina A de hígado de res.

Procedimiento de la purificación.

El extracto orgánico puro libre de humedad y de un medio alcalino se transfirió a una columna de sílica gel previamente acondicionada con 6 mL de éter etílico y conectada al vacío.



Fig. 8. Purificación.

Etapa 5. Concentración.

En este punto se obtuvo el extracto etéreo con vitamina A ya que esta etapa tuvo como función evaporar el éter etílico por baño María para su eliminación hasta obtener una pasta de consistencia oleosa. Finalmente este extracto oleoso se disolvió con metanol para poder inyectarlo al Cromatógrafo de Líquidos y cuantificar su concentración (equivalentes de vitamina A / 100 g de muestra). Se respetó el procedimiento validado para hígado de res.

FASES II Y III. MODIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN HÍGADO DE POLLO Y SU APLICACIÓN PARA LAS MUESTRAS HÍGADO DE CERDO Y TIBURÓN.

La fase II de trabajo experimental tuvo como propósito aplicar el método de extracción de vitamina A validado en hígado de res en hígado de pollo para después realizar modificaciones en alguno(s) factor(es) de control de alguna de las etapas con el fin de hacer óptimo el método para la muestra de hígado de pollo, sobre todo pensando en la disminución de cantidad de reactivos, de muestra y de tiempo de análisis. Igualmente para la fase III se realizaron estas modificaciones aplicadas primeramente en hígado de pollo, pero ahora para

las muestras de hígado de cerdo y tiburón, con el fin de realizar una comparación estadística de los resultados obtenidos.

A continuación se mencionará la etapa de la metodología de extracción de vitamina A, el factor de control modificado así como la finalidad de dicha modificación.

Etapa 1. Preparación de muestra.

Factor de control modificado: Cantidad de muestra.

En forma similar que en hígado de pollo, para la muestra de trabajo hígado de tiburón se realizó una disminución en la cantidad de muestra debido a que también en este caso el peso promedio de ésta fue menor en comparación con el peso del hígado de res. En contraparte para hígado de cerdo no se modificó la cantidad de muestra a utilizar ya que posee un peso promedio muy cercano al de hígado de res, de modo que para ésta se respetó la cantidad de muestra establecida para hígado de res.

Para el caso de estas dos últimas muestras, se utilizaron dos de cada una de ellas, todas de la misma región del país y del mismo establecimiento en función de la fuente de obtención, para evitar -como en el caso de la muestra de hígado de pollo- grandes variaciones en los resultados obtenidos, de acuerdo a esto último se obtuvieron los siguientes pesos promedios:

Hígado de cerdo:

Muestra 1: 856 g

Muestra 2: 1,586 g

Peso promedio: 1,221 g

Hígado de tiburón:

Muestra 1: 73.1667 g

De acuerdo a los pesos obtenidos se decidió reducir la cantidad registrada para hígado de tiburón ya que el peso obtenido fue mucho menor en comparación con el hígado de res. De acuerdo a esto último la cantidad de muestra a utilizar para el análisis fue de aproximadamente:

Hígado de cerdo: 800 g

Hígado de tiburón: 73 g

En forma similar, estas muestras fueron pesadas y se procedió a cortarlas en trozos pequeños y de acuerdo a los pesos registrados para cada una de ellas se realiza la

modificación en la cantidad de acetona adicionada, esto se realiza tomando en cuenta la proporción que se usó en la metodología para hígado de res:

$(40 \text{ mL de acetona} / 800 \text{ g de hígado de res}) * (73 \text{ g de hígado de tiburón}) = 4 \text{ mL de acetona.}$
por tanto los resultados finales para el acondicionamiento de cada una de las muestras fueron:

- 800 g de hígado de cerdo + 40 mL de acetona.
- 73 g de hígado de tiburón + 4 mL de acetona.

Etapa 2. Digestión alcalina.

Factor de control modificado: Para esta etapa se procedió a modificar:

- Tiempo de proceso.
- Temperatura de calentamiento.
- Velocidad de agitación.

En cuanto al tiempo de calentamiento se respetaron los 30 minutos de reflujo estipulados para esta etapa durante la metodología de extracción de vitamina A en hígado de res, sin embargo en este caso fue dividido en tres estadios disminuyéndose la temperatura en cada uno de ellos y la velocidad de agitación en forma lineal. El primer estadio consistió en el calentamiento a nivel 3 (equivalente a 102 °C en la superficie de la parrilla y 85 °C en agua) y una velocidad de agitación a nivel 2 (equivalente a 84 °C en la superficie de la parrilla y a 72 °C en agua) con duración de 10 minutos con este calentamiento y velocidad de agitación que son los de mayor magnitud de los tres estadios. Como fue el inicio de la digestión alcalina fue necesario que este estadio tuviera los valores máximos de energía y de agitación y además permitió la total dispersión de la muestra en el medio de reacción, al final de este estadio se observó el inicio del reflujo.

A partir del inicio del reflujo se contaron los 30 minutos de calentamiento los cuales se dividieron en los siguientes dos estadios. El segundo estadio tuvo una duración de 10 minutos, disminuyendo el calentamiento a nivel dos y a una agitación con nivel 1 (equivalente a 38 °C en la superficie de la parrilla y a 43 °C en agua), es el estadio con niveles intermedio de calentamiento y agitación. El tercer estadio que son los siguientes 20 minutos consistió en una disminución del calentamiento a nivel 1 con ausencia de agitación, este estadio tiene como objetivo completar los 30 minutos de reflujo.

Cabe mencionar que los niveles de energía representan las diferentes temperaturas trabajadas no se dan valores numéricos pues la parrilla de calentamiento que fue utilizada no

los marca, sin embargo una mayor temperatura posee un mayor nivel de calentamiento y viceversa, lo mismo aplica para la agitación.

La razón por la cual se llevaron a cabo estas modificaciones en la etapa de digestión alcalina es por la diferencia que existe en la energía de una reacción química conforme transcurre el tiempo de este proceso.

Hay que recordar que un concepto muy importante a considerar en una reacción química es el estudio de la estructura del sistema reaccionante así conforme se desarrolla la reacción cada configuración de los átomos durante el procedimiento de cambio de reactivos a productos tiene una energía asociada a ella - puesto que una reacción química implica por lo común acercar a los reactivos y generar rupturas en los enlaces - estas estructuras tienen comúnmente energías mayores que los reactivos aislados. De acuerdo con lo anterior; se puede decir que conforme los reactivos se acercan entre sí y comienzan a sufrir cambios a nivel molecular para convertirse en productos, la energía potencial del sistema reaccionante va en aumento, así conforme transcurre la reacción esta energía potencial sigue en aumento hasta que el sistema de reacción llega a una estructura de energía máxima y a partir de ella se siguen desarrollando cambios a nivel molecular que culminarán en los productos intermedios cuyas estructuras tienen una energía potencial cada vez menor hasta llegar a los productos finales establecidos.

De acuerdo con lo explicado anteriormente, existe una diferencia de energía entre los reactivos y la estructura de energía máxima por la que atraviesa el sistema en su trayectoria para llegar a los productos, la cual corresponde a la energía de activación de la reacción, la cual corresponde a la energía máxima de una estructura definida denominada estado de transición.

La estructura del estado de transición es importante, ya que a partir de ella es posible predecir la velocidad de una reacción si se calcula su energía, por ello el paso que comprende este estado de transición es la fase determinante de la velocidad.

La hidrólisis alcalina de un éster es una *reacción* con productos intermedios y por ello representa un perfil de reacción más compleja que muchos otros sistemas, ya que involucra dos estados de transición en vez de uno solo. El perfil de esta reacción corresponde a las ecuaciones:



De acuerdo con lo que se explicó anteriormente, las energías potenciales relativas desarrolladas por las estructuras que desarrollan este perfil de reacción corresponden a las velocidades relativas k .

Así:

$$k_2 > k_1 > k_3 > k_4$$

por lo tanto el perfil de esta reacción es el que se muestra en la figura 9.

Como es posible observar, la hidrólisis alcalina de un éster involucra varias estructuras entre reactivos, intermediario y productos finales, las cuales poseen diferentes niveles de energía potencial a la par de estas observaciones hay que considerar los dos estados de transición que presenta la reacción lo que en conjunto determinan la velocidad de esta reacción, de ahí que los factores de control: velocidad de agitación, tiempo y temperatura de proceso hayan sido modificados en la etapa de digestión alcalina.

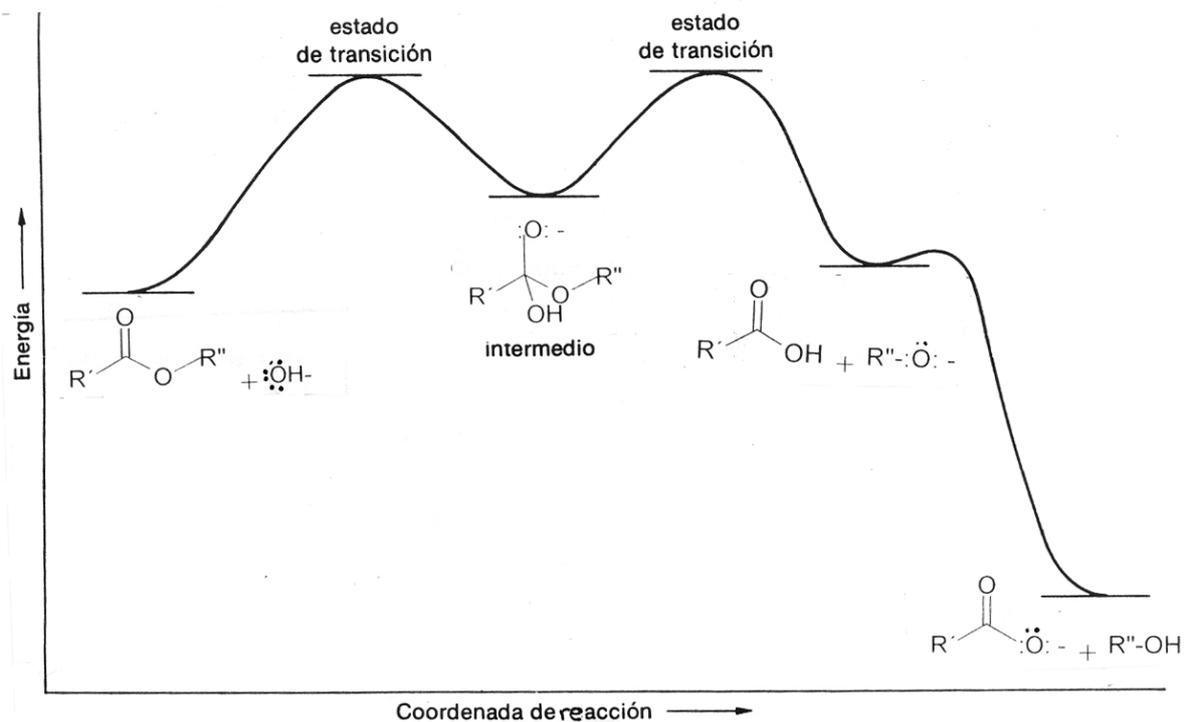


Fig. 9. Perfil de la reacción de la hidrólisis de un éster.

Etapa 3. Extracción.

Factor de control modificado: Para esta etapa se procedió a modificar:

- Tiempo de agitación.
- Tiempo de reposo.

El procedimiento de esta etapa fue el mismo, sólo que para esta fase del trabajo experimental, en las tres extracciones el tiempo de agitación se redujo a un minuto y el tiempo de reposo a 3 minutos.

Como se mencionó anteriormente, en forma adicional, la vitamina A pasa a través de tres lavados sucesivos. En este lavado se modificaron:

- Tiempo de lavado (agitación).
- Tiempo de reposo.

En forma similar a la extracción, para el lavado se respetó el procedimiento anteriormente descrito, solo que en este caso el tiempo de lavado se redujo a 2 minutos en los dos primeros lavados y a 1 minuto en el tercer lavado, mientras que el tiempo de reposo se redujo a 3 minutos para cada uno de los lavados.

Estas modificaciones se realizaron para disminuir el tiempo de la metodología de extracción de vitamina A trayendo como consecuencia menor degradación de la vitamina A.

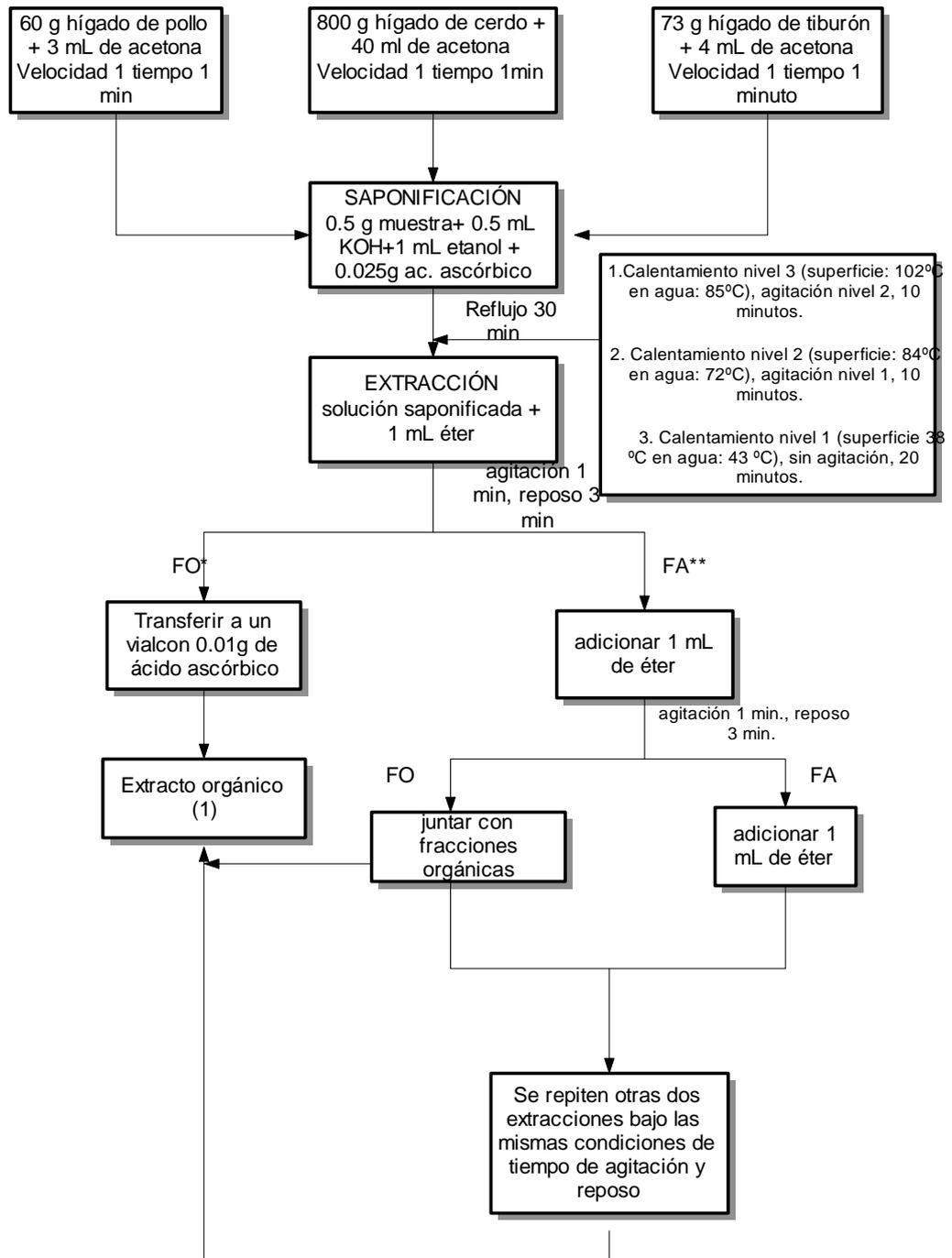
Finalmente, para cada una de las muestras trabajadas en este proyecto se respetaron los procedimientos de purificación y concentración realizados para el extracto de vitamina A en hígado de res.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta fase se estableció el siguiente diagrama de extracción de vitamina A optimizado para las diferentes muestras trabajadas en esta tesis.

DIAGRAMA DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A MODIFICADO

PARA TRES MUESTRAS DISTINTAS:

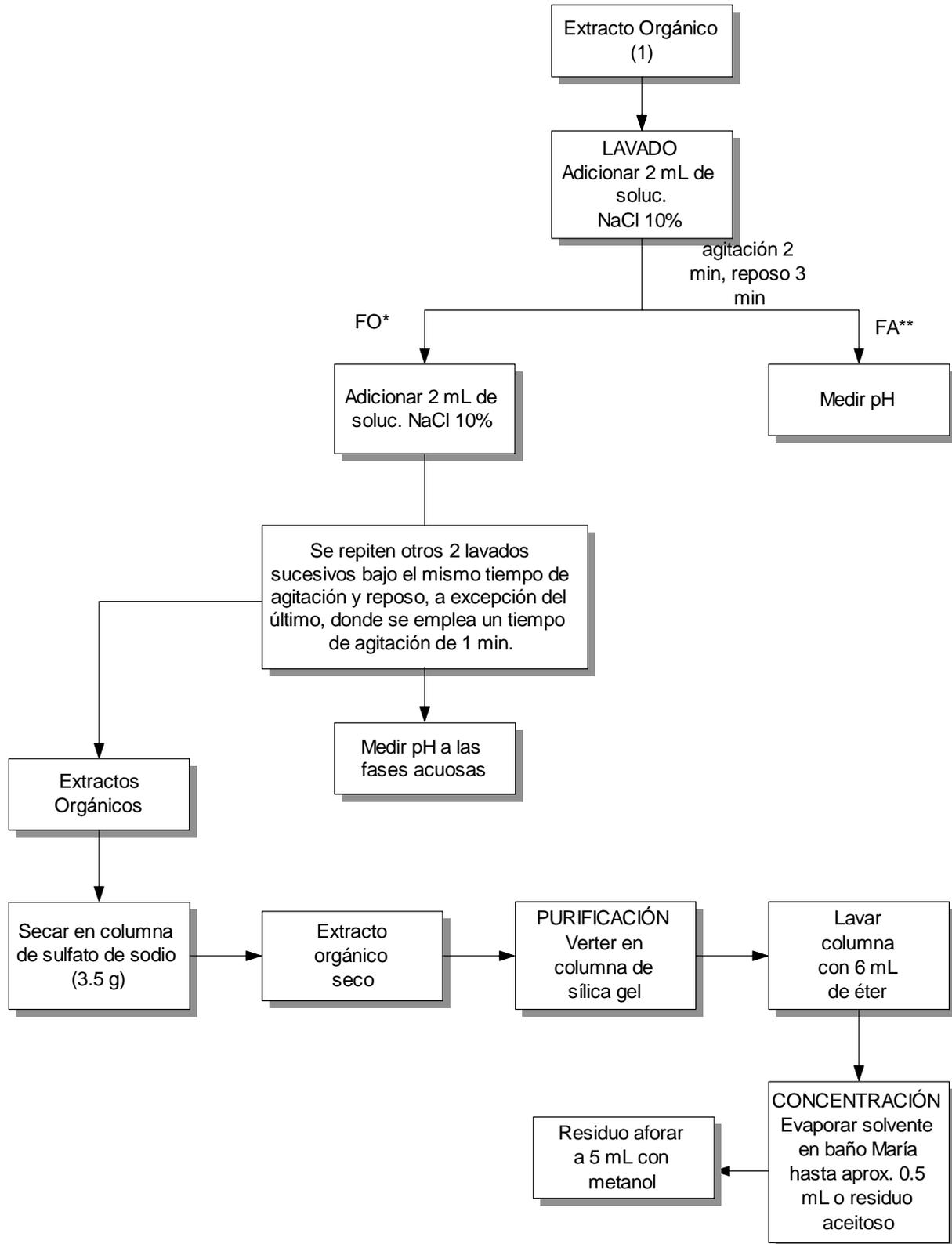
HÍGADO DE POLLO, HÍGADO DE CERDO E HÍGADO DE TIBURÓN



FO* Fase Orgánica

FA** Fase Acuosa

Continuación del diagrama:



FO* Fase Orgánica

FA** Fase Acuosa

FASE IV. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO POR CLAE.

ANÁLISIS CUALITATIVO

En esta etapa del desarrollo experimental, se utilizó el método validado por Adriana Ramírez¹ incluyendo las modificaciones realizadas en la metodología planteada por Susana I. Martínez² para el análisis de vitamina A en hígado y de esta forma se pudieran comparar los tiempos de retención del analito de interés con el del estándar, por lo que se utilizaron las condiciones empleadas en dichos trabajos, para la parte del análisis cualitativo.

- Fase estacionaria: Columna de fase inversa de Nucleosil C-18 (fase químicamente unida de octadecil) con tamaño de partícula de 5 μ m, tamaño de poro de 100 Å con dimensiones de 150 mm de longitud x 4 mm de diámetro interno.
- Fase móvil: 92% metanol-8% Agua.
- Flujo: 2 mL/min.
- Volumen de inyección: 10 μ L.
- Detector: UV a una $\lambda = 325$ nm.
- Sensibilidad: 0.01

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Se procedió a cuantificar el contenido de vitamina A en cada muestra trabajada en μ g de vitamina A / 100 g de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la sección de “Resultados”.

Se compararon los resultados obtenidos de vitamina A obtenida en cada muestra de hígado con los reportes encontrados en la literatura^{24,25} y entre las mismas muestras trabajadas.

FASE V. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN (A PARTIR DEL ESTUDIO DE REPETIBILIDAD) DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A APLICADA A LAS MUESTRAS DE HÍGADO DE POLLO, CERDO Y TIBURÓN, Y EL ANÁLISIS DE RECOBRO EN HÍGADO DE POLLO APLICANDO EL MÉTODO BASE (SIN MODIFICACIONES) Y EL MÉTODO MODIFICADO.

PRECISIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA “A”.

Para determinar la precisión de la metodología de extracción de vitamina A en cada una de las muestras trabajadas en este proyecto, se procedió a realizar un estudio de repetibilidad en ambos métodos estudiados para cada una de las muestras trabajadas.

Posteriormente, se realizó un estudio de recobro para conocer la cantidad de vitamina A recuperada durante la extracción de vitamina A igualmente aplicando la metodología sin modificaciones y en la metodología sin ellas.

REPETIBILIDAD DE LA METODOLOGÍA.

A) APLICANDO EL MÉTODO BASE DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN HÍGADO DE RES (MÉTODO DE EXTRACCIÓN SIN MODIFICACIONES).

Se emplearon dos muestras de hígado de pollo y cada una de éstas se trabajó por separado produciendo 8 extractos de vitamina A por cada una de ellas, obteniendo dos extractos por día durante cuatro días por espacio de dos semanas. Finalmente, se inyectaron los extractos obtenidos por triplicado en el cromatógrafo de líquidos. Cabe mencionar, que este estudio de repetibilidad se realizó por un mismo analista (la que escribe esta tesis) utilizando el mismo instrumento, reactivos, aparatos y con las mismas condiciones ambientales de trabajo para evitar variaciones en los resultados. Estos resultados fueron sometidos finalmente a pruebas estadísticas para saber si tienen la misma precisión y por lo tanto una misma repetibilidad.

B) APLICANDO EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A CON MODIFICACIONES.

Para este estudio, se realizó el mismo procedimiento experimental explicado anteriormente, la única diferencia es que en este caso, se emplearon dos muestras de para hígado de pollo y de cerdo, y una para la de hígado de tiburón.

RECOBRO.

A una muestra anteriormente procesada (muestra 2 de hígado de pollo) se le adicionó una concentración de 46,778.7 µg del estándar de vitamina A / 100 g de hígado de res, para después ser analizada mediante el método de extracción de vitamina A base y por el método de extracción de vitamina A modificado realizando posteriormente la cuantificación de vitamina A. El cálculo se realizó haciendo una comparación de la cantidad de vitamina A que se debía obtener (considerando la adición del estándar de vitamina A) con la que se obtiene una vez analizada la muestra y considerando la pérdida de vitamina A que se obtuvo durante la metodología de extracción de vitamina A en hígado de res (como posteriormente se explicará en los resultados), dando el resultado en porcentaje.

Así:

$$\% \text{ Recobro} = [\text{Conc. de vitamina A experimental} / \text{Conc. de vitamina A teórica}] * 100$$

RESULTADOS

Para un mejor entendimiento del trabajo realizado en esta tesis se procederá a citar los resultados obtenidos y el análisis de estos conforme se van tratando en este capítulo:

ANÁLISIS CUALITATIVO

Para esta parte del proyecto se procedió en primer lugar a verificar el tiempo de retención de vitamina A en la columna, utilizando para ello un estándar de retinol con concentración de 95 ppm (95 mg de retinol / L de disolución). Cabe mencionar, que este estándar ya se había utilizado anteriormente en conjunto con otros estándares de diferente concentración para el cálculo del factor de respuesta y la linealidad del sistema (instrumento) en el método validado para análisis de vitamina A en hígado de res, obteniendo una respuesta lineal (Áreas) por parte del instrumento.

En este caso, se procedió a inyectar cinco veces el estándar de retinol con concentración de 95 ppm:

Tabla 10. Tiempos de retención del estándar de retinol de concentración de 95 ppm.

<i>Inyección</i>	<i>Tiempo de retención; tr (min)</i>
1	3.2
2	3.2
3	3.2
4	3.2
5	3.1
	promedio = 3.18
	s = 0.04
	CV = 1.3%

Se observa que el retinol presenta un tiempo de retención promedio de 3.2 minutos.

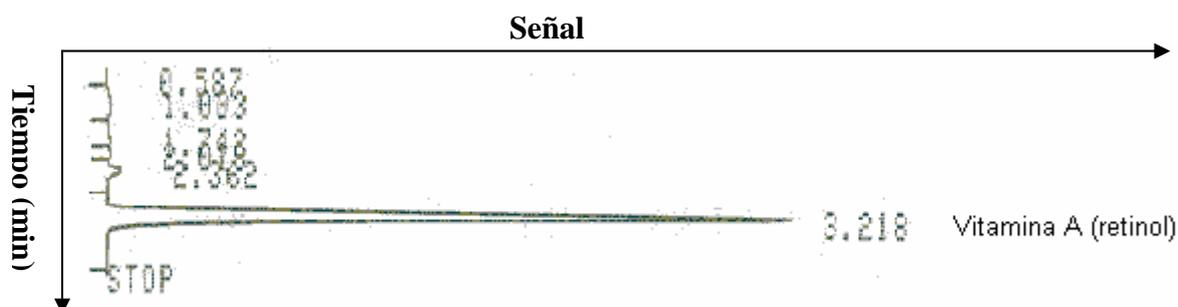


Fig. 10. Cromatograma del estándar de retinol.

A continuación se presentan ejemplos de los cromatogramas obtenidos de cada muestra trabajada:

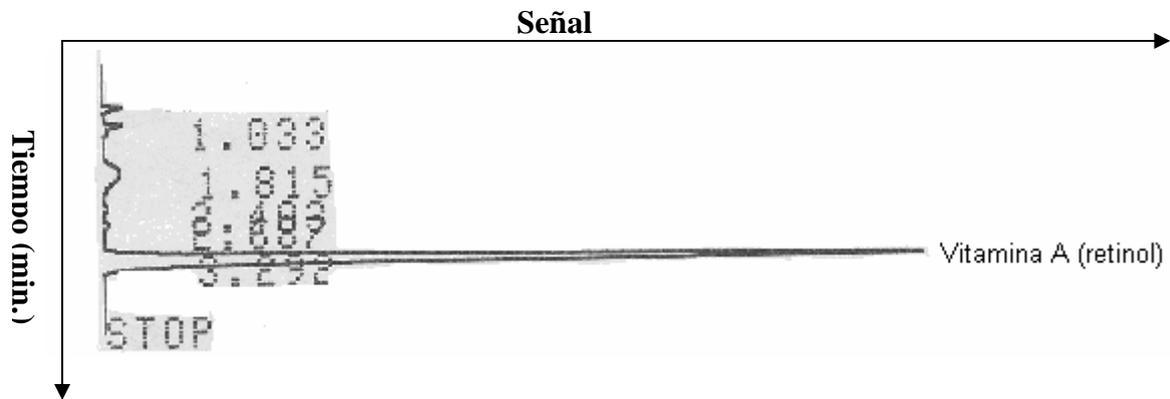


Fig. 11. Cromatograma de retinol extraído de hígado de pollo.

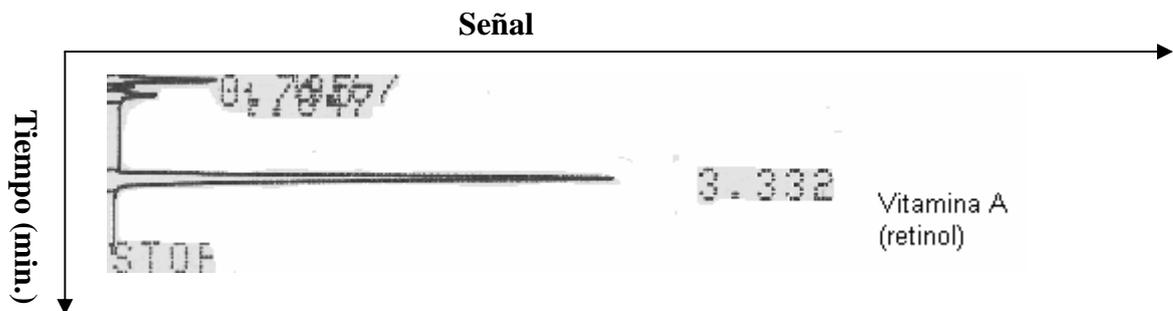


Fig. 12. Cromatograma de retinol extraído de hígado de cerdo.

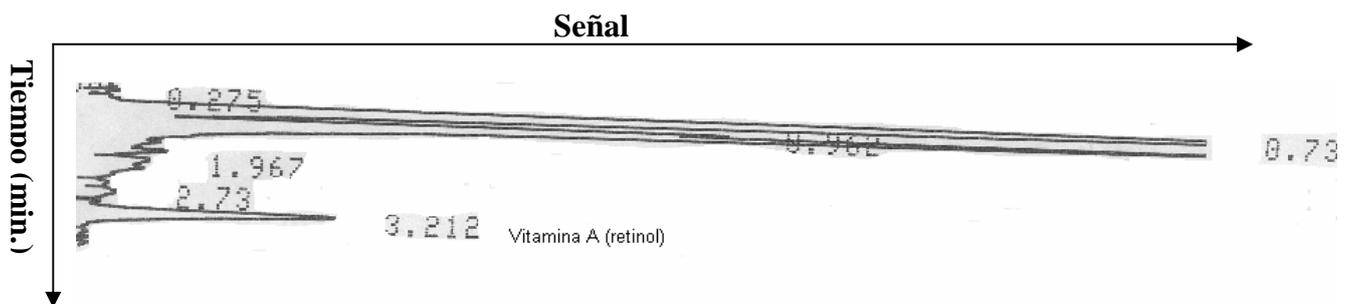


Fig. 13. Cromatograma de retinol extraído de hígado de tiburón.

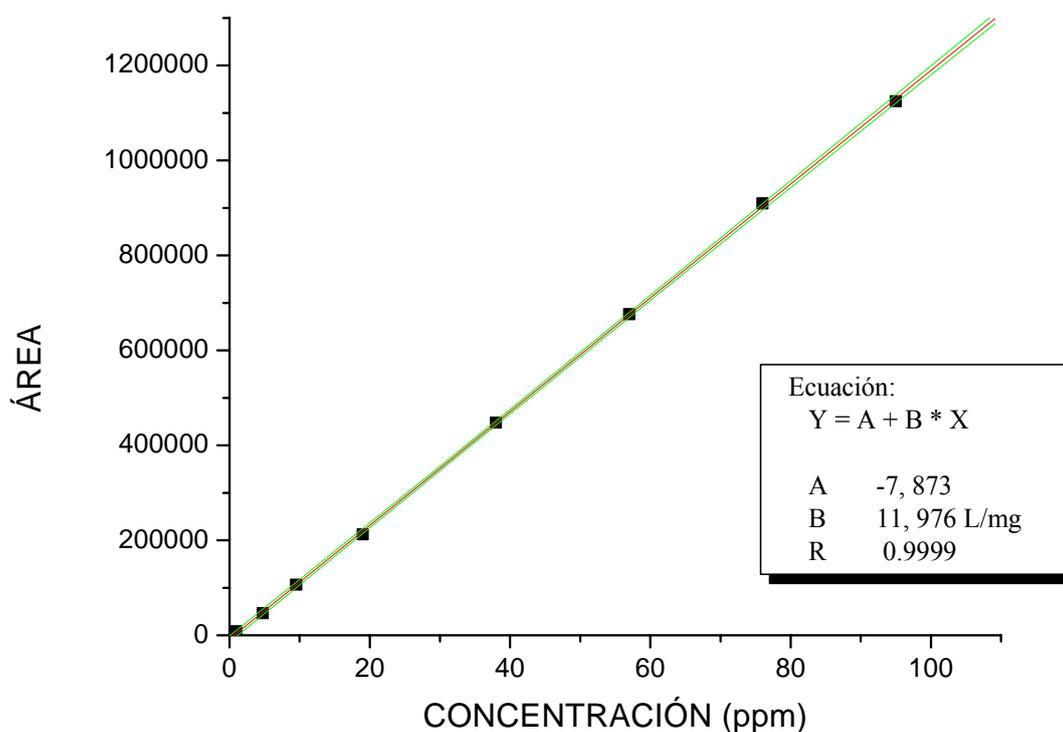
Es posible observar, que las tres muestras: hígado de pollo, hígado de cerdo e hígado de tiburón presentan el pico característico de la vitamina A, y al comparar el tiempo de retención obtenido en cada uno de los cromatogramas de las muestras con el cromatograma del estándar, se observa que el tiempo de retención es el mismo, por lo que se confirma la presencia de vitamina A en los extractos trabajados.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad en diferentes matrices.

Como se explicó anteriormente, para esta sección se procedió a reportar la concentración de vitamina A como μg de retinol / 100 g de hígado una vez inyectado por triplicado los extractos de cada una de las muestras en el cromatógrafo de líquidos.

Para realizar el análisis cuantitativo se trabaja el método del estándar externo aprovechando el estudio² de linealidad y precisión del sistema que ya se había realizado previamente, y en la que se obtuvieron la siguiente curva de calibración y resultados de regresión lineal:



Gráfica 1. Curva patrón de vitamina A (retinol) en metanol en un intervalo de 1 a 100ppm aproximadamente.

Tabla 11. Datos de las disoluciones estándar para la regresión lineal

Concentración (ppm)	Área	Área	Área
0.95	8,387	8,497	8,392
4.75	46,634	47,003	46,448
9.50	107,845	104,587	107,436
19.0	212,903	213,127	212,017
38.0	448,499	448,493	446,371
57.0	679,706	669,688	678,848
76.0	911,540	907,847	908,809
95.0	1,129,835	1,111,108	1,132,820

Como se puede observar en la gráfica obtenida se presenta una tendencia lineal en nuestro sistema y además tiende al origen, siendo comprobado además por pruebas estadísticas y de hipótesis para validar dichos resultados.

Los resultados obtenidos dan un factor de respuesta (Fr) de 11,976.22 L/ mg (pendiente de la curva de calibración) con un intervalo de confianza de $11,976.22 \pm 78.99$ L/ mg, por lo tanto, la ecuación cuantitativa que utilizaremos es la ecuación básica aplicada en cromatografía al aplicar el método de estándar externo:

$$\text{Área} = (\text{Fr})(\text{Concentración de vitamina A})$$

y despejando la concentración de la ecuación se tiene entonces que:

$$\text{Concentración de vitamina A} = \text{Área} / \text{Fr}$$

por lo tanto a partir de la ecuación anterior, se procedió a calcular la concentración de vitamina A obtenido en las diferentes muestras de hígado trabajadas, para posteriormente calcular como se explicó anteriormente la precisión del método como repetibilidad.

Los resultados obtenidos serán citados conforme a las fases de trabajo explicadas en la metodología.

También ese estudio demostró que el sistema cromatográfico cumple en tener una precisión mayor al 95% en la zona del intervalo en que se trabajo la linealidad del sistema.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los análisis efectuados en las matrices de hígado de pollo, cerdo y tiburón, posteriormente el proceso estadístico realizado a estos resultados y la discusión de éstos.

I. RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN LA MUESTRA DE HÍGADO DE POLLO APLICANDO LA METODOLOGÍA SIN MODIFICACIONES.

Tabla 12. Concentración de vitamina A en hígado de pollo (Muestra 1).

<i>Número de análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol / 100 g de hígado)</i>
1	371,464	29,173.1
	334,454	26,266.5
	235,572	18,500.7
2	342,199	31,330.3
	349,472	31,996.2
	278,664	25,513.3
3	405,051	29,399.6
	412,883	29,968.1
	401,577	29,147.4
4	277,988	28,935.0
	269,533	28,055.0
	290,095	30,195.2
5	324,421	33,059.3
	313,669	31,963.6
	317,787	32,383.3
6	300,796	29,744.3
	307,165	30,374.1
	315,081	31,156.9
7	280,373	34,166.4
	280,893	34,229.8
	290,266	35,372.0
8	357,052	33,513.3
	373,080	35,017.7
	361,212	33,903.8

Tabla 13. Concentración de vitamina A en hígado de pollo (Muestra 2).

<i>Número de análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (µg de retinol / 100 g de hígado)</i>
1	368,688	26,900.6
	396,418	28,923.8
	383,151	27,955.8
2	361,402	26,986.8
	361,925	27,025.9
	377,374	28,179.5
3	455,463	27,423.3
	466,844	28,108.5
	470,796	28,346.5
4	355,569	28,619.2
	355,654	28,626.1
	348,706	28,066.8
5	216,540	26,699.4
	213,545	26,330.1
	215,157	26,528.9
6	256,856	27,817.3
	257,962	27,937.1
	250,866	27,168.6
7	323,841	29,277.1
	320,654	28,989.0
	320,403	28,966.3

II. RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN LA MUESTRA DE HÍGADO DE POLLO APLICANDO LA METODOLOGÍA CON MODIFICACIONES.

Tabla 14. Concentración de vitamina A en hígado de pollo (Muestra 3).

<i>Número de análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol / 100 g de hígado)</i>
1	464,375	37,492.5
	508,400	41,047.0
	464,876	37,533.0
2	384,666	32,222.3
	362,829	30,393.1
	350,078	29,324.9
3	319,326	40,107.3
	288,676	36,257.7
	232,626	29,217.8
4	429,730	33,156.5
	425,014	32,792.6
	365,905	28,232.0
5	166,416	18,879.8
	162,445	18,429.3
	297,646	33,767.8
6	334,809	32,820.1
	363,321	35,615
	305,964	29,992.5
7	231,173	25,291.8
	277,954	30,409.9
	254,670	27,862.5
8	548,916	33,721.2
	509,689	31,311.4
	507,155	31,155.7

Tabla 15. Concentración de vitamina A en hígado de pollo (Muestra 4).

<i>Número de análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (µg de retinol / 100 g de hígado)</i>
1	265,244	21,515.0
	256,933	20,840.9
	261,270	21,192.7
2	154,453	18,143.8
	156,203	18,349.4
	152,227	17,882.4
3	119,255	17,299.6
	98,440	14,280.1
	118,766	17,228.7
4	208,301	13,489.1
	219,613	14,221.7
	202,413	13,107.8
5	134,005	13,025.9
	139,442	13,554.4
	141,535	13,757.9
6	205,428	17,361.3
	185,165	15,648.8
	208,658	17,634.3
7	116,121	17,004.5
	120,448	17,638.1
	126,169	18,475.9
8	181,495	14,460.5
	179,154	14,273.1
	182,830	14,566.9

III. RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A EN LA MUESTRA DE HÍGADO DE CERDO Y TIBURÓN APLICANDO LA METODOLOGÍA CON MODIFICACIONES.

HÍGADO DE CERDO

Tabla 16. Concentración de vitamina A en hígado de cerdo (Muestra 1).

<i>Número de análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
1	105,678	11,507.5
	108,246	11,787.2
	109,423	11,915.4
2	131,735	14,538.4
	132,304	14,601.2
	126,197	13,927.2
3	191,171	24,972.7
	195,244	25,504.8
	194,661	25,428.6
4	132,477	12,895.4
	132,593	12,906.7
	132,137	12,862.3
5	335,682	31,443.8
	341,443	31,983.5
	342,457	32,078.5
6	346,716	30,346.3
	350,827	30,706.1
	350,787	30,702.6
7	239,186	18,142.9
	238,959	18,125.7
	238,372	18,081.2
8	199,737	19,579.5
	199,864	19,591.9
	198,651	19,473.0

Tabla 17. Concentración de vitamina A en hígado de cerdo (Muestra 2).

<i>Número de análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (µg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
1	399,839	41,055.2
	356,705	36,626.2
	370,610	38,054.0
2	523,994	38,420.2
	519,771	38,110.5
	516,525	37,872.5
3	158,849	16,206.9
	154,120	15,724.4
	151,833	15,491.1
4	78,081	10,787.0
	87,306	12,061.5
	86,460	11,944.6
5	577,819	42,848.3
	593,294	43,995.9
	604,140	44,800.2
6	234,774	17,305.2
	240,856	17,753.5
	248,501	18,317.0
7	341,495	39,168.2
	335,259	38,452.9
	265,431	30,443.9
8	358,073	25,823.7
	353,367	25,484.3
	354,510	25,566.7

HÍGADO DE TIBURÓN

Tabla 18. Concentración de vitamina A en hígado de tiburón (Muestra 1).

<i>Número de análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
1	2,414	149.2
	3,018	186.6
	1,888	116.7
2	1,663	193.8
	1,528	178.0
	1,622	188.1
3	2,828	163.0
	2,802	161.5
	2,541	146.4
4	2,563	320.2
	2,221	277.5
	2,284	285.3
5	2,359	204.0
	2,197	190.0
	2,006	173.5
6	2,568	212.6
	2,671	221.1
	2,965	245.4
7	2,809	178.9
	2,474	157.5
	2,956	188.2
8	2,021	111.9
	2,168	120.0
	2,192	121.3

IV. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA (REPETIBILIDAD) EN LAS DIFERENTES MUESTRAS.

Para esta sección se procedió a aplicar sobre los datos generados en el análisis cuantitativo los siguientes parámetros estadísticos:

La repetibilidad se calculó aplicando el método de extracción de vitamina A validado para hígado de res pero ahora aplicado para hígado de pollo (fase I del trabajo) y además se calculó para el método modificado en algunas condiciones de trabajo para las matrices hígado de cerdo, hígado de tiburón e hígado de pollo respectivamente (fases II y III del trabajo) a partir de los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo.

De acuerdo con lo anterior, se tienen los siguientes resultados estadísticos:

HÍGADO DE POLLO

Muestra 1

<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100g de hígado)</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
29,173.1	33,059.3
26,266.5	31,963.6
18,500.7	32,383.3
31,330.3	29,744.3
31,996.2	30,374.1
25,513.3	31,156.9
29,399.6	34,166.4
29,968.1	34,229.8
29,147.4	35,372.0
28,935	33,513.3
28,055	35,017.7
30,195.2	33,903.8

$n = \text{número de datos} = 24$

$\text{media} = 30,557$

$s_{\text{exp}} = 3,663.27$

$s^2_{\text{exp}} = 13,419,590$

$\text{Coeficiente de variación (C.V.)} = 12\%$

Se establece la siguiente prueba de hipótesis relativa a una variancia, donde el estadístico empleado es:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2}$$

dónde:

n = número de datos = 24

s² = variancia experimental = 13,419,590

σ₀² = variancia contra la que se va a comparar (teóricamente considerando un C.V. del 5%) es igual a 2,334,325.6

La prueba de hipótesis que se plantea para repetibilidad del método es:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

$$\chi_{cal.}^2 > \chi_{\alpha}^2$$

en tablas se encuentra que:

$$\chi_{\alpha}^2 = \chi_{0.05, 23}^2 = 35.17$$

y se obtiene que:

$$\chi_{calc}^2 = 132.22$$

Con lo anterior se puede concluir, que 132.22 > 35.17, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula por lo que el método para la extracción de vitamina A de hígado de pollo muestra 1 (sin modificar) no presenta una repetibilidad mayor del 95%.

Se realizó el cálculo de intervalo de confianza al 95% para la desviación estándar obtenida (s):

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para σ con el mismo nivel 1-σ.

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

así:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975,23}^2 = 11.7$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025,23}^2 = 38.08$$

$$\sqrt{\frac{(23)13\,419\,590}{38.08}} < s < \sqrt{\frac{(23)13\,419\,590}{11.7}}$$

$$2,847 < s < 5,136.2$$

$$2,847 < 3,663.27 < 5,136.2$$

El intervalo de confianza para la concentración encontrada en el hígado de pollo indicado como muestra 1 es:

$$\text{I.C.} = \bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0.025, 23} = 2.07$$

$$\text{I.C.} = 30,557 \pm 2.07 \frac{3,663.27}{\sqrt{24}}$$

$$\text{I.C.} = 30,557 \pm 1,547.9 \text{ } \mu\text{g de retinol/100g de hígado de pollo}$$

El cálculo estadístico descrito anteriormente se aplica para las otras muestras analizadas en este trabajo, por lo que a continuación solo se entregan los resultados individuales de cada muestra y el resultado final obtenido de las pruebas estadísticas.

HÍGADO DE POLLO

Muestra 2

<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100g de hígado)</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
26,900.6	26,699.4
28,923.8	26,330.1
27,955.8	26,528.9
26,986.8	27,817.3
27,025.9	27,937.1
28,179.5	27,168.6
27,423.3	29,277.1
28,108.5	28,989.0
28,346.5	28,966.3
28,619.2	
28,626.1	
28,066.8	

n = número de datos =21

media = 27,851

s exp = 887.8937

s² exp = 788,355.22

Coefficiente de variación (C.V.) = 3.2%

Muestra 3

<i>Concentración de Vitamina A (μg de retinol/ 100g de hígado)</i>	<i>Concentración de Vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
37,492.5	18,879.8
41,047.0	18,429.3
37,533.0	33,767.8
32,222.3	32,820.1
30,393.1	35,615.0
29,324.9	29,992.5
40,107.3	25,291.8
36,257.7	30,409.9
29,217.8	27,862.5
33,156.5	33,721.2
32,792.6	31,311.4
28,232.0	31,155.7

n = número de datos =24
 media = 31,543
 s exp = 5,521.35
 s^2 exp = 30,485,306
 Coeficiente de variación (C.V.) = 17.5%

Muestra 4

<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100g de hígado)</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
21,515.0	13,025.9
20,840.9	13,554.4
21,192.7	13,757.9
18,143.8	17,361.3
18,349.4	15,648.8
17,882.4	17,634.3
17,299.6	17,004.5
14,280.1	17,638.1
17,228.7	18,475.9
13,489.1	14,460.5
14,221.7	14,273.1
13,107.8	14,566.9

n = número de datos =24
 media = 16,456
 s exp = 2,597.58
 s^2 exp = 6,747,421.9
 Coeficiente de variación (C.V.) = 15.8%

HÍGADO DE CERDO

Muestra 1

<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100g de hígado)</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
11,507.5	31,443.8
11,787.2	31,983.5
11,915.4	32,078.5
14,538.4	30,346.3
14,601.2	30,706.1
13,927.2	30,702.6
24,972.7	18,142.9
25,504.8	18,125.7
25,428.6	18,081.2
12,895.4	19,579.5
12,906.7	19,591.9
12,862.3	19,473.0

n = número de datos =24
 media = 20,546
 s exp = 7,511.74
 s^2 exp = 56,426,238
 Coeficiente de variación (C.V.) = 36.5%

Muestra 2

<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100g de hígado)</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
41,055.2	42,848.3
36,626.2	43,995.9
38,054	44,800.2
38,420.2	17,305.2
38,110.5	17,753.5
37,872.5	18,317.0
16,206.9	39,168.2
15,724.4	38,452.9
15,491.1	30,443.9
10,787.0	25,823.7
12,061.5	25,484.3
11,944.6	25,566.7

n = número de datos =24
 media = 28,430
 s exp = 11,855.6
 s^2 exp = 140,555,488
 Coeficiente de variación (C.V.) = 41.7 %

HÍGADO DE TIBURÓN

Muestra 1

<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100g de hígado)</i>	<i>Concentración de vitamina A (μg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
149.2	204.0
186.6	190.0
116.7	173.5
193.8	212.6
178.0	221.1
188.1	245.4
163.0	178.9
161.5	157.5
146.4	188.2
320.2	111.9
277.5	120.0
285.3	121.3

n = número de datos =24
media = 187
s exp = 53.59
s² exp = 2,871.8881
Coeficiente de variación (C.V.) = 28.6%

Tabla 19. Resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad en las muestras trabajadas.

Matriz (hígado)	Muestra	C.V. (%)	σ^2	s^2	χ^2_{calc}	χ^2_{α}	Decisión (5%)	Intervalos de confianza	
								Para s	Para concentración de vitamina A en μg de retinol/100 g de hígado ($\alpha/2= 0.025$)
Pollo	1	12	2,334,325	13,419	132.2	35.17	H ₀ se rechaza	2,847 < 3,663 < 5,136	30,557 ± 1,547.9
	2	3.2	1,939,195	887	8.13	31.40	H ₀ se acepta	679 < 887.9 < 1,282	27,851 ± 405
	3	17.5	2,487,402	30,485,306	281.9	35.17	H ₀ se rechaza	4,291 < 5,521 < 7,741	31,543 ± 2,332.9
	4	15.8	676,999	6,747,421	229.2	35.17	H ₀ se rechaza	2,018.8 < 2,597.6 < 3,642	16,456 ± 1,097.6
Cerdo	1	36.5	1,055,345	56,426,238	1,229.7	35.17	H ₀ se rechaza	5,938.6 < 7,511.7 < 10,862	20,546 ± 3,173.99
	2	41.7	2,020,662	140,555,488	1,599.9	35.17	H ₀ se rechaza	9,372.7 < 11,855.6 < 17,143.2	28,430 ± 5,009.43
Tiburón	1	28.6	87.42	2,871	755	35.17	H ₀ se rechaza	41.64 < 53.59 < 75.13	187 ± 23.14

Recobro.

Como se mencionó anteriormente, el estudio base era realizar el análisis de la extracción de vitamina A en hígado de pollo aplicando el método base y el método modificado, por lo anterior solo para esta matriz se realizó el estudio de recobro.

En este caso se aplicaron las 2 metodologías a la matriz 2 de hígado de pollo, en dónde se obtuvo en la parte de repetibilidad una concentración de 27,851.3 µg de retinol / 100g de hígado, pero ahora fortificándola con 46,778.7 µg de retinol / 100 g de hígado.

Por lo tanto para el cálculo de recobro hay que considerar que se indica² que se pierde por los sistemas de equilibrio que se tienen en las 3 etapas base de la metodología - extracción líquido-líquido, secado y purificación - un 4.4% de vitamina A, por lo que si consideramos que se pierde en la matriz de hígado de pollo sin fortificar debieron obtenerse 29,133.16 µg de retinol/ 100 g de hígado como valor real (ya que los 27,851.3 µg de retinol / 100 g de hígado representan el 95.6% de vitamina A) y considerando la cantidad de vitamina A agregada posteriormente a la matriz para fortificarla se esperaban en principio 75,911.86 µg de retinol / 100 g de hígado, por lo tanto considerando la pérdida de 4.4% de vitamina A (3,340.12 µg de retinol) se esperan obtener 72,571.73µg de retinol / 100g de hígado como valor real.

Por lo tanto, recordando que el recobro se obtiene como:

$$\% \text{ Recobro} = [\text{Conc. de vitamina A experimental} / \text{Conc. de vitamina A teórica}] * 100$$

Tabla 20. Matriz 2 de hígado de pollo fortificado aplicando el método sin modificaciones.

<i>Análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (µg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
1	408,399	44,529.7
	402,337	43,868.7
	397,565	43,348.4
2	461,691	51,579.7
	470,250	52,535.9
	466,950	52,167.2
3	543,951	52,218.1
	537,526	51,601.3
	533,764	51,240.1
4	735,962	48,725.0
	738,355	48,883.4
	747,342	49,478.4

n = número de datos =12

media = 49,181.3

s exp = 3,431.2

s² exp = 11,773,360

Coefficiente de variación (C.V.) = 7 %

El intervalo de confianza para la concentración encontrada por el método base de extracción de vitamina A aplicado en el hígado de pollo fortificado es:

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0.025, 11} = 2.2$$

$$I.C. = 49,181.3 \pm 2.2 \frac{3,431.2}{\sqrt{12}}$$

I.C. = 49,181.3 ± 2,179.1 µg de retinol/100g de hígado de pollo fortificado.

Aplicando la fórmula ya mencionada anteriormente:

[(49,181.3µg de retinol/100g de hígado) / (72,571.73µg de retinol/100g de hígado)]*100 = 67.8%

Por lo tanto el recobro que se obtuvo con el método base de extracción de vitamina A fue de 67.8% (≈68%).

Tabla 21. Matriz 2 de hígado de pollo fortificado aplicando el método con modificaciones.

<i>Análisis</i>	<i>Área</i>	<i>Concentración de vitamina A (µg de retinol/ 100 g de hígado)</i>
1	630,340	56,887.9
	594,663	53,668.0
	599,096	54,068.1
2	468,748	51,813.5
	473,689	52,359.6
	474,451	52,443.9
3	450,796	45,769.6
	457,373	46,437.4
	458,631	46,565.1
4	479,420	55,971.8
	477,706	55,771.7
	471,025	54,991.7

n = número de datos =12

media = 52,229

s exp = 3,918.89

s² exp = 15,357,354

Coefficiente de variación (C.V.) = 7.5 %

El intervalo de confianza para la concentración encontrada por el método de extracción de vitamina A modificado aplicado en el hígado de pollo fortificado es:

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0.025, 11} = 2.2$$

$$I.C. = 52,229 \pm 2.2 \frac{3,918.9}{\sqrt{12}}$$

I.C. = 52,229 ± 2,488.8 µg de retinol/100g de hígado de pollo fortificado.

Aplicando la fórmula ya mencionada anteriormente:

$$[52,229\mu\text{g de retinol}/100\text{g de hígado}) / (72,571.73 \mu\text{g de retinol}/100\text{g de hígado})]*100 = 71.97\%$$

Por lo tanto el recobro que se obtuvo con el método base de extracción de vitamina A fue 71.97% (72%).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos en el análisis estadístico, es posible realizar la siguiente discusión:

- ▲ Como se puede observar en los cromatogramas obtenidos la metodología permite obtener extractos bastante limpios de otros compuestos químicos (y se encuentran a muy baja concentración) que no sean la vitamina A en las matrices de hígado de pollo y cerdo, pero en el caso de la matriz de hígado de tiburón si se tiene la presencia de otros compuestos químicos a una gran concentración (probablemente iguales o mayores a la vitamina A) aunque en los 3 casos no se tiene un problema de resolución de la vitamina con estos compuestos.
- ▲ Al aplicar en la matriz hígado de pollo, el método base de extracción de vitamina A ya validado sin modificaciones se observa que el coeficiente de variación (C.V.) para la matriz 1 fue mayor al 5% - cabe mencionar que dicho coeficiente se aplica cuando se plantean metodologías analíticas, de ahí que se tome como referencia para analizar los resultados, además de que en el caso de hígado de res se logró cumplir por el analista que planteo la metodología² – lo anterior es normal, ya que en la primera prueba cuando el analista todavía no tiene una gran habilidad y conocimiento de la metodología, por lo que le sirve como aprendizaje dicha primera prueba de repetibilidad y aún un valor de 12% en el C.V. al trabajar con matrices complejas como el hígado se puede considerar que es bueno.
- ▲ Como se podía esperar ya con un buen conocimiento de la metodología se pudo mejorar el resultado obtenido con la matriz de la muestra 2, esto es, un C.V. del 3.2% que es menor al planteado (5%) lo que permite obtener una buena repetibilidad.
- ▲ Al aplicar el método de extracción de vitamina A modificado a las matrices de hígado de pollo (muestras 3 y 4), hígado de cerdo e hígado de tiburón, los coeficientes de variación obtenidos son mayores al 5%, obteniéndose un C.V. máximo de 17.5, 41.7 y 28.6% para hígado de pollo, hígado de cerdo e hígado de tiburón respectivamente. Estos resultados a excepción del obtenido para hígado de cerdo son aceptables para matrices complejas, aunque por la optimización que se ha logrado al trabajar la matriz de hígado

de res y pollo en el que se ha disminuido el C.V. a menos del 5%, optimizando el trabajo experimental seguramente se podrá lograr eso con las matrices de hígado de cerdo y tiburón.

- ▲ Con respecto a la verificación de las modificaciones realizadas sobre el método base es posible observar en la sección del desarrollo experimental; que una de las modificaciones efectuadas en la metodología base de extracción de vitamina A fue en la etapa de digestión alcalina (modificando los parámetros temperatura y tiempo de calentamiento así como la velocidad de agitación), para tomar en cuenta los niveles de energía que van generando los diferentes intermediarios de la reacción de desesterificación alcalina como ya se explicó anteriormente, sin embargo, se requerían cambios drásticos de temperatura con mínimas diferencias de tiempo entre sí (lo que se llamó estadios de calentamiento), lo que difícilmente se pudo realizar con la parrilla utilizada como lo demuestran los resultados obtenidos, por lo tanto es factible mencionar que esta modificación realizada sobre el método base bien pudo ser una perturbación contraproducente sobre la reacción, lo que en consecuencia pudo ser causa de la falta de precisión en el método modificado al aplicarse como tal en las matrices hígado de pollo, hígado de cerdo e hígado de tiburón. Para lograr tal vez esta modificación se requiere de tener calentadores de viales de forma cilíndrica (como una chaqueta de calentamiento que se usan al realizar técnicas de “head space”) y no el uso de parrillas que no permiten la adecuada variación de las temperaturas como se planteaba.
- ▲ Con respecto a la modificación de los tiempos de agitación y reposo en la etapa de extracción no se observó algún efecto indeseado sobre el sistema bifásico fase orgánica / fase acuosa que pudiera haber ocasionado alguna alteración sobre la repetibilidad, pues en todos los casos la separación total entre las fases no se tuvieron problemas (resolviendo el problema de la formación de emulsión en el caso que se desarrollara como se planteó durante el desarrollo experimental).
- ▲ También hay que tomar en cuenta que en el caso del método modificado es probable que se requiera también un mayor tiempo de entrenamiento para que probablemente se cumpla el requerimiento de obtener una repetibilidad mayor del 95%, ya que como se puede ver en la prueba de recobro con el método modificado el C.V. bajo al 7%.

- ▲ Al analizar los resultados obtenidos en la prueba de recobro de vitamina A en la matriz hígado de pollo aplicando tanto el método base así como el método modificado, es posible observar que en forma general se obtiene el mismo recobro (alrededor de un 70% de recuperación de vitamina A) con ambos métodos. Cabe mencionar que para respaldar en forma más fehaciente la observación anterior sería necesario realizar un mayor número de pruebas de recobro sobre la misma matriz aplicando los dos métodos de extracción y además realizar pruebas de recobro sobre las matrices hígado de cerdo e hígado de tiburón aplicando el método de extracción de vitamina A modificado y aplicando el método base (esto no forma parte del desarrollo experimental de esta tesis) ya que de manera similar que en hígado de pollo, no hubo una buena repetibilidad con el método modificado pero bien podrían mantenerse los niveles de recobro entre ambos métodos al aplicarse sobre estas matrices.
- ▲ Es posible observar que para hígado de pollo se obtuvieron concentraciones de vitamina A muy semejantes a excepción de la muestra 4. Las variaciones pueden explicarse por el hecho de que las matrices provienen de diferente población, esto es, de diferentes individuos y por tanto debe considerarse la posibilidad de que a pesar de que se cuidó que el origen de las muestras fuera el mismo no se podía garantizar que la alimentación y ambiente fuera homogénea para los animales (esto es más notorio en el tiburón al no asegurar de que mar mexicano proviene además de que no hay control sobre su alimentación y crianza).
- ▲ En el caso del hígado de cerdo también es semejante y la variación es debida a lo mencionado anteriormente.
- ▲ A pesar de lo anterior, con el método de extracción de vitamina A modificado para hígado de pollo así como para hígado de cerdo, se obtuvo mayor concentración de vitamina A como retinol (expresada como μg de retinol/ 100 g de hígado) que la reportada en la literatura para pollos nacidos y criados en México por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, INNSZ²⁶ por sus siglas; el cual reporta para hígado de pollo un promedio de 100 μg de retinol/ 100 g de hígado (recordando que cada nación alimenta y cría de manera diferente a los animales de granja) ya que en este caso es de interés el estudio comparativo de concentración de vitamina A obtenida con animales de granja criados en México. Lo mismo puede aplicarse para hígado de

cerdo ya que de acuerdo a reportes del INNSZ se tiene una concentración de vitamina A promedio de 4,200 µg de retinol/ 100 g de hígado.

- ▲ En cuanto a hígado de tiburón, cabe mencionar, que no se encontró en las tablas del INNSZ el reporte de la concentración de vitamina A en forma de retinol para este tipo de hígado (pues no se consume como tal por la población mexicana pues se utiliza para extraer la vitamina A como retinol, preparando suplementos alimenticios) sin embargo en la guía de origen Suizo (publicado en 2002) de Sight and Life sobre la vitamina A en los estados de salud y enfermedad²⁷ se reporta que la cantidad de vitamina A existente en el aceite de hígado de tiburón es de 180,000 µg de retinol/ 100 g de hígado por lo que de acuerdo a este reporte, se obtuvo una concentración de vitamina A experimental casi 10 veces menor a la esperada, sin embargo, debe tomarse en cuenta las diversas especies existentes de estos peces cartilagosos en los mares mexicanos (que en este reporte no se consideran) aunque de cualquier manera este resultados sigue indicando claramente la necesidad de optimizar la metodología de extracción de vitamina A modificada.
- ▲ Hay que hacer notar que en las tablas del INNSZ donde se reporta la concentración de vitamina A en alimentos (además de la concentración de otras vitaminas y nutrientes en diversos alimentos) no se menciona el tipo de metodología utilizada para la extracción de vitamina A ni información estadística de los datos reportados, por lo que no es posible comparar el método de extracción de vitamina A propuesto con otras metodologías existentes.

CONCLUSIONES

- ❖ La metodología de extracción de vitamina A validada para hígado de res y aplicada a hígado de pollo, resultó ser repetible de acuerdo a los resultados estadísticos sobre las concentraciones de vitamina A obtenidas en la muestra 2 analizada, obteniéndose un coeficiente de variación menor al 5%, siendo éste un valor aplicado en metodologías analíticas. Lo que da el resultado de una metodología validada para dos matrices distintas, lo que permite cumplir uno de los objetivos planteados en este trabajo.
- ❖ Hay que recordar que esta metodología desarrollada permite trabajar con poca cantidad de muestra y pequeñas cantidades de disolventes y reactivos, lo que permite tener una metodología que contamina menos, es más segura y más económica por muestra.
- ❖ Al realizar el estudio de las diferentes etapas de la metodología de extracción de vitamina A planteados para el hígado de res como metodología base, se pudo plantear la explicación teórica de cada etapa aplicada y plantear probables variaciones que pudieran mejorar la precisión de la metodología, con lo que se cumplieron los otros objetivos planteados.
- ❖ En contraparte con lo anterior, la metodología de extracción modificada planteada para tratar de mejorar la precisión en las matrices hígado de pollo, hígado de cerdo e hígado de tiburón resultó ser no repetible de acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos, ya que en este caso, se obtuvieron coeficientes de variación mayores al 5%.
- ❖ De acuerdo con lo anterior, se hace necesario el ajuste de alguno de los pasos de la metodología de extracción modificada, esto incluyendo tal vez aparatos adecuados para aplicar ciertas variantes de manera óptima, tal como una chaqueta de calentamiento o cualquier otro equipo de calentamiento que permita una mejor repetibilidad de las temperaturas aplicadas, así como un mayor entrenamiento en la técnica para aplicarla a las matrices que se trabajaron en este proyecto, esto último basados en que como se mencionó en el análisis de resultados al realizar la prueba de recobro en hígado de pollo con este método la repetibilidad aumento a un 93% (C.V. 7%).

- ❖ Para hígado de cerdo e hígado de tiburón, habría que realizar la aplicación de la metodología sin modificaciones y hacer más repeticiones con los cambios propuestos sobre esta metodología base para las mismas matrices.
- ❖ En los resultados obtenidos en la prueba de recobro de vitamina A en la matriz hígado de pollo aplicando ambos métodos de extracción de vitamina A, fue posible observar que en forma general se obtiene el mismo recobro.
- ❖ Es posible concluir además que a pesar de que ya se ha validado un método de extracción de vitamina A para muestras de hígado de res y pollo, bien podría aplicarse como tal para las muestras de cerdo y tiburón por tratarse de la misma muestra, pero se hacen necesarios cambios sobre esta misma metodología para que probablemente se mejore el recobro, ya que debe considerarse que cada matriz de esas muestras proviene de diferente fuente animal, por la diferencia de tipo de cría, ambiente y alimentación independientemente de que provengan de una misma región del país lo cual afecta el metabolismo y concentración de vitamina A en el hígado.
- ❖ En el estudio comparativo fue posible observar que se obtuvo mayor concentración de vitamina A en las matrices hígado de cerdo e hígado de pollo con un máximo de $28,430.8 \pm 5,009.43$ y $31,543.1 \pm 2,383.9$ μg de retinol/ 100 g de hígado respectivamente al compararlas con las tablas de contenido nutrimental publicadas por el INNSZ las cuales reportan 100 y 4,200 μg de retinol/ 100 g de hígado de pollo e hígado de cerdo respectivamente, a pesar de que el método de extracción de vitamina A modificado resultó ser no repetible para las matrices trabajadas. En contraparte con lo anterior para hígado de tiburón se obtuvo una concentración de 187.0 ± 22.64 μg de retinol/100 g de hígado lo cual representa casi la décima parte del valor reportado por la guía de origen Suizo de Sight and Life sobre la vitamina A en los estados de salud y enfermedad (180,000 μg de retinol/ 100 g de hígado) aunque no se consideran las diferentes variedades de tiburón. Aunque hay que tomar en cuenta que las tablas nutricionales reportadas

en la literatura no reportan valores de precisión ni explican la fuente de la metodología con la que basaron su reporte.

BIBLIOGRAFÍA

1. RAMÍREZ, H. *Validación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) para la cuantificación de vitamina A*, Tesis de Licenciatura, UNAM, D.F; México, (2004).
2. MARTÍNEZ, S. *Validación de un método de análisis de vitamina A en hígado de res por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE)* Tesis de Licenciatura ,UNAM, D.F; México, (2005).
3. BARÚA, A. JAMES, O. “Reversed-phase gradient HPLC procedure for simultaneous analysis of very polar to non polar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples”. *Journal of Chromatography B*. Vol. 707, p.p: 69-79, (1998).
4. DYKE, S. *The Chemistry of the Vitamins*. Interscience Publishers, 1ª edición, Londres, UK; p.p: 210-211, (1965).
5. EDDY, W. *What are the vitamins?*. Reinhold Publishing Corporation, 1ª edición, USA; p.p: 30-51, (1941).
6. MACHLIN, J. et al. *Handbook of vitamins*. Marcel Dekker Inc., 2ª edición, USA; p.p: 8-13, 16-21, 40-43, (1991).
7. MACRAE, R. et al. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Vol. 6 Academic Press, Londres, UK; p.p: 707-718, 3901-3912, (1993).
8. MOORE, T. *Vitamin A*. Elsevier Publishing Company, 1ª edición, Londres, UK; p.p: 17-28, 42-65, 69-76, 83-84, 151-158, 180-188, 192, 355-356, (1957).
9. OTTAWAY, B.P. *The technology of vitamins in food*. Chapman & Hall, UK; p.p: 1-2, 20-21, 43-44, 91-92, 246-247, 179-182, (1993).
10. ROSENBERG, H. *Chemistry and Physiology of the Vitamins*. Interscience Publishers, 1ª edición, USA; p.p: 38-39, 51-52, (1945).
11. LEBERT, A. MARTY, C. et. al. “Analysis of Carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography”. *Journal of Chromatography A*. Vol. 633, p.p: 9-23, (1993).
12. PIKKARAINEN, S. PARVIAINEN, M. “Determination of retinyl palmitate and total vitamin A content in liver and liver-based ready-to-eat-foods”. *Journal of Chromatography B*. Vol. 577, p.p: 163-166, (1992).
13. PINHEIRO, H. et.al. “Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service”. *Food Chemistry*. Vol. 61, p.p: 145-151, (1998).
14. ESQUIVEL, B. McNAIR, H. *Cromatografía Líquida de Alta Presión*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Monografía 10, Washington, D.C., p.p: 47-48, (1973).

15. MERRITT, L. WILLARD, H. et al. *Métodos Instrumentales de Análisis*. Grupo Editorial Iberoamericana, México; p.p: 611-616, (1991).
16. SKOOG, D et al. *Química Analítica*. McGrawHill, 7ª edición, México; p.p: 670-679, (2001).
17. BLEVINS, D. et al. *Sorbent Extraction Technology*. Varian Simple Preparation Products, USA; p.p: 4-6, 14-22. (1993).
18. GÓMEZ, H. VALCÁRCEL, M. *Técnicas Analíticas de Separación*. Editorial Reverté, 1ª edición, España; p.p: 173-176, 209-211, 224-227, (1990).
19. ROBINSON, A. *Química Analítica Contemporánea*. Prentice Hall, 1ª edición, México; p.p: 108-109, (2000).
20. J.T. BAKER Solid Phase Extraction for Simple Preparation.. p.p: 5-8, 19-26 (1988)
21. MILLER, J. MILLER, J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Prentice Hall, 4ª edición., España; p.p: 21-35, 65-68, (2000).
22. KUEHL, R. *Diseño de Experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. Thomson Learning, 2ª edición, México., p.p: 148-164, (2003).
23. WALPOLE, R. MYERS, R. MYERS, S. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. Pearson Educación, 6ª edición, México; p.p: 290-355, (1999).
24. TORAL, M. *Fisicoquímica de superficies y sistemas dispersos*. Ediciones URMO, 1ª Edición, México; p.p: 45-48, (1973).
25. COOK, K. *Cholesterol. Chemistry, Biochemistry and Pathology*. Academia Press Inc., USA; p.p: 151-154, (1958).
26. BOURGES, H. et al. *Valor nutritivo de alimentos mexicanos. Tablas de uso práctico*. Publicaciones de la División de Nutrición, 7ª edición, México; p.p:13-14 (1977).
27. FRIGG, M. McLAREN, D. *Guía de SIGHT AND LIFE sobre la vitamina A en los Estados de Salud y Enfermedad*. Task Force. SIGHT AND LIFE, 2ª edición, México; p. 10, (2002).

Hígado de pollo						
Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
0.5316	371464	11976.22	31.02	0.16	155.08	29173.06
	334454	11976.22	27.93	0.14	139.63	26266.47
	235572	11976.22	19.67	0.10	98.35	18500.74
0.456	342199	11976.22	28.57	0.14	142.87	31330.27
	349472	11976.22	29.18	0.15	145.90	31996.16
	278664	11976.22	23.27	0.12	116.34	25513.28
0.5752	405051	11976.22	33.82	0.17	169.11	29399.58
	412883	11976.22	34.48	0.17	172.38	29968.05
	401577	11976.22	33.53	0.17	167.66	29147.43
0.4011	277988	11976.22	23.21	0.12	116.06	28935.01
	269533	11976.22	22.51	0.11	112.53	28054.95
	290095	11976.22	24.22	0.12	121.11	30195.20
0.4097	324421	11976.22	27.09	0.14	135.44	33059.27
	313669	11976.22	26.19	0.13	130.95	31963.62
	317787	11976.22	26.53	0.13	132.67	32383.25
0.4222	300796	11976.22	25.12	0.13	125.58	29744.33
	307165	11976.22	25.65	0.13	128.24	30374.13
	315081	11976.22	26.31	0.13	131.54	31156.90
0.3426	280373	11976.22	23.41	0.12	117.05	34166.39
	280893	11976.22	23.45	0.12	117.27	34229.76
	290266	11976.22	24.24	0.12	121.18	35371.96
0.4448	357052	11976.22	29.81	0.15	149.07	33513.28
	373080	11976.22	31.15	0.16	155.76	35017.69
	361212	11976.22	30.16	0.15	150.80	33903.75

n	24		
MEDIA	30557		
s exp	3663.27		
s² exp	13419589.88		
%CV(teo)	5	%CV(exp):	12
s	1527.85		
s²	2334325.623		
α	0.05		
g.l (n-1)	23		
Xi cuadrada tab	35.17		
Xi cuadrada exp	132.2225847		
I.C.	30557 +/- 1 547.9		
t α/2, n-1	2.07		
s/raíz de n	747.8		
Rechazar Ho si $\chi^2_{exp} > \chi^2_{tab}$			
Conclusión: La hipótesis nula se rechaza por lo tanto el método no es preciso (repetible) para un C.V. del 5%			

Tabla 1. Precisión medida como repetibilidad para la muestra 1 de hígado de pollo

Muestra 2	Hígado de pollo						
Código	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
M 1HP31/01/05	0.5722	368688	11976.22	30.79	0.15	153.93	26900.57
	0.5722	396418	11976.22	33.10	0.17	165.50	28923.83
	0.5722	383151	11976.22	31.99	0.16	159.96	27955.83
M 2HP31/01/05	0.5591	361402	11976.22	30.18	0.15	150.88	26986.80
	0.5591	361925	11976.22	30.22	0.15	151.10	27025.85
	0.5591	377374	11976.22	31.51	0.16	157.55	28179.47
M 1HP1/02/05	0.6934	455463	11976.22	38.03	0.19	190.15	27423.29
	0.6934	466844	11976.22	38.98	0.19	194.90	28108.54
	0.6934	470796	11976.22	39.31	0.20	196.55	28346.49
M 2HP1/02/05	0.5187	355569	11976.22	29.69	0.15	148.45	28619.23
	0.5187	355654	11976.22	29.70	0.15	148.48	28626.07
	0.5187	348706	11976.22	29.12	0.15	145.58	28066.84
M 1HP2/02/05	0.3386	216540	11976.22	18.08	0.09	90.40	26699.40
	0.3386	213545	11976.22	17.83	0.09	89.15	26330.11
	0.3386	215157	11976.22	17.97	0.09	89.83	26528.87
M 2HP2/02/05	0.3855	256856	11976.22	21.45	0.11	107.24	27817.34
	0.3855	257962	11976.22	21.54	0.11	107.70	27937.12
	0.3855	250866	11976.22	20.95	0.10	104.74	27168.63
M 1HP3/02/05	0.4618	323841	11976.22	27.04	0.14	135.20	29277.11
	0.4618	320654	11976.22	26.77	0.13	133.87	28988.99
	0.4618	320403	11976.22	26.75	0.13	133.77	28966.29

n	21		
MEDIA	27851		
s exp	887.8937		
s ² exp	788355.2225		
% CV (teo)	5	% CV (exp)	3.2
s	1392.55		
s ²	1939195.503		
J	0.05		
g.l (n-1)	20		
Xi cuadrada tab	31.4		
Xi cuadrada exp	8.130745162		
I.C.	27851 +/- 405		
t / 2 , n-1	2.09		
s/raiz de n	193.75429		
Rechazar Ho si $J_{2exp} > J_{2tab}$			
Conclusión: Ho no se rechaza, por lo tanto el método es preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 2. Precisión medida como repetibilidad para la muestra 2 de hígado de pollo

Muestra 3		Hígado de pollo					
Código	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
M1HP4/10/04	0.5171	464375	11976.22	38.77	0.19	193.87	37492.52
		508400	11976.22	42.45	0.21	212.25	41046.99
		464876	11976.22	38.82	0.19	194.08	37532.97
M2HP4/10/04	0.4984	384666	11976.22	32.12	0.16	160.60	32222.26
		362829	11976.22	30.30	0.15	151.48	30393.05
		350078	11976.22	29.23	0.15	146.16	29324.94
M1HP5/10/04	0.3324	319326	11976.22	26.66	0.13	133.32	40107.31
		288676	11976.22	24.10	0.12	120.52	36257.68
		232626	11976.22	19.42	0.10	97.12	29217.80
M2HP5/10/04	0.5411	429730	11976.22	35.88	0.18	179.41	33156.48
		425014	11976.22	35.49	0.18	177.44	32792.61
		365905	11976.22	30.55	0.15	152.76	28231.96
M1HP6/10/04	0.368	166416	11976.22	13.90	0.07	69.48	18879.81
		162445	11976.22	13.56	0.07	67.82	18429.30
		297646	11976.22	24.85	0.12	124.27	33767.78
M2HP6/10/04	0.4259	334809	11976.22	27.96	0.14	139.78	32820.09
		363321	11976.22	30.34	0.15	151.68	35615.02
		305964	11976.22	25.55	0.13	127.74	29992.52
M1HP7/10/04	0.3816	231173	11976.22	19.30	0.10	96.51	25291.76
		277954	11976.22	23.21	0.12	116.04	30409.89
		254670	11976.22	21.26	0.11	106.32	27862.48
M2HP7/10/04	0.6796	548916	11976.22	45.83	0.23	229.17	33721.18
		509689	11976.22	42.56	0.21	212.79	31311.38
		507155	11976.22	42.35	0.21	211.73	31155.71

n	24		
MEDIA	31543		
s exp	5521.35		
s2 exp	30485305.82		
%CV(teo)	5	%CV(exp)	17.5
s	1577.15		
s2	2487402.123		
α	0.05		
g.l (n-1)	23		
Xi cuadrada tab	35.17		
Xi cuadrada exp	281.885276		
I.C.	31543+/- 2332.99		
t α/2 , n-1	2.07		
s/raíz de n	1127.040849		
Rechazar Ho sí $\chi^2_{exp} > \chi^2_{tab}$			
Conclusión: Ho se rechaza, por lo tanto el método es no preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 3. Precisión medida como repetibilidad para la muestra 3 de hígado de pollo

Muestra 4							
Código	Higado de pollo	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
M1HP115/11/04	0.5147	265244	11976.22	22.15	0.11	110.74	21515.02
	0.5147	256933	11976.22	21.45	0.11	107.27	20840.88
	0.5147	261270	11976.22	21.82	0.11	109.08	21192.67
M2HP15/11/04	0.3554	154453	11976.22	12.90	0.06	64.48	18143.84
	0.3554	156203	11976.22	13.04	0.07	65.21	18349.42
	0.3554	152227	11976.22	12.71	0.06	63.55	17882.35
MIHP16/11/04	0.2878	119255	11976.22	9.96	0.05	49.79	17299.60
	0.2878	98440	11976.22	8.22	0.04	41.10	14280.10
	0.2878	118766	11976.22	9.92	0.05	49.58	17228.67
M2HP16/11/04	0.6447	208301	11976.22	17.39	0.09	86.96	13489.13
	0.6447	219613	11976.22	18.34	0.09	91.69	14221.67
	0.6447	202413	11976.22	16.90	0.08	84.51	13107.84
M1HP17/11/04	0.4295	134005	11976.22	11.19	0.06	55.95	13025.91
	0.4295	139442	11976.22	11.64	0.06	58.22	13554.41
	0.4295	141535	11976.22	11.82	0.06	59.09	13757.86
M2HP17/11/04	0.494	205428	11976.22	17.15	0.09	85.76	17361.33
	0.494	185165	11976.22	15.46	0.08	77.31	15648.84
	0.494	208658	11976.22	17.42	0.09	87.11	17634.31
M1HP18/11/04	0.2851	116121	11976.22	9.70	0.05	48.48	17004.50
	0.2851	120448	11976.22	10.06	0.05	50.29	17638.14
	0.2851	126169	11976.22	10.53	0.05	52.67	18475.91
M2HP18/11/04	0.524	181495	11976.22	15.15	0.08	75.77	14460.51
	0.524	179154	11976.22	14.96	0.07	74.80	14273.99
	0.524	182830	11976.22	15.27	0.08	76.33	14566.88

n	24		
MEDIA	16456		
s exp	2597.58		
s2 exp	6747421.856		
%CV(teo)	5	%CV(exp)	15.8
s	822.8		
s2	676999.84		
α	0.05		
g.l (n-1)	23		
Xi cuadrada tab	35.17		
Xi cuadrada exp	229.2329976		
I.C.	16456 +/- 1097.6		
t α/2 , n-1	2.07		
s/raiz de n	530.2287972		
Rechazar Ho sí $\chi^2_{exp} > \chi^2_{tab}$			
Conclusión: Ho se rechaza, por lo tanto el método es no preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 4. Precisión medida como repetibilidad para la muestra 4 de hígado de pollo

Muestra 1	Hígado de cerdo						
Código							
	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
M1HC18/10/04	0.38	105678.00	11976.22	8.82	0.04	44.12	11507.55
		108246.00	11976.22	9.04	0.05	45.19	11787.18
		109423.00	11976.22	9.14	0.05	45.68	11915.35
M2HC18/10/04	0.38	131735.00	11976.22	11.00	0.05	55.00	14538.35
		132304.00	11976.22	11.05	0.06	55.24	14601.15
		126197.00	11976.22	10.54	0.05	52.69	13927.17
M1HC19/10/04	0.32	191171.00	11976.22	15.96	0.08	79.81	24972.70
		195244.00	11976.22	16.30	0.08	81.51	25504.76
		194661.00	11976.22	16.25	0.08	81.27	25428.60
M2 HC19/10/04	0.43	132477.00	11976.22	11.06	0.06	55.31	12895.40
		132593.00	11976.22	11.07	0.06	55.36	12906.69
		132137.00	11976.22	11.03	0.06	55.17	12862.30
M1HC20/10/04	0.45	335682.00	11976.22	28.03	0.14	140.15	31443.85
		341443.00	11976.22	28.51	0.14	142.55	31983.49
		342457.00	11976.22	28.59	0.14	142.97	32078.47
M2HC20/10/04	0.48	346716.00	11976.22	28.95	0.14	144.75	30346.30
		350827.00	11976.22	29.29	0.15	146.47	30706.12
		350787.00	11976.22	29.29	0.15	146.45	30702.62
M1HC21/10/04	0.55	239186.00	11976.22	19.97	0.10	99.86	18142.94
		238959.00	11976.22	19.95	0.10	99.76	18125.72
		238372.00	11976.22	19.90	0.10	99.52	18081.19
M2HC21/10/04	0.43	199737.00	11976.22	16.68	0.08	83.39	19579.48
		199864.00	11976.22	16.69	0.08	83.44	19591.93
		198651.00	11976.22	16.59	0.08	82.94	19473.02

n	24		
MEDIA	20546		
s exp	7511.74		
s2 exp	56426237.83		
%CV (teo)	5	%CV(exp)	36.5
s	1027.3		
s2	1055345.29		
α	0.05		
g.l (n-1)	23		
Xi cuadrada tab	35.17		
Xi cuadrada exp	1229.742988		
I.C.	20546 +/- 3173.99		
t α/2 , n-1	2.07		
s/raiz de n	1533.327507		
Rechazar Ho sí $\chi^2_{exp} > \chi^2_{tab}$			
Conclusión: Ho se rechaza, por lo tanto el método es no preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 5. Precisión medida como repetibilidad para la muestra 1 de hígado de cerdo

Hígado de cerdo						
Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
0.4066	399839	11976.22	33.39	0.17	166.93	41055.19
0.4066	356705	11976.22	29.78	0.15	148.92	36626.22
0.4066	370610	11976.22	30.95	0.15	154.73	38053.98
0.5694	523994	11976.22	43.75	0.22	218.76	38420.16
0.5694	519771	11976.22	43.40	0.22	217.00	38110.52
0.5694	516525	11976.22	43.13	0.22	215.65	37872.52
0.4092	158849	11976.22	13.26	0.07	66.32	16206.87
0.4092	154120	11976.22	12.87	0.06	64.34	15724.38
0.4092	151833	11976.22	12.68	0.06	63.39	15491.05
0.3022	78081	11976.22	6.52	0.03	32.60	10787.01
0.3022	87306	11976.22	7.29	0.04	36.45	12061.46
0.3022	86460	11976.22	7.22	0.04	36.10	11944.58
0.563	577819	11976.22	48.25	0.24	241.24	42848.31
0.563	593294	11976.22	49.54	0.25	247.70	43995.86
0.563	604140	11976.22	50.44	0.25	252.22	44800.15
0.5664	234774	11976.22	19.60	0.10	98.02	17305.22
0.5664	240856	11976.22	20.11	0.10	100.56	17753.52
0.5664	248501	11976.22	20.75	0.10	103.75	18317.04
0.364	341495	11976.22	28.51	0.14	142.57	39168.17
0.364	335259	11976.22	27.99	0.14	139.97	38452.92
0.364	265431	11976.22	22.16	0.11	110.82	30443.92
0.5789	358073	11976.22	29.90	0.15	149.49	25823.69
0.5789	353367	11976.22	29.51	0.15	147.53	25484.30
0.5789	354510	11976.22	29.60	0.15	148.01	25566.73

n	24		
MEDIA	28430		
s exp	11855.61		
s2 exp	140555488.5		
%CV(teo)	5	%CV(exp)	41.7
s	1421.5		
s2	2020662.25		
α	0.05		
g.l (n-1)	23		
Xi cuadrada tab	35.17		
Xi cuadrada exp	1599.859766		
L.C.	28430+/- 5009.43		
t α/2 , n-1	2.07		
s/raiz de n	2420.016257		
Rechazar Ho si $\chi^2_{exp} > \chi^2_{tab}$			
Conclusión: Ho se rechaza, por lo tanto el método es no preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 6. Precisión medida como repetibilidad para la muestra 2 de hígado de cerdo

Muestra 1	Hígado de tiburón						
Código	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
M1HT22/11/04	0.6754	2414	11976.22	0.20	0.001008	1.01	149.22
		3018	11976.22	0.25	0.001260	1.26	186.56
		1888	11976.22	0.16	0.000788	0.79	116.71
M2HT22/11/04	0.3583	1663	11976.22	0.14	0.000694	0.69	193.77
		1528	11976.22	0.13	0.000638	0.64	178.04
		1622	11976.22	0.14	0.000677	0.68	189.00
M1HT23/11/04	0.7245	2828	11976.22	0.24	0.001181	1.18	162.96
		2802	11976.22	0.23	0.001170	1.17	161.47
		2541	11976.22	0.21	0.001061	1.06	146.43
M2HT23/11/04	0.3342	2563	11976.22	0.21	0.001070	1.07	320.18
		2221	11976.22	0.19	0.000927	0.93	277.45
		2284	11976.22	0.19	0.000954	0.95	285.33
M1HT24/11/04	0.4827	2359	11976.22	0.20	0.000985	0.98	204.03
		2197	11976.22	0.18	0.000917	0.92	190.02
		2006	11976.22	0.17	0.000837	0.84	173.50
M2HT24/11/04	0.5044	2568	11976.22	0.21	0.001072	1.07	212.55
		2671	11976.22	0.22	0.001115	1.12	221.08
		2965	11976.22	0.25	0.001238	1.24	245.41
M1HT25/11/04	0.6557	2809	11976.22	0.23	0.001173	1.17	178.85
		2474	11976.22	0.21	0.001033	1.03	157.52
		2956	11976.22	0.25	0.001234	1.23	188.21
M2HT25/11/04	0.7542	2021	11976.22	0.17	0.000844	0.84	111.87
		2168	11976.22	0.18	0.000905	0.91	120.01
		2192	11976.22	0.18	0.000915	0.92	121.34

n	24		
MEDIA	187		
s exp	53.59		
s ² exp	2871.8881		
%CV (teo)	5	%CV(exp)	28.6
s	9.35		
s ²	87.4225		
α	0.05		
g.l (n-1)	23		
Xi cuadrada tab	35.17		
Xi cuadrada exp	755.5655157		
I.C.	187 +/- 22.64		
t α/2 , n-1	2.07		
s/raiz de n	10.93901294		
Rechazar Ho si $\chi^2_{exp} > \chi^2_{tab}$			
Conclusión: Ho se rechaza, por lo tanto el método es no preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 7. Precisión medida como repetibilidad para la muestra 1 de hígado de tiburón

Recobro en método base							
	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
M1HP8/02/05	0.3829	408399	11976.22	34.10	0.17	170.50	44529.68
		402337	11976.22	33.59	0.17	167.97	43868.71
		397565	11976.22	33.20	0.17	165.98	43348.40
M2HP8/02/05	0.3737	461691	11976.22	38.55	0.19	192.75	51579.68
		470250	11976.22	39.27	0.20	196.33	52535.88
		466950	11976.22	38.99	0.19	194.95	52167.21
M1HP9/02/05	0.4349	543951	11976.22	45.42	0.23	227.10	52218.05
		537526	11976.22	44.88	0.22	224.41	51601.27
		533764	11976.22	44.57	0.22	222.84	51240.12
M2HP9/02/05	0.6306	735962	11976.22	61.45	0.31	307.26	48724.99
		738355	11976.22	61.65	0.31	308.26	48883.42
		747342	11976.22	62.40	0.31	312.01	49478.41

n	12		
MEDIA	49181		
s exp	3431.233034		
s2 exp	11773360.13		
%CV(teo)	5	%CV(exp)	7
s	2459.065847		
s2	6047004.839		
a	0.05		
g.l (n-1)	11		
Xi cuadrada tab	19.7		
Xi cuadrada exp	21.41671206		
I.C. de la media	49181 +/- 2179.1		
t a/2 , n-1	2.2		
s/raiz de n	990.5116578		
Rechazar Ho si $c2exp > c2tab$			
Conclusión: Ho se rechaza, por lo tanto el método es no preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 8. Análisis de recobro para el método base

Recobro en método modificado		Hígado de pollo muestra 2					
Código	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (mg)	Conc. mg/ 100g
M1HP10/02/05	0.4626	630340	11976.22	52.63	0.26	263.16	56887.85
		594663	11976.22	49.65	0.25	248.27	53668.02
		599096	11976.22	50.02	0.25	250.12	54068.10
M2HP10/02/05	0.3777	468748	11976.22	39.14	0.20	195.70	51813.48
		473689	11976.22	39.55	0.20	197.76	52359.63
		474451	11976.22	39.62	0.20	198.08	52443.86
M1HP11/02/05	0.4112	450796	11976.22	37.64	0.19	188.20	45769.61
		457373	11976.22	38.19	0.19	190.95	46437.38
		458631	11976.22	38.30	0.19	191.48	46565.11
M2HP11/02/05	0.3576	479420	11976.22	40.03	0.20	200.15	55971.76
		477706	11976.22	39.89	0.20	199.44	55771.65
		471025	11976.22	39.33	0.20	196.65	54991.65

n	12		
MEDIA	52229		
s exp	3918.845954		
s2 exp	15357353.61		
%CV(teo)	5	%CV(exp)	7.5
s	2611.450387		
s2	6819673.124		
α	0.05		
g.l (n-1)	11		
Xi cuadrada tab	19.7		
Xi cuadrada exp	24.77111243		
I.C. de la media	5229 +/- 2488.8		
t a/2 , n-1	2.2		
s/raiz de n	1131.273383		
Rechazar Ho si $c_{2exp} > c_{2tab}$			
Conclusión: Ho se rechaza, por lo tanto el método es no preciso con un C.V. del 5%			

Tabla 9. Análisis de recobro para el método modificado