

3. ANTECEDENTES

Hedí (1941) define a las vitaminas como un compuesto químico cuya presencia en la dieta es esencial para mantener el crecimiento y la salud, y cuya ausencia o suministro inadecuado da como resultado el desarrollo de manifestaciones específicas de enfermedades en la salud.

Las vitaminas difieren de lo que llamamos nutrientes esenciales en varias cosas. Primero, la cantidad esencial es más pequeña que las de los nutrientes ordinarios tales como proteínas, grasas, carbohidratos y minerales. Segundo, ellas pueden cambiar y ser “inactivadas” por temperatura, oxidación, etc. Tercero, pueden existir en una forma inactiva y requieren de tratamientos específicos tales como irradiación o acción enzimática, para que se vuelvan fisiológicamente eficientes.

Las vitaminas que se encuentran en forma inactiva en la naturaleza son las provitaminas. El caroteno, por ejemplo, es la provitamina A.

Combs (1992) menciona, que para el aspecto nutritivo, una vitamina se puede definir de las siguientes maneras:

- es un compuesto orgánico distinto de grasas, carbohidratos y proteínas;

- es un componente natural de alimentos en donde está comúnmente presente en pequeñas cantidades;
- es esencial en pequeñas cantidades, para la función fisiológica normal (mantenimiento, crecimiento, desarrollo y/o reproducción);
- al estar ausente causa un síndrome de deficiencia específico.
- no es sintetizada por el hospedero en cantidades adecuadas para satisfacer las necesidades fisiológicas adecuadas.

En el siguiente cuadro se muestran los diferentes tipos de vitaminas, sus grupos, vitámeros (miembros de la misma familia de vitaminas), pro-vitaminas y sus funciones fisiológicas:

Cuadro No. 1. Las Vitaminas: sus vitámeros, pro-vitaminas y funciones.

Grupo	Vitámeros	Pro-vitaminas	Funciones fisiológicas
Vitamina A	Retinol Retinal Acido retinóico	β -caroteno Criptoxantina	Pigmentos visuales Diferenciación de célula epitelial
Vitamina D	Colecalciferol (D ₃) Ergocalciferol (D ₂)		Ca homeostasis
Vitamina E	α -tocoferol γ -tocoferol		Antioxidante de membrana
Vitamina K	Filoquinonas (k ₁) Menaquinonas (k ₂) Menadiona (k ₃)		Coagulación de la sangre Ca metabolismo
Vitamina C	Acido ascórbico Acido dehidroascórbico		Reductor en hidroxilaciones en la formación de colágeno y carnitina, y en el metabolismo de drogas y esteroides.
Vitamina B ₁	Tiamina		Coenzima para decarboxilaciones de 2-keto ácidos (piruvato)
Vitamina B ₂	Riboflavina		Coenzimas en reacciones redox de ácidos grasos
Niacina	Acido nicotínico Nicotinamida		Coenzimas para muchas deshidrogenasas
Vitamina B ₆	Pirridoxol Pirridoxal Pirridoxamina		Coenzimas en el metabolismo de aminoácidos
Acido fólico	Acido fólico Poliglutamil folacinas		Coenzimas en el metabolismo de carbonos sencillos
Biotina	Biotina		Coenzima para carboxilaciones
Acido pantotenico	Acido pantoténico		Coenzimas en el metabolismo de ácidos grasos
Vitamina B ₁₂	Cobalamina		Coenzimas en el metabolismo de propionato, amino ácidos y carbono sencillo

Combs, G. F. (1992)

Sólo unas pocas vitaminas son sustancias individuales; casi todas son familias de sustancias químicamente relacionadas llamadas *vitámeros*, que comparten actividades biológicas

cualitativas (y no necesariamente cuantitativas) (Ver cuadro 1). Por otro lado, las familias de vitaminas son químicamente heterogéneas, por eso conviene considerar sus propiedades físicas (Combs, 1992).

Las vitaminas se dividen en las que son solubles en grasas (liposolubles) como la A, E, D y K, y las que son solubles en agua (hidrosolubles) tales como la tiamina, vitamina B₆, folato, riboflavina, biotina, niacina, ácido pantoténico, vitamina B₁₂ y vitamina C (Combs, 1992).

Las cuatro vitaminas liposolubles son compuestos isoprenoides. Están formadas, como los esteroides, por unidades activadas de cinco carbonos. Como grupo tienen una relación estructural que no se da en las vitaminas hidrosolubles. En cambio, las vitaminas hidrosolubles tienen una uniformidad *funcional*, por cuanto todas ellas están diseñadas para transportar grupos metabólicos móviles, mientras las vitaminas liposolubles son diversas en sus funciones (Mathews *et al*, 2002).

3.1. Carotenoides

La estructura básica de un carotenoide es simétrica, lineal, un tetraterpeno de 40 carbonos hecho de unidades de ocho isoprenoides de 5 carbonos unidas de tal manera que el orden se revierte en el centro (Rodríguez *et. al.*, 1997).

Los carotenoides son hidrocarburos conjugados que son clasificados como caroteno (sin la molécula de oxígeno) y xantofilas (con una o más moléculas de oxígeno) (Rodríguez *et. al.*, 1997).

Uno de los micronutrientes antioxidantes más prometedores es el caroteno. Los carotenos fueron primero identificados en la raíz del vegetal que hoy conocemos como zanahoria. Las zanahorias son originarias de Asia en el área de Afganistán hace unos 3000 años y lentamente se diseminaron en el área del Mediterráneo. Las primeras zanahorias eran blancas, púrpuras y amarillas – no naranjas. Las zanahorias naranjas fueron desarrolladas en 1600 por los holandeses (<http://www.kenil.com.uy/menu11-2/2.htm>).

La vitamina A se proporciona en la dieta como vitamina A preformada (éster de retinil, retinol, retinal, 3-dehidroretinol, y ácido retinoico) de alimentos de origen animal como el hígado, leche y productos lácteos, pescados, y carne; o como carotenoides que pueden ser transformados biológicamente a vitamina A (provitaminas A), generalmente de plantas. La provitamina A tiene la ventaja de ser convertida a vitamina A solo cuando el cuerpo lo necesita; así se evita una toxicidad potencial por una sobredosis de vitamina A (Rodríguez *et. al.*, 1997).

Los carotenoides (β -caroteno, 13 y 9 -*cis*- β .caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, *cis*- α -caroteno, β -zeacaroteno, β - α -criptoxantina, *cis*- β -criptoxantina) (Rodríguez *et. al.*, 1997) son formas de provitamina A encontradas en las plantas. Los carotenoides se encuentran naturalmente en las plantas como el α -caroteno, γ -caroteno, licopeno, luteína, xantofila, zeaxantina, criptoxantina y β -caroteno, siendo este último el mejor y más ampliamente conocido (<http://www.kenil.com.uy/menu11-2/2.htm>).

Los carotenoides van a ser un grupo de pigmentos vegetales liposolubles de color intenso (rojo, anaranjado y amarillo). Todos los organismos que dependen del sol para obtener energía, sean bacterias o plantas, contienen carotenoides. Su efecto antioxidante hace que

estos compuestos tengan un papel esencial para proteger a los organismos de daños durante la fotosíntesis. (<http://www.kenil.com.uy/menu11-2/2.htm>). Una función principal de carotenoides tiene que ver claramente con la absorción de la luz en el proceso de la fotosíntesis (De Leenheer, 2000)

En general, mientras mayor sea la intensidad del color, mayor será el contenido de carotenoides. En las hortalizas de hoja, el β -caroteno es el carotenoide predominante. Las frutas y hortalizas anaranjadas, como las zanahorias, los chabacanos, los mangos o la calabaza, tienen concentraciones elevadas de beta caroteno, pero predominan otros carotenoides precursores de la vitamina A. Las hortalizas amarillas tienen una mayor concentración de carotenoides amarillos (xantofilas) y por lo tanto, menor actividad como precursores de la vitamina A; sin embargo, algunos de estos compuestos, como la luteína, pueden tener beneficios importantes para la salud debido a sus posibles efectos antioxidantes. Las frutas y hortalizas rojas y moradas, como el tomate rojo, la col morada y las ciruelas, contienen en su mayoría carotenoides que no están relacionados con la vitamina A. Las legumbres, los cereales y las semillas son también fuentes importantes de carotenoides. Los carotenoides se encuentran también en varios alimentos de origen animal, como el salmón, la yema de huevo, los mariscos, la leche y el pollo. El jugo de zanahoria y las “bebidas verdes” preparadas con verduras, hojas de cebada deshidratada o pasto de trigo, contienen también distintos carotenoides (Caliendo, 1984).

En cuanto a la dosis recomendada, algunos médicos recomiendan a la mayoría de las personas un suplemento máximo de 25,000 UI (unidades internacionales) (15mg aproximadamente) al día de β -caroteno, y aproximadamente 6 mg al día de α -caroteno,

luteína y licopeno, ya que estudios preliminares indican que estos niveles de ingesta favorecerán un mejor estado de salud (Combs, 1992).

3.2. Vitamina A

Fisher y Bender (1983) mencionan que la vitamina A son todos los retinoides que muestran actividad biológica del denominado “todo-transretinol”. Las verduras y hortalizas amarillas contienen carotenoides provitamínicos que se convierten en retinal en las células mucosas del intestino delgado, el retinal es reducido a retinil y posteriormente esterificado. La mayor parte de la vitamina A del organismo se almacena en el hígado en forma de palmitato de retinil. Se libera a la circulación en forma de retinol, unido a una proteína fijadora del retinol y a la prealbúmina (transretina).

En 1915 cuando se le dio nombre a esta vitamina, se descubrió que dicha sustancia era esencial para el crecimiento de los animales jóvenes estimulando de alguna manera el desarrollo del sistema nervioso. Se sabe que cuando hay deficiencia de vitamina A se observan varios trastornos, los primeros de los cuales afectan la vista, ya que esta vitamina interviene de manera importante en el proceso visual en los bastones de la retina, células que son las responsables principales de la visión con poca luz, con una detección relativamente escasa de color. (Mathews *et al*, 2002).

La vitamina puede ingerirse con el alimento o puede biosintetizarse a partir del β -caroteno.

La biosíntesis de la vitamina A se muestra a continuación (Figura 1):

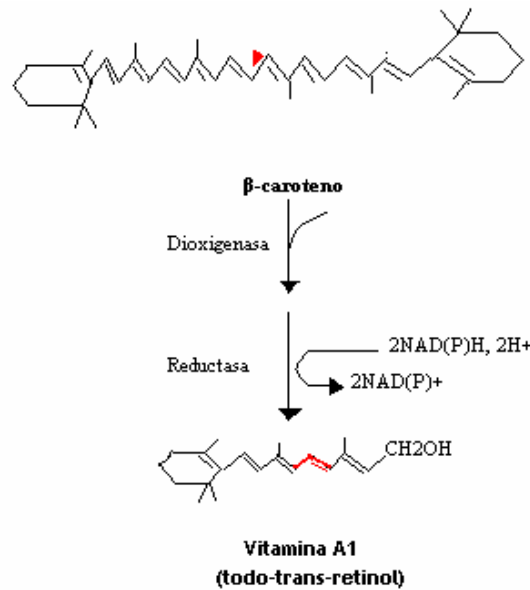


Fig. 1. Biosíntesis de vitamina A

En las verduras que contienen caroteno, el verde de la clorofila cubre su color. El caroteno del pasto es la fuente de vitamina A que se encuentra en los productos lácteos y en el hígado del ganado (Fisher y Bender 1983).

Entonces los *retinoides* serán compuestos isoprenoides que se encuentran en productos animales y los *carotenoides* serán pigmentos isoprenoides producidos por las plantas (Combs, 1992).

El reporte de la actividad de la vitamina A requiere de una estandarización. Hay dos sistemas utilizados para lograr esto: las unidades internacionales (IU) y los equivalentes de retinol (RE) (Combs, 1992), dicho término se acuñó para permitir la comparación entre las diferentes fuentes de actividad de vitamina A (Mc Laren et. al., 2002).

Aunque la vitamina A ya se puede conseguir en forma cristalina y, por tanto, se puede pesar, a veces, aún se mide en unidades internacionales. El siguiente cuadro muestra las relaciones que hay entre diferentes compuestos:

Cuadro2. Unidades Internacionales (UI) y Equivalentes de Retinol (ER)

Compuesto	µg/UI	UI/ µg	ER/µg	µg/ER
todo- <i>trans</i> retinol	0.300	3.33	1.000	1.00
todo- <i>trans</i> retinil acetato	0.344	2.91	0.873	1.15
todo- <i>trans</i> retinil palmitato	0.549	1.82	0.546	1.83
todo- <i>trans</i> γ-caroteno	1.800	0.56	0.167	6.00
Carotenoides mixtos*	3.600	0.28	0.083	12.0

*Carotenoides provitamina A sin incluir el γ-caroteno. MacLaren & Frigg, 2002.

3.3. Estructura y Nomenclatura

La vitamina A con actividad biológica de retinol se deriva de un compuesto precursor mono cíclico que contiene cinco dobles enlaces de carbono-carbono y un grupo funcional al final de la porción acíclica (Combs, 1992).

Combs también menciona que hay tres formas en que los retinoides activos de la vitamina A se presentan en la naturaleza; la primera es el alcohol *retinol*, la segunda es el aldehído *retinal* o *retinaldehído*, y la tercera el *ácido retinoico*.

La vitamina A en sí (retinol) y su forma ácida estrechamente relacionada (ácido retinoico), que efectúan la mayoría de las funciones de la vitamina A en el organismo, se almacenan en el interior de los animales y seres humanos (McLaren & Frigg, 2002).

Sólo una pequeña parte de carotenoides está presente en los alimentos que consumimos, los cuales son de dos tipos, carotenos y retinoides. En la figura 2 y figura 3, se muestran las fórmulas del β -caroteno, retinol y algunos de los carotenoides y retinoides relacionados más importantes (McLaren & Frigg, 2002).

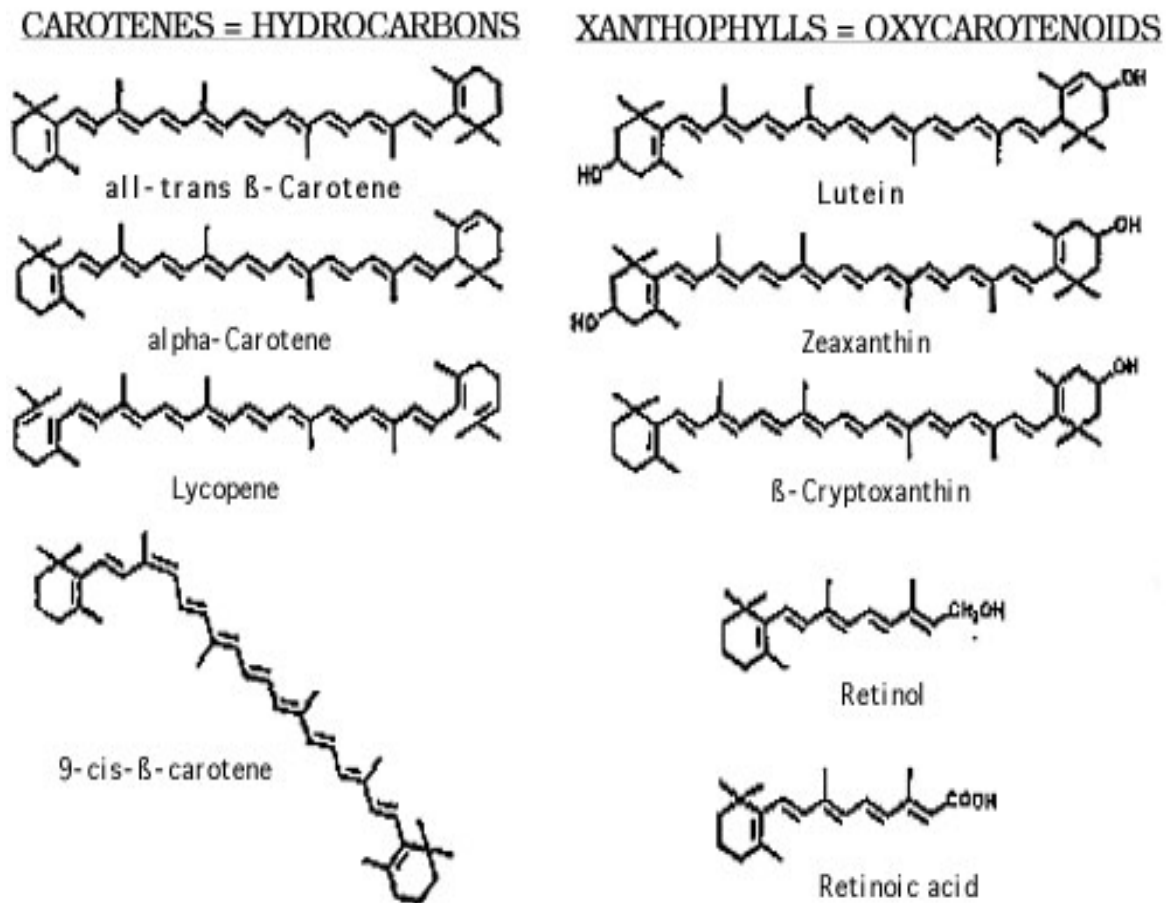
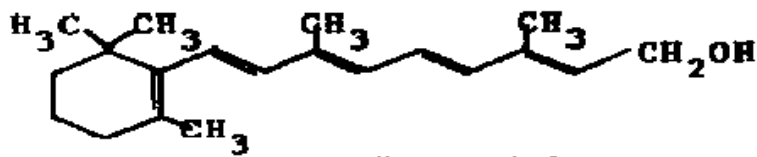
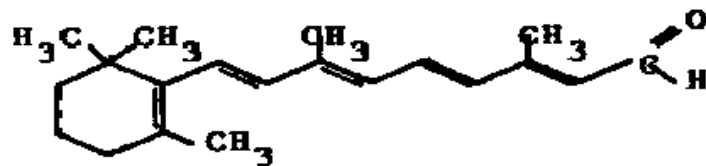


Fig. 2. Estructura química de carotenoides.



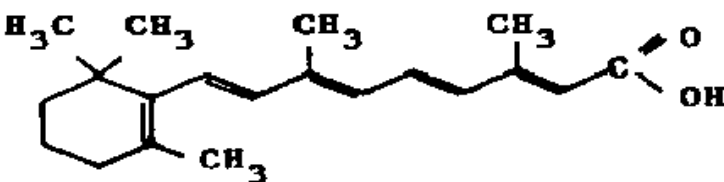
All-trans-retinol

M.W. 286.5



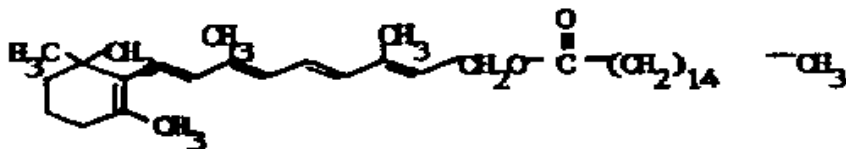
All-trans-retinal

M.W. 284.5



Retinoic acid

M.W. 301.5



Retinol palmitate

M.W. 524.8



Retinol acetate

M.W. 328.5

Fig. 3. Estructura química de retinoides

La cadena larga del β -caroteno habitualmente es dividida a la mitad por una enzima que está presente en el intestino produciendo dos moléculas de retinol (McLaren & Frigg, 2002). El otro tipo de carotenoide, incluidos la luteína, el licopeno y otros, no pueden formar vitamina A.

3.4. Propiedades químicas

En solución, los retinoides y carotenoides se pueden convertir a isómeros geométricos por la luz, el calor y yodo a través de isomerismo *cis-trans* de la cadena de dobles enlaces.

Por su largo número de dobles enlaces, los carotenoides tanto en plantas como en animales se presentan casi exclusivamente en la forma *trans*. Estos sistemas absorben luz y en el caso de los carotenoides parece que apagan radicales libres. Para los retinoides, el grupo funcional en la posición 15 determina la reactividad química específica. Así, el retinol puede ser oxidado a retinal y ácido retinoico o esterificado con ácidos orgánicos; el retinal puede ser oxidado a ácido retinoico o reducido a retinol; y el ácido retinoico puede ser esterificado con alcoholes orgánicos (Combs, 1992).

La mayoría de las formas de la vitamina A son cristalizables pero tienen un punto de fusión bajo (retinol: 62-64°C, retinal: 65°C). Ambos, retinoides y carotenoides tienen un gran espectro de absorción. La vitamina A y los carotenoides de pro-vitamina A son muy sensibles al oxígeno en el aire, especialmente en presencia de luz y calor; por eso, el aislamiento de estos compuestos requiere de la exclusión de aire y la presencia de un antioxidante (Combs, 1992)

Los diferentes carotenos se almacena también en el tejido graso de la piel (palmas de las manos y pies principalmente), por lo que se puede subsistir largos períodos sin su aporte (Marks, 1975)

La función principal de la vitamina A es la protección de la piel y su intervención en el proceso de visión de la retina. También participa en la elaboración de enzimas en el hígado y de hormonas sexuales y suprarrenales. El déficit de vitamina A produce ceguera nocturna, sequedad en los ojos (membrana conjuntiva) y en la piel y afecciones diversas de las mucosas. En cambio, el exceso de esta vitamina produce trastornos, como alteraciones óseas, o incluso inflamaciones y hemorragias en diversos tejidos. El consumo de alimentos ricos en vitamina A es recomendable en personas propensas a padecer infecciones respiratorias (gripes, faringitis o bronquitis), problemas oculares (fotofobia, sequedad o ceguera nocturna) o con la piel seca y escamosa (acné incluido) (Marks, 1975).

Debido a que los carotenoides absorben en forma máxima a diferentes longitudes de onda y tienen diferentes coeficientes de absorción, los resultados obtenidos de la normalización (porcentajes de área) sólo se pueden considerar como proporciones relativas aproximadas. Para la ciencia de los alimentos y para propósitos nutricionales, los resultados son sólo útiles si se presentan en términos de concentración, es decir, peso de la provitamina por unidad de peso de la muestra. Esto se puede realizar en HPLC mediante curvas de calibración interna o externa (Rodríguez-Amaya, 1997).

3.5. Mecanismos de acción

La vitamina A (retinol) y el β -caroteno y otros carotenoides provitamina A, son liberados en el estómago y al igual que todos los demás lípidos son absorbidos por la pared del intestino delgado y se transforman en parte de los quilomicrones que ingresan al torrente sanguíneo. Desde aquí son tomados por el hígado, donde son almacenados en forma de retinil éster principalmente en células estrelladas. Para ser transportado a otras partes del organismo, el retinol se une a su propia proteína, la proteína ligante de retinol (RBP por su sigla en inglés) y a otra proteína llamada transtiretina (TTR por su sigla en inglés) (Figura 4).

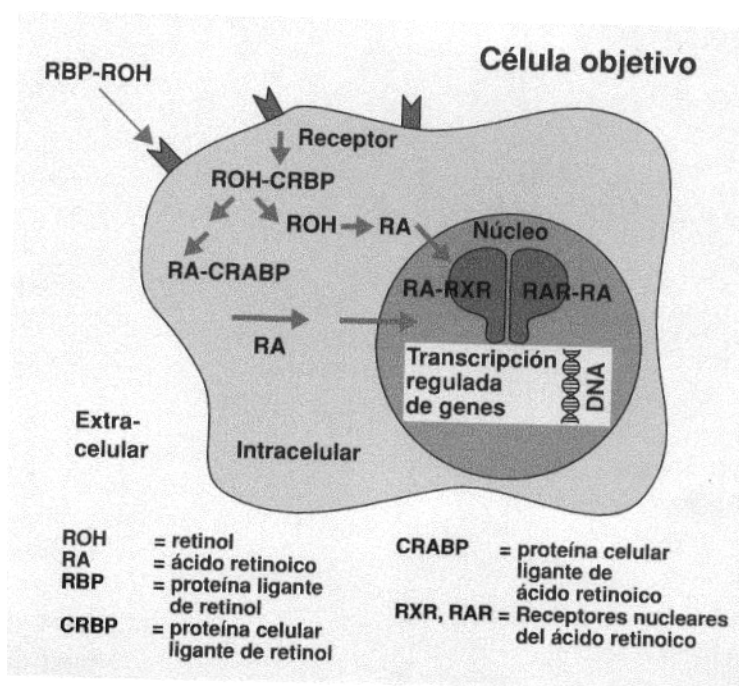


Fig. 4. Mecanismo de acción del ácido retinoico.

Recientemente se ha descubierto que en el núcleo de las células hay dos conjuntos de tres receptores nucleares (conocidos como RAR y RXR por su sigla en inglés) (ver figura 4). Estos receptores nucleares son activados por una forma acídica de retinol como el ácido retinoico (RA por sus siglas en inglés). En las células de los órganos y tejidos de todo el organismo el RA es la forma activa de la vitamina A. Se ha demostrado que los receptores nucleares RAR y RXR activan numerosos genes. Estos receptores actúan como hormonas, tales como los esteroides y las hormonas tiroideas, con las cuales están vinculadas estrechamente. Es a través de este mecanismo que la vitamina A ejerce sus funciones, con la única excepción de la visión. En las células de la retina (conos y bastoncillos) responsables de la visión, la forma funcional de la vitamina A no es el ácido retinoico (RA) sino el 11-*cis* retinal (McLaren, 2002).

Los bastoncillos de la retina contienen una proteína, la opsina, ligada a una forma de vitamina A, el 11-*cis* retinal, que forma un compuesto sensible a la luz, la rodopsina o púrpura visual. Al ser expuesto a la luz, el 11-*cis* se convierte en todo-*trans* retinal y genera un impulso nervioso. Cuando hay deficiencia de vitamina A, se reduce el suministro de retinal con el deterioro consiguiente de la función de los bastoncillos (McLaren, 2002).

3.6. Aislamiento

En la naturaleza la vitamina A se encuentra como éster, y por lo tanto es altamente soluble en solventes orgánicos pero no en soluciones acuosas. El β -caroteno, tiene propiedades en solventes similares. Uno de los recursos más ricos de vitamina A en particular son los aceites del hígado de peces y mamíferos marinos. Los ésteres pueden ser aislados directamente de éstos aceites por destilación molecular a muy baja presión.

Alternativamente, la vitamina A puede ser extraída directamente con cloroformo o con otra combinación de solventes, tales como hexano junto con etanol, seguido por purificación de la vitamina A por medio de cromatografía. Para hidrolizar los esteres, no sólo de vitamina A y carotenoides sino también de triglicéridos y otros lípidos se usa comúnmente la saponificación con KOH, seguida por la extracción con solventes orgánicos (Machlin, 1991).

3.7. Dificultades en la medición de provitamina A

Rodríguez-Amaya (1997), hace mención en que hay que tomar en cuenta varios aspectos para la determinación y contenido de provitamina A en alimentos para poder tener una validez y confiabilidad en los datos que se obtienen, ya que se suelen presentar varias dificultades en el análisis de carotenoides.

Rodríguez-Amaya (1997) también menciona que para estas dificultades de análisis se pueden comprender los siguientes factores:

- Existen muchos carotenoides naturales
- La composición de los carotenoides en los alimentos varía tanto cualitativa como cuantitativamente
- Las concentraciones de carotenoides en un alimento dado cubren un amplio rango
- Sólo unos pocos carotenoides son provitaminas A y aquellos que lo son varían en su bioactividad
- Los carotenoides tienen una predisposición a la isomerización y oxidación

Por estos factores pueden ocurrir problemas al separar, identificar y cuantificar los carotenoides junto con su degradación al momento de realizarse el análisis.

Sin importar el método que se escoja, se deben tomar ciertas precauciones para evitar transformaciones y pérdidas cuantitativas de los carotenoides durante el análisis. Estas incluyen (Rodríguez-Amaya, 1997):

- Completar el análisis dentro del plazo más breve posible
- Usar solventes de grado reactivo o destilados libres de impurezas nocivas, tales como éter etílico libre de peróxidos y tetrahidrofurano, o cloroformo libre de ácido.
- Proteger de la luz
- Excluir oxígeno, por ejemplo utilizando una atmósfera al vacío, de nitrógeno o de argón
- Evitar altas temperaturas

Históricamente muchos de los datos de los carotenoides se han obtenido midiendo la absorción total a una longitud de onda determinada, o más comúnmente por una cromatografía de columna abierta seguida por una cuantificación espectrofotométrica como en el método de la AOAC (Hart *et al.* 1995).

Tee & Lim (1991), realizaron un trabajo en donde se determinaron los contenidos de β -caroteno de cuarenta vegetales y catorce frutas utilizando un método cromatográfico de columna abierta de la AOAC, y se comparó con un método nuevo desarrollado con HPLC fase reversa, en el cual los carotenoides se separaron isocráticamente en una columna C18 (octadecilsilano) usando una mezcla de acetonitrilo, metanol y etil acetato. Los resultados obtenidos mostraron que el método de la AOAC dio resultados falsamente elevados para muestras que contenían α -caroteno, así como aquellos con muy bajas concentraciones de β -caroteno. Por otro lado, los métodos de HPLC separaron exitosamente y cuantificaron la

mayoría de los carotenoides presentes; luteína, criptoxantina, licopeno, γ - y α - carotenos además de β -caroteno. Este estudio demostró que el método de HPLC dará una imagen más completa de la composición de carotenoides así como una cuantificación más precisa del valor de la vitamina A de vegetales y frutas.

También se puede requerir de antioxidantes y agentes neutralizantes especialmente cuando el análisis es prolongado. Las muestras después de cortarse se deben extraer inmediatamente para evitar la oxidación enzimática. De hecho, la desintegración de la muestra y la extracción con un solvente orgánico se realizan generalmente en forma simultánea. Una buena medida es comenzar el análisis tan pronto como se recolecten las muestras debido a que es difícil preservar las muestras sin alterar su composición (Rodríguez-Amaya, 1997).

Rodríguez-Amaya menciona cuales son los errores comunes al analizar carotenoides los cuales se mencionan a continuación:

- Muestras que no representan los lotes de alimentos bajo investigación
- Extracción incompleta
- Pérdidas en la partición, saponificación y lavado
- Separación incompleta
- Mala identificación
- Fallas en la cuantificación y cálculo
- Isomerización y oxidación de los carotenoides durante el análisis

La revista *food chemistry* en su volumen 54 publicado en 1995, publicó un trabajo en el cual se describe un método para el análisis de carotenoides en vegetales y frutas utilizando el HPLC. Sus análisis demuestran que los mejores recursos ($>1000\mu\text{g}/100\text{g}$) de β -caroteno son el brócoli, zanahoria, lechuga, espinaca, perejil y berro. Su estudio demostró la necesidad de una evaluación cuidadosa de procedimientos analíticos y validación de respuestas de carotenoides, esto para evitar factores que causen variación y errores en la determinación cuantitativa de carotenoides.

Por otra parte, con la finalidad de controlar la calidad de alimentos infantiles instantáneos se efectuó la validación de la metodología para la determinación de la vitamina A por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Para la precisión del sistema se evaluaron tres parámetros: tiempo de retención, área y altura. Cada técnica que ha sido propuesta para la medición de vitamina A en alimentos infantiles tiene sus ventajas y limitaciones, pero, comparado con otros métodos de HPLC, es que en éste método el tratamiento de la muestra se realiza con menos tiempo, en relación con el método oficial de la AOAC (Pérez, 2000).

3.8. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Actualmente se dispone de métodos de laboratorio para medir las cantidades de diferentes formas de retinol, conocidos en conjunto como retinoides, y también los carotenoides individuales. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) ha reemplazado a la mayoría de los métodos siendo también, más cara y con necesidad de instalaciones de alta calidad.

Los métodos cromatográficos involucran el paso de una solución (la *fase móvil*) a través de un medio (la *fase estacionaria*) que presenta una adsorción selectiva para los distintos componentes solutos de la muestra. La rapidez con la que pasa cada componente de la fase móvil depende de manera inversa de la fuerza con la que interactúe con la fase estacionaria. Una de las ventajas del HPLC sobre los otros métodos cromatográficos habituales es que en éstos, sólo se aplica una pequeña presión hidrostática para hacer que los fluidos pasen a través de la columna y la elusión (paso a través de la columna) requiere varias horas, por lo que esos procesos son muy lentos y en ocasiones perjudiciales para los productos sensibles; además, la muestra tiende a esparcirse, debido a la difusión, a medida que baja a lo largo de la columna. Cuanto más dure el experimento, más grave será la extensión y quedará afectada la resolución de los componentes. En cambio con la técnica del HPLC se utilizan presiones de 2000 a 3000 psi para hacer que las soluciones pasen rápidamente a través de la resina. Este nivel de presión ha requerido el desarrollo de resinas no compresibles y columnas metálicas fuertes en las que se lleva a cabo el proceso. De esta manera las separaciones que antes llevaban horas, ahora pueden realizarse en minutos y con una resolución más elevada (Mathews *et al*, 2002).

La cromatografía en sus muchas formas es ampliamente utilizada como un separador y una técnica analítica. Se utiliza para la separación de un gran espectro de productos farmacéuticos, alimentos y compuestos bioquímicos. Las ventajas del HPLC sobre otras formas de cromatografía líquida se pueden resumir así: (i) la columna de HPLC puede ser utilizada varias veces sin regeneración; (ii) la resolución alcanzada en tales columnas excede por mucho los métodos viejos; (iii) la técnica es menos dependiente de la habilidad del operador; (iv) la instrumentación del HPLC deja a sí mismo la automatización y

cuantificación; (v) los tiempos de análisis son generalmente mucho más cortos. (Hamilton, *et al.* 1977).

3.8.1. Equipo básico para HPLC

3.8.1.1. Fase móvil. El intervalo de solventes que se pueden utilizar como fase móvil para el HPLC es amplio. Son comunes el agua y soluciones amortiguadoras acuosas, así como también muchos solventes no acuosos de baja viscosidad. Los solventes de alta viscosidad se evitan ya que requieren de un mayor tiempo para pasar a través de la columna, lo cual provoca un ensanchamiento del pico, una resolución muy pobre, y una presión más alta para forzar al solvente a través de la columna (Pomeranz y Meloan, 1994).

Los solventes utilizados deben estar libres de partículas suspendidas así como de impurezas químicas. Las partículas suspendidas tienden a tapar la columna y las impurezas químicas producen falsos picos en el detector. Si se quiere tener una buena separación con HPLC, se deben de usar solventes altamente puros. La muestra también es un problema, se debe estar seguro de que no hay partículas suspendidas o no disueltas en la muestra antes de ser inyectada en la columna. Para asegurar que la muestra está libre de partículas se pasa a través de un filtro, se recomienda un filtro de Teflón de 0.45 μ m para solventes orgánicos. (Pomeranz y Meloan, 1994).

3.8.1.2. Bomba. La bomba es una de los principales componentes de una cromatógrafo líquido de alta resolución. Pomeranz y Meloan (1994), mencionan que una buena bomba para HPLC debe tener las siguientes características:

1. Alta presión para forzar los líquidos a través de la columna.

2. Capacidad para obtener tasas de flujo reproducibles y estables en el intervalo de 30- a 200 mL/hr, utilizando una variedad de solventes con una medida de flujo natural, y tasas de flujo independiente de la presión de la columna.
3. Flujo no palpitante para lograr una sensibilidad completa de los detectores.
4. Capacidad para cambiar incluso solventes inmiscibles fácil y rápido.
5. Permitir una máxima libertad para escoger solventes, incluso aquellos que son volátiles y corrosivos.
6. Gradiente de elusión hábil y capaz para mezclar solventes en proporciones deseadas.
7. Alta confiabilidad y mantenimiento mínimo.

3.8.1.3. Gradiente de Elusión. Si la composición del solvente se mantiene constante a través de toda la separación, el proceso se llama *elusión isocrática*. Pero, si la composición del solvente se cambia de cualquier manera (pH, intensidad del buffer, mezclas de diferentes solventes), entonces el proceso se llama *gradiente de elusión*. El gradiente de elusión es particularmente utilizable cuando se separan mezclas que tienen varias características, por que los empaques de las columnas generalmente funcionan bien solo en un intervalo reducido de las características de muestra. Sin embargo, si las características del solvente se van cambiando progresivamente, entonces el comportamiento del compuesto de la muestra se alterará (Pomeranz y Meloan, 1994)

3.8.1.4. Columnas y Empaquetamiento de columnas. Las columnas para HPLC normalmente son de 10-30 cm de largo y 3-10 mm de diámetro. Son comúnmente hechas de acero inoxidable. Las altas presiones utilizadas requieren de un material de

empaquetamiento muy duro. Por estos requerimientos, las partículas de la columna están comúnmente hechas de sílica o alumina y consiste de partículas redondas. Pomeranz y Meloan (1994), mencionan que normalmente hay tres tipos generales de partículas: las completamente porosas, las peliculares y las microporosas.

- Completamente porosas: Las partículas completamente porosas las hay de varios tamaños, pero un tamaño popular para trabajar es de cerca de 50 μm de diámetro. Tienen un área superficial muy grande de 300-500 m^2/g . Esta gran área significa una gran capacidad de la columna, por lo que estos materiales son utilizados para separaciones preparativas. El tiempo de retención con partículas completamente porosas son un poco más largos por que las distancias de difusión (25 μm dentro y 25 μm fuera) pueden ser más largas. Ejemplos de estas son Porasil, Styragel, y el Porasil Durapak y Porasil Bondapak .
- Peliculares: Las partículas peliculares consisten de un núcleo sólido con una cubierta grabada a la superficie de 2 a 3 μm . También miden cerca de 50 μm de diámetro, pero su área superficial (10-30 m^2/g) es mucho menos que las de las partículas completamente porosas. Entonces la capacidad de la columna es mucho menor, pero por sus pequeñas distancias de difusión (2 μm dentro y 2 μm fuera) son altamente eficientes y excelentes para separación analítica. Ejemplos de ellas son Corasil y Corasil Durapak y Corasil Bondapak.
- Microporosa: Miden aproximadamente 10 μm de diámetro son partículas completamente porosas. Son altamente eficientes y tienen un embalaje de alta velocidad y se utilizan para las separaciones más eficientes. Su elevada porosidad, significa que es posible una carga más pesada que la de las partículas peliculares.

Además ya que las distancias de difusión de las partículas microporosas son pequeñas, tienen muy buena eficiencia. Ejemplos de materiales microporosos con micro-Porasils, Bondapaks, y Styragels.

Diagramas del los tipos de empaquetamiento de columnas:

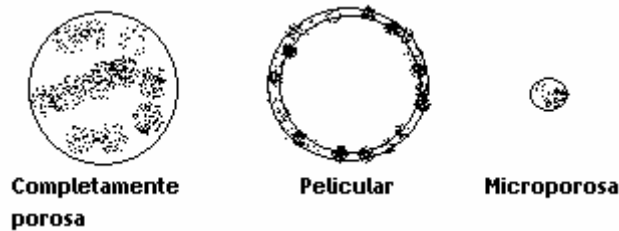


Fig. 5. Tipos de empaquetamiento de columnas

3.8.1.5. Detectores. El detector es otro de los componentes críticos de un cromatógrafo líquido de alta resolución. Hay diferentes tipos de detectores a continuación se mencionarán los más comunes (Pomeranz y Meloan, 1994):

- Detector de absorción ultravioleta: Este detector utiliza una lámpara de mercurio de baja presión como recurso. Normalmente, tienen rango de absorbancia de 0.001 a 3 unidades de absorbancia. El detector UV es particularmente útil para muchos componentes alimenticios, aditivos, pesticidas y medicinas, ya que estos compuestos contienen grupos funcionales $-C=C-$, $-C=O$, $-N=O$ y $-N=N-$, los cuales absorben radiación UV.

- Detector de índice de refracción: El detector de índice refractivo (RI) se aplica a todos los compuestos aunque no es tan sensible como el detector UV. En el detector RI deben pasar 5×10^{-7} g/mL a través del detector para una muestra favorable. Los detectores de índice de refracción son difíciles de utilizar con un sistema de gradiente de elusión y el control de la temperatura de los solventes es crítico.
- Detector de fluorescencia: Una forma de disminuir los límites de detección de muchas variedades de compuestos, es midiendo su fluorescencia natural. Los compuestos que no fluorescen naturalmente pueden reaccionar a veces, después de la separación, con agentes específicos para formar un producto fluorescente. Los detectores de fluorescencia generalmente tienen límites de detección que son de 100 a 1000 veces más bajos que los de los detectores estándar de UV.

Existen varios métodos para la extracción y análisis de vitamina A en muestras de origen animal, incluso muchas de ellas están registradas en las Normas Oficiales Mexicanas, cada uno utiliza distintos métodos obteniendo diferentes resultados, pero no hay alguno que en sí haga una determinación para ver qué método es el más efectivo. Por tal motivo se hará una comparación de cinco métodos reportados para la extracción de provitamina A para determinar cuál es su efectividad en muestras de jugo de zanahoria.