

7. DISCUSIÓN

Se realizaron cinco metodologías preliminares para seleccionar aquellas que presentaran una buena extracción de provitamina A. Los cambios que se hicieron fueron los siguientes: en la metodología de la Norma NMX-Y-124-SCFI-2003 (Determinación de vitamina A por espectroscopía UV-VIS) el análisis se hace mediante espectrofotómetro UV-Vis (190nm-750nm) sin embargo, al realizarlo de esta manera no se obtenían buenos resultados ya que la absorbancia de la provitamina A era muy baja a estas longitudes de onda. Se hizo entonces, la determinación por HPLC usando un detector de fluorescencia con lo que se logró mejorar un poco el análisis. Aún así las cantidades que se determinaban de provitamina eran muy bajas por lo que se decidió no continuar con estos métodos.

La norma NMX-F-234-1972 (Método de prueba para la determinación de Vitamina A en leches) también indica que la determinación se haga por espectroscopia UV-Vis, viendo los resultados del método anterior, se decidió hacerlo por HPLC.

Siguiendo al pie de la letra la metodología de la norma anterior, se obtuvieron cantidades bajas de provitamina A por lo que se hicieron algunos cambios en el análisis por HPLC. Se usó una columna Discovery C8 con los solventes de la fase móvil correspondientes: Acetonitrilo (75%) y Metanol (25%) ya que junto con tetrahidrofurano, son las típicas fases móviles de la cromatografía de fase reversa apropiados para esta columna (Waters, 2001-2002).

Como fueron tres los métodos que se usaron para el análisis, a partir de ahora se referirá como método I al de la NMX-F-234-1972, método II al de la NOM-091-SSA1-1994, y método III al realizado por Hart & Scott (1995).

I. En la **NMX-F-234-1972**, se agregó primero KOH con la finalidad de hidrolizar los esteres de vitamina A y carotenoides por la acción de la base y poderlos analizar posteriormente. Se reemplazó el aire por nitrógeno antes de saponificar, para evitar oxidaciones de la provitamina. Se usó éter de petróleo, el cual es un solvente no polar para realizar la separación por extracción, ésta se realizó cuatro veces más. Después de la evaporación del éter, los residuos se recuperaron con hexano que es un buen solvente para lípidos de baja polaridad, el hexano (punto de ebullición 69°C) es mejor que el cloroformo (punto de ebullición 62°C) ya que es menos volátil y por lo tanto mejor para almacenar lípidos, también es más barato y menos tóxico que el cloroformo (Boulton y Baker, 1988).

II. En la **NOM-091-SSA1-1994**, También se hace primero una saponificación con KOH bajo corriente de gas nitrógeno, pero en este caso se usa ácido ascórbico como antioxidante ya que posee un nivel reductor elevado (Index Merck, 1996). Al terminar la saponificación, se transvasó la suspensión a un embudo de separación. Un problema que se puede presentar en esto, es la formación de emulsiones, que se da como resultado de la precipitación de lípidos causada por el movimiento de la mezcla en la fase acuosa de un solvente polar. La formación de emulsiones se puede prevenir incluyendo una cantidad sustancial de sal. Posteriormente se filtró la solución lavada con un filtro que contenía Na₂SO₄, el cual retiene el agua al ser filtrada. Se evapora el disolvente al igual que en el método anterior y se disuelve el residuo con 2-propanol al 1% en n-hexano, éste es el único método en el cual se filtra la solución que contiene la fase móvil con el extracto, lo cual hará que haya menos interferencia en la determinación cromatográfica.

III. En el método de **Hart y Scott** (1995), se usan tetrahidrofurano y metanol, ambos son solventes fuertes (Scott, 1992). Posteriormente se hace la extracción con éter de petróleo y NaCl para evitar emulsiones, después de la evaporación del solvente se recupera el residuo con diclorometano.

Como se puede ver en los resultados, en el método de Hart & Scott (1995) se obtienen las concentraciones más altas de provitamina A en la muestra número 1 (26.0 mg/100gr de zanahoria) sin embargo en las otras dos los resultados difieren considerablemente entre las réplicas (ver Tabla 7). Es probable que esto se haya debido a un error en el trabajo de laboratorio ya que en el momento de vaciar los extractos recuperados con diclorometano, se hayan quedado parte de éstos en el matraz, siendo así diferente la cantidad que se analizó.

Por otro lado en este método se extraen otros carotenoides incluyendo luteína y alfa caroteno aunque en menor cantidad, lo que puede observarse al analizar el pico del cromatograma 3 en donde se nota que no hay una buena separación de los compuestos.

En el Apéndice A, se muestra el resultado de los análisis estadísticos. De acuerdo a este análisis, no se encontraron diferencias significativas entre el método I y II, por lo que ambos métodos serán igual de eficientes, aunque el método II mostró una valores que oscilan entre 6.9 y 13.9 mg / 100 g con una media de 10.4, valores poco mayor que los del método I, dichos valores caen dentro del intervalo de concentración de provitamina A que se informan y que es de 12 mg – 66 mg (Marks 1975, Combs 1992). No se tomó en cuenta en consideración el método III en el análisis estadístico ya que los valores obtenidos de provitamina A, como ya se mencionó presentan una gran diferencia entre las mismas muestras.

El análisis de Tukey para factores por separado, se muestra que no hay diferencia significativa del origen de la muestra, por lo que se deduce que no importa de donde haya provenido, los análisis no se verán alterados.