

50  
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

" C U A U T I T L A N "

**"VALIDACION Y COMPARACION  
DE METODOS QUIMICOS  
PARA LA CUANTIFICACION DE  
VITAMINA H (BIOTINA)  
EN PREMEZCLAS ESTIMULANTES"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A N

ALEJANDRA M. SALAZAR ROMERO

BLANCA LOPEZ RUIZ

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1 9 8 8

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.



## **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 está 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.

## INDICE

**Introducción.**

**Capítulo I. Vitamina H (Biotina).**

**Capítulo II. Fundamento de las técnicas analíticas involucradas.**

**Capítulo III. Desarrollo experimental.**

**Capítulo IV. Resultados.**

**Capítulo V. Análisis de resultados.**

**Conclusiones.**

**Bibliografía.**

## OBJETIVOS

- Recopilar información bibliográfica de métodos químicos para la cuantificación de biotina.
- Validar algunos de los métodos químicos encontrados en la recopilación bibliográfica para la cuantificación de biotina.
- Determinar el método óptimo para la cuantificación de la vitamina antes mencionada a nivel de microgramos.
- Cuantificar biotina en las muestras de premezclas estimulantes.

## INTRODUCCION

Uno de los aspectos más importantes del proceso de formación de un profesional de la Química se alcanza cuando, para la resolución de un problema práctico, se han de tomar en cuenta la diversidad de conceptos teóricos adquiridos a lo largo del currículum académico. En ese momento, las metodologías y los diversos conceptos teóricos alcanzan su máximo significado y las diferentes materias cursadas parecen fusionarse y asociarse en torno del objetivo analítico planteado.

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis se han considerado diferentes metodologías analíticas que, por estructura académica, han sido tratadas separadamente en las aulas y al reconsiderarlas en este entorno práctico, aportan una gran riqueza conceptual y adquieren trascendencia en lo relativo a su extensión, aplicabilidad y limitaciones.

El problema planteado en esta Tesis se orienta hacia la definición de las características esenciales de aquellas mercancías, materia de comercio exterior, que están sujetas a regímenes fiscales de importación o exportación y a establecer las bases técnicas que garanticen la correcta aplicación de la legislación aduanera.

México, a través de instituciones debidamente acreditadas, importa del extranjero preparaciones destinadas a la elaboración de alimentos balanceados para animales que contienen cantidades variables de biotina (vitamina H). Para la aplicación correcta de la fracción 23.07A.005, se debe realizar una determinación

cuantitativa de biotina (cuya cantidad establece el "Valor" comercial de la preparación) en presencia de diferentes excipientes en una forma rápida, económica, reproducible y confiable.

Por consiguiente, en el presente trabajo de tesis se revisan las diferentes metodologías analíticas reportadas en la literatura para la determinación de biotina, se discute su aplicabilidad, se presentan los resultados obtenidos y se seleccionan las técnicas más adecuadas para la determinación bajo las condiciones antes mencionadas.

## CAPITULO I

### Biotina

#### Historia. (1)(2)

La importancia de la biotina en el crecimiento de los microorganismos se remonta a la época de Pasteur en el año de 1860, él notó que para la estimulación del crecimiento de levaduras y otros microorganismos se requería de la presencia de un material albuminoide. De 1872 a 1901 Pasteur abrigó el concepto de "factor esencial" para el crecimiento de los microorganismos. Se contempló la posibilidad de cultivar levaduras sin el "factor esencial" pero se dieron cuenta de que sólo si se adicionaba cerveza fermentada, agua de levadura, peptona o extracto de carne, había crecimiento. Esta actividad fue designada "bios"; se hizo el primer intento de aislamiento y de identificación química en el año de 1902.

En los treinta años siguientes se descubrió que "bios" era una mezcla de factores esenciales. Para 1924 "bios" fue fraccionado en tres sustancias; la primera, designada bios I se identificó como meso-inositol; la segunda, bios II fue reemplazada por ácido pantoténico y por beta-alanina suplementada con L-leucina. La tercera, bios III, fue identificada como biotina.

Durante los años treinta, se hicieron investigaciones independientes sobre el factor para crecimiento de levaduras (bios II B), factor de promoción de crecimiento y respiración para *Rhizobium trifolii* (coenzima R), y factor esencial en la nutrición de ratas (vitamina H); cada uno de estos estudios dieron con el mismo factor, biotina.

La actividad de bios II B fué designada provisionalmente como biotina. En el proceso para su aislamiento se probó que la mejor fuente de esta actividad era la yema de huevo seca. La biotina se aisló de ésta fuente en forma de éster metílico cristalino, y después se probó que su actividad era idéntica a la del factor bios II B.

En el mismo período, una serie de factores designados "factor protectorio X", vitamina H, y "factor protectorio contra el mal de huevo blanco", fueron fraccionados a partir del hígado y subsecuentemente se demostró que eran el mismo factor y que poseían las mismas propiedades a aquél aislado de la yema de huevo, biotina.

Gyorgy y du Vigneaud en 1940 aislaron el éster metílico cristalino de la biotina a partir de hígado y probaron su identidad con el éster metílico de la biotina.

Cuando se usó yema de huevo seca como material inicial, se obtuvieron 1.1mg de biotina cristalina a partir de 250 Kg de yema de huevo seca; teniendo en cuenta que el material inicial contenía aproximadamente 80mg, ésto determinado por ensayo, el aislamiento dió un rendimiento del 1.4%.

Nomenclatura y fórmula.(3)(4)

Nombre aceptado: Biotina.

Nombres obsoletos: Bios II

Bios II B

Vitamina H

Factor X

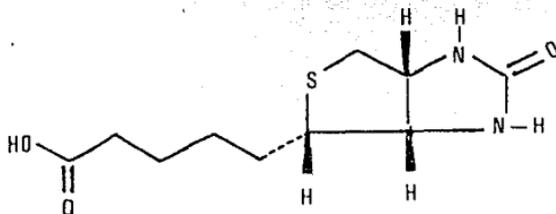
Coenzima R

"Factor anti mal del huevo blanco".

Fórmula empírica: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S.

Nombre químico: Ácido cis-hexahidro-2-oxo-1H-dieno-(3,4)-imidazol-4-valérico, ó, ácido 2'-ceto-3,4-imidazolido-2-tetrahidrotiofenon-valérico.

La siguiente estructura, propuesta en 1942, fué establecida con una síntesis total en 1943 (4).



Química y Propiedades Físicas.(2)(3)(5)(6)

a). Propiedades químicas y físicas.

La biotina cristaliza de agua en forma de agujas largas y finas, cuyo punto de fusión es de 232-233 °C, su gravedad específica es de 1.41. Es un ácido monobásico débil ( $K_a=6.3 \times 10^{-6}$ ). Punto isoeléctrico pH=3.5. El pH de una solución acuosa al 0.01% es de 4.5. Su solubilidad a 25 °C (mg/100ml) es: en agua, aproximadamente 22; en alcohol al 95%, aproximadamente 80. Prácticamente insoluble en solventes orgánicos. La sal de sodio es realmente soluble en agua. La biotina natural (d-biotina) es ópticamente activa,  $[\alpha]^D_{+92}$  en una solución de hidróxido de sodio 0.1N. El compuesto puro es estable al aire y a la temperatura, en solución acuosa es estable a 100°C. Las soluciones moderadamente ácidas son estables por varios meses; las soluciones alcalinas son menos estables, pero parecen ser razonablemente estables arriba de pH de aproximadamente 9. Las soluciones acuosas

son muy susceptibles al crecimiento de hongos. Las soluciones ácidas pueden esterilizarse por calor. La biotina es incompatible con ácido nitroso, agentes oxidantes, formaldehído, cloramina T, ácidos fuertes o álcalis fuertes.

La substancia sintética pura es realmente cara, su precio está alrededor de 18,75 dólares por gramo.

b). Aislamiento.(1)(2)(3)

La siguiente descripción es el aislamiento típico de biotina a partir de la yema de huevo y es procedimiento general de aislamiento de esta vitamina a partir de una variedad de fuentes.

El primer aislamiento fue a partir de 1000 huevos frescos, se extrajo con acetona y se precipitó del filtrado con cuatro volúmenes de alcohol; el precipitado se redisolvió en agua y las impurezas se precipitaron con acetato de plomo, la substancia activa precipitó con ácido fosfotúngstico. El precipitado contenía el factor activo el cual se volvió a purificar con hidróxido de bario y se agitó con carbón activado para adsorber la biotina. El adsorbato se lavó con etanol al 50%, la biotina fue eluída con acetona al 60% conteniendo 2.5% de ión amonio. Se volvió a precipitar con ácido fosfotúngstico y por descomposición con hidróxido de bario se obtuvo la fracción activa soluble en alcohol. Con cloruro de mercurio se removieron las impurezas y se realizó una esterificación con metanol y ácido clorhídrico. El éster metílico fue obtenido en forma cristalina por destilación al alto vacío y cristalización de una mezcla de cloroformo y éter de petróleo.

c). Grupos funcionales.(1)(3)

La fácil saponificación del éster metílico de la biotina indica la pérdida de un grupo metilo. La re-esterificación del ácido libre se puede llevar a cabo con el uso de diazometano; el éster metílico producido de esta forma fué idéntico al aislado de fracciones de hígado. La biotina, en contraste con el éster metílico, no libera vapores de yodo cuando se trata con ácido iodhídrico y consecuentemente no contiene grupos-OCH<sub>3</sub>, NCH<sub>3</sub>, o SCH<sub>3</sub>. Una titulación electrométrica de biotina dió una curva que sería la de un ácido monocarboxílico. La biotina cristaliza de soluciones de ácidos fuertes en forma de ácido libre. Este hecho junto con la curva de titulación indican que el grupo básico de los grupos presentes en la molécula es muy débil.

Por hidrólisis drástica con ácido clorhídrico o hidróxido de bario de la biotina, se obtuvo un ácido diaminocarboxílico, C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S, y se encontró que contenía dos grupos amino primarios. La formación de un ácido diaminocarboxílico fuertemente básico, C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S, a partir de la biotina débilmente básica, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S, con el reemplazamiento de un grupo CO por dos átomos de hidrógeno, mostró una estructura de urea cíclica. Esta proposición fué bien soportada por la resíntesis de biotina a partir del ácido diaminocarboxílico con fosgeno.

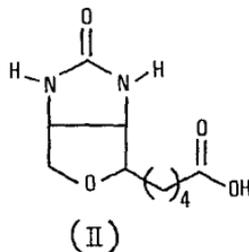
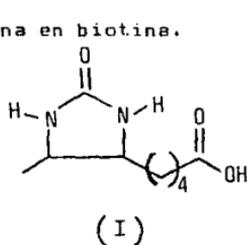
La formación de una sulfona estableció la naturaleza de tio éter del átomo de azufre de la biotina, y se concluyó que la biotina es un ácido monocarboxílico que contiene una estructura de urea cíclica con un átomo de azufre en ligadura de tio éter.

Se obtuvo información muy importante de la estructura de la biotina durante estudios de rompimiento por oxidación del ácido

diaminocarboxílico con permanganato alcalino o con ácido nítrico concentrado. Dicha oxidación resultó en la formación de ácido adípico,  $C_6H_{10}O_4$ . Uno de los dos grupos carboxílicos del ácido adípico debería de estar presente originalmente en el ácido diaminocarboxílico y era muy probable que el ácido adípico formado por la oxidación del ácido diaminocarboxílico apareciera no de la estructura cíclica sino de una cadena lateral alifática  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$  enlazada a un átomo de carbono del anillo de la molécula de biotina (5).

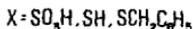
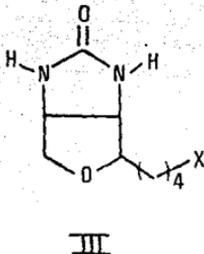
c'). Análogos de la biotina biológicamente activos y derivados. (1)(3)

Existen muchos compuestos análogos a la biotina que tienen actividad biológica. La destiobiotina (I) es uno de ellos y ha sido sintetizada totalmente y también se ha obtenido como un producto de degradación de la biotina. La actividad de este compuesto para estimular el crecimiento de algunos microorganismos se atribuye a la capacidad de estos para convertir la destiobiotina en biotina.



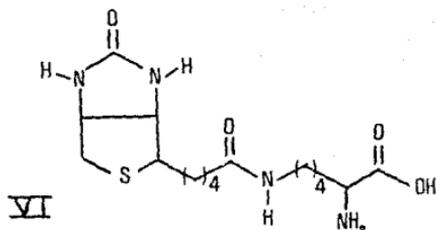
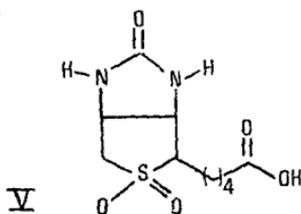
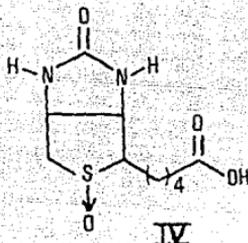
La oxibiotina (II), también sintetizada totalmente, existe sólo en la configuración *cis* con respecto a los anillos.

El ácido sulfónico de la (+,-)-oxibiotina y su correspondiente tiol y benciltioéter (III) son efectivos antagonistas de la biotina para ciertos microorganismos.



También el sulfóxido de biotina (IV) ha sido sintetizado. Se aisló más tarde de un filtrado de cultivo de *Aspergillus niger*, y ahora se cree que tiene algún significado metabólico.

La sulfona de biotina (V) actúa como promotor de crecimiento para levaduras, pero inhibe el crecimiento de ciertos *Lactobacillus* y *Estafilococcus*.



**Biocitina (VI).** Este término se usa para designar a la biotina que se encuentra en forma enlazada en los muchos productos naturales solubles, especialmente durante la autólisis controlada de levaduras activas metabólicamente. La biocitina fue aislada y caracterizada como (+)-épsilon-N-biotinil-L-lisina.

d). Síntesis. (1)(3)(7)

La biotina, constituida por un tetrahidrotiofeno, es el más importante derivado natural del tiofeno.

La biotina tiene dos átomos de carbono asimétricos y, por lo tanto, la molécula puede existir en ocho formas ópticamente activas (cuatro racematos). Todos ellos han sido obtenidos por

síntesis. Sólo una de las formas ópticamente activas, la idéntica a la (+)-biotina natural, es biológicamente activa. Confirmando las deducciones de los estudios químicos, los exámenes de rayos X han mostrado que la unión de los anillos es cis, que la orientación de la cadena lateral con respecto a ellos también es cis y que la configuración absoluta es la que se indica.

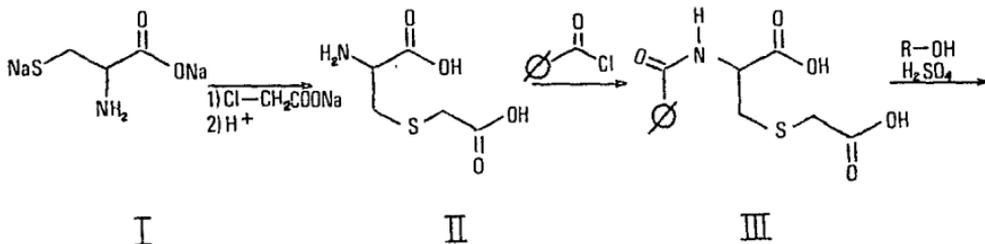
Se han propuesto tres síntesis muy similares para la biotina; la que confirmó la estructura propuesta por du Vigneaud fué la de Harris y sus colaboradores llevada a cabo en los laboratorios de Merck y que a continuación se describe.

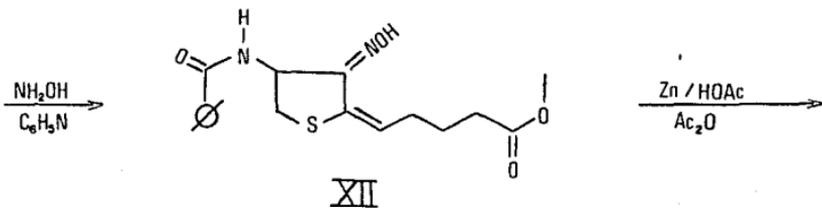
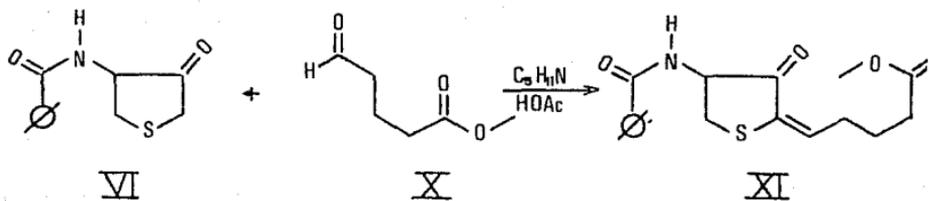
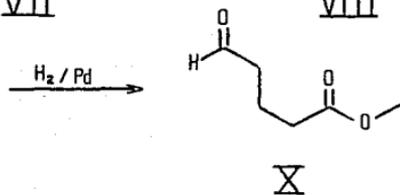
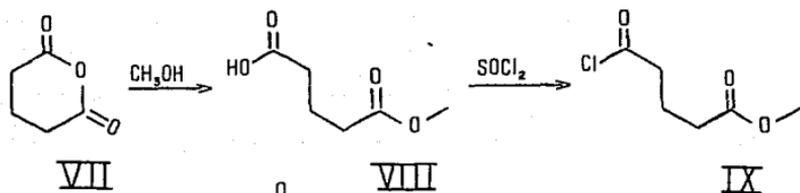
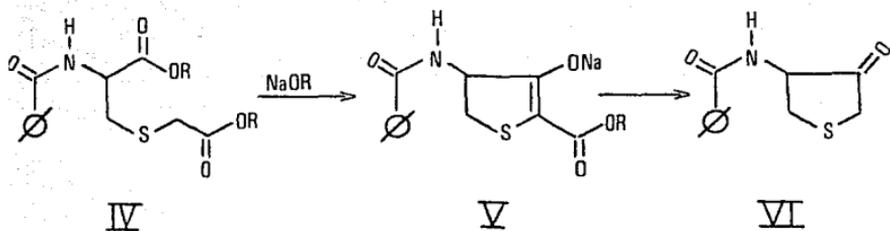
En esta síntesis, los materiales de inicio fueron la cisteína (I) y el ácido cloroacético los cuales fueron condensados. Después de la benzoilación y esterificación, este producto de condensación (II) fué tratado con metóxido de sodio. El compuesto resultante (V) se sometió a descarboxilación después de un tratamiento con ácido clorhídrico en una solución acuosa de ácido acético. El compuesto (VI) contiene el anillo de tetrahidrotiofeno, un grupo amino y un grupo amino potencial en la cetona.

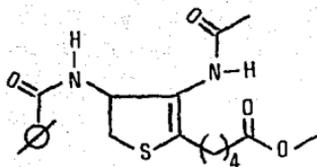
El metil-gama-formilbutirato usado para introducir la cadena lateral de ácido valérico fué preparado a partir de ácido glutárico como material inicial. El anhídrido glutárico (VII) fué tratado con alcohol metílico para formar el éster metílico del ácido glutárico (VIII), el cual fué convertido, con cloruro de tionilo, en el cloruro de gama-metoxibutirilo (IX), y finalmente se hizo una hidrogenación de Rosenmund para convertirlo en aldehído (X).

La condensación de el cetotetrahidrotiofeno (VI) con el producto (X) se realizó usando piperidina y ácido acético como

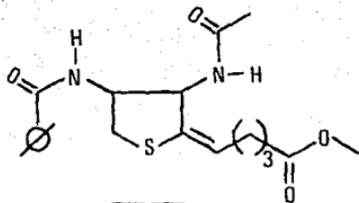
catalizador. La cetona insaturada (XI), después de tratamiento con hidroxilamina en solución de piridina, dió una oxima insaturada (XII). Este compuesto contiene el esqueleto de carbonos de la biotina completo con dos átomos de nitrógeno y el átomo de azufre en la posición apropiada. La reducción del grupo oximino y de la doble ligadura hasta dar un compuesto completamente saturado se realizó en dos pasos. Primero, un tratamiento del compuesto (XII) con polvo de zinc y ácido acético en presencia de anhídrido acético dió como resultado dos compuestos (XIII y XIV) los cuales difieren sólo por la posición del doble enlace. En el segundo paso, se realizó la hidrogenación de éstos compuestos usando un catalizador de paladio y gas hidrógeno, dando compuestos isoméricos completamente saturados (XV). Se realizó una saponificación para obtener el compuesto (XVI). Ambos compuestos, (XV) y (XVI) fueron convertidos en ácido diaminocarboxílico (XVII) siguiendo el procedimiento de du Vigneaud y sus colaboradores después de tratamiento con hidróxido de bario. Así como el correspondiente producto natural, este ácido diaminocarboxílico sintético dió después de tratamiento con carbonato de sodio y fosgeno el compuesto de urea cíclico (XVIII), teniendo la estructura de la biotina natural.



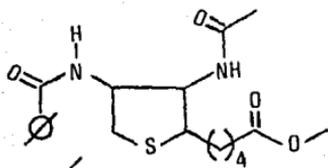




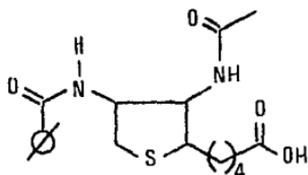
XIII



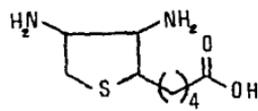
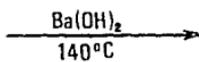
XIV



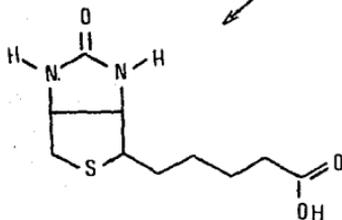
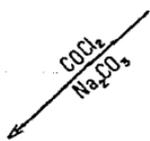
XV



XVI

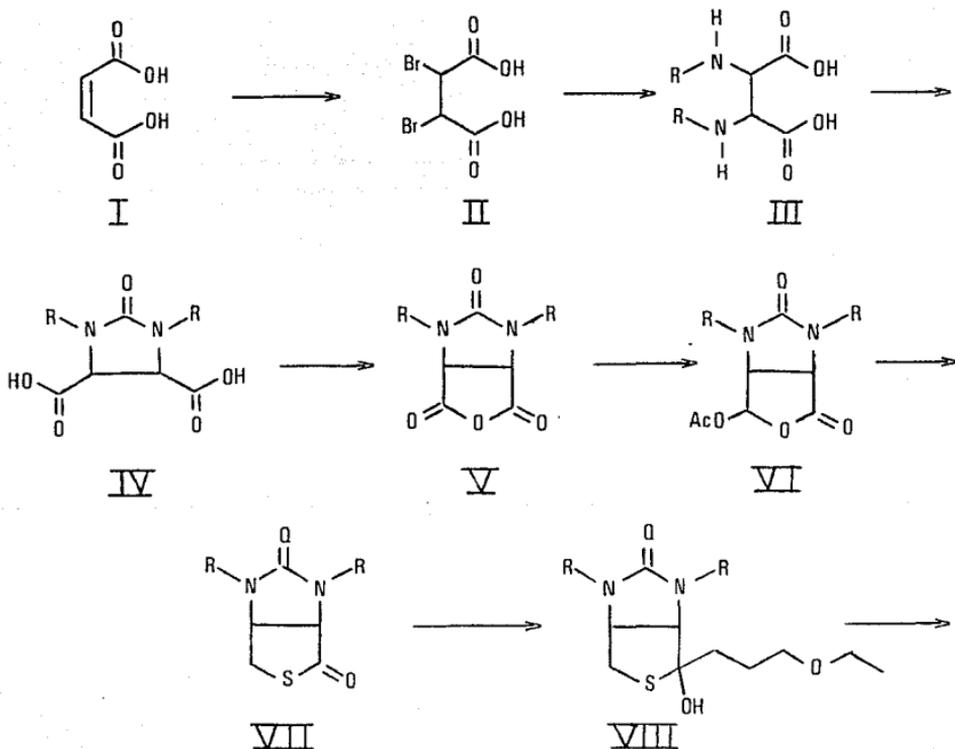


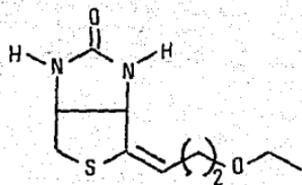
XVII



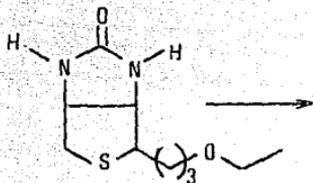
e). Preparación industrial.(3)

La biotina se produce comercialmente por una síntesis desarrollada en los Laboratorios de Investigación de HOFFMAN-LA ROCHE, Inc. Difiere mucho de las síntesis publicadas anteriormente y se caracteriza por el hecho de que es usado como intermediario un ácido mesodiaminosuccínico. Esto automáticamente conduce a la estructura cis del producto final, el cual también es obtenido en la forma ópticamente activa. Las siguientes fórmulas describen la síntesis.

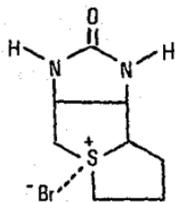




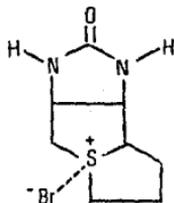
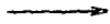
IX



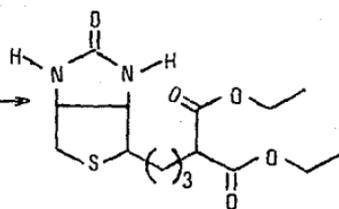
X



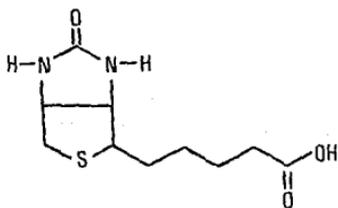
XI



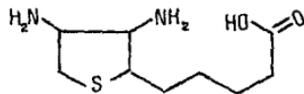
XII



XIII



XIV



XV

### Estimación, (3)(8)(9)(10)

En los productos alimenticios naturales y aún en concentrados, la biotina se encuentra presente en concentraciones extremadamente pequeñas. Consecuentemente su estimación depende principalmente de su efecto biológico en animales superiores y microorganismos. Ningún método químico o físico es eficaz hasta ahora para la estimación de biotina.

El método microbiológico tiene la ventaja de ser técnicamente simple y de procedimientos cortos. Sin embargo, tiene serias limitaciones. La mayoría de los microorganismos usados para el ensayo de biotina responden sólo a biotina libre y no a biotina enlazada. Por lo tanto, los concentrados deben ser preparados a través de un tratamiento enzimático o hidrólisis ácida con el objeto de liberar la biotina enlazada y tenerla en solución acuosa. Además, Los microorganismos pueden tener respuesta a homólogos cercanos, análogos, productos de rompimiento, o precursores, como el ácido pimélico, y otros químicos similares no relacionados como el ácido oléico en una forma más inespecífica que en animales superiores.

La estimación biológica de biotina puede llevarse a cabo en ratas y en pollos provocandoles una deficiencia en biotina por medio de raciones especiales de alimento.

#### Metodo microbiológico:

Una amplia variedad de microorganismos requieren biotina para su crecimiento y muchos de ellos han sido utilizados para su ensayo. Estos incluyen *Clostridium botulinum*, algunas bacterias de ácido láctico y levaduras, *Rhizobium trifolii*, y *Neurospora crassa*. De estos, el más ampliamente usado y que ha tenido un

éxito uniforme ha sido el método de Wright y Skeggs, el cual emplea *Lactobacillus arabinosus* como organismos de prueba. El crecimiento de *L. arabinosus* en un medio basal libre de biotina se incrementa con la concentración de biotina en el rango de 0 a 2mg\* por 10ml de medio. La biotina pura y las muestras con un contenido de biotina a varios niveles dentro de este rango se adicionan a tubos individuales conteniendo 5ml de medio basal; cada tubo se diluye después a 10ml, se tapa, se autoclavea, se enfría, y se inocula. La respuesta del macroorganismo a prueba es generalmente determinando por titulación ácida después de 72 horas de incubación a 37°C; o puede hacerse una estimación turbidimétrica del crecimiento a las 24 horas.

La especificidad del microorganismo que se usa en la prueba por varios derivados de biotina puede ocurrir, sin embargo ninguna de las formas de biotina enlazada, como biocitina, o alguna de las complejas combinaciones de esta vitamina que ocurren naturalmente, pueden estimular el crecimiento en lugar de biotina libre. Por lo tanto, es necesario liberar la biotina de estas combinaciones por medio de una hidrólisis. En la mayoría de los productos, la hidrólisis con ácido sulfúrico 6N a 120°C libera una cantidad máxima de biotina; en algunos productos, sin embargo, este tratamiento destruye algo de biotina.

Ácidos grasos insaturados como el ácido oléico y el ácido linoléico, reemplazan la biotina para *L. arabinosus* cuando están presentes en grandes cantidades, e interfieren con el ensayo de biotina en concentraciones considerablemente bajas.

El método de ensayo para biotina con levaduras es algo más

simple y requiere de menos tiempo del que utiliza *L. arabinosus*, pero requiere aparatos más complejos y una estimación turbidimétrica del crecimiento. Se requieren de los mismos procedimientos de extracción para liberar la biotina que con *L. arabinosus*.

### Farmacología.(3)

La administración de biotina, ya sea en un sola dosis elevada o en pequeñas dosis múltiples, no tiene una acción farmacodinámica muy apreciable.

En perros y ratas no se han observado efectos tóxicos al administrarles grandes dosis de biotina. Tampoco hay signos de irritación después de la aplicación local de biotina en la cornea (conejos) o después de inyección intradérmica (cuyos) o intramuscular (conejos).

La secreción del ácido clorhídrico por las glándulas gástricas parece ser disminuída por d-biotina. La función renal y metabólica no experimenta cambios después de la administración de una dosis elevada de biotina. Dosis orales repetidas de biotina no producen cambios en la función hepática o renal, fibrinógeno de la sangre, temperatura rectal, sensibilidad en las terminaciones nerviosas y regeneración de la piel.

Algunos estudios farmacológicos en ratas deficientes de biotina revelaron algunos hechos interesantes. La amplitud de las contracciones de útero o intestino aislados de ratas deficientes de biotina es menor que la de animales normales de la misma edad. La biotina adicionada a la solución Ringer-Lock en la que fueron suspendidos los organos aislados, no alteró las contracciones.

## Fuentes. (5)

La biotina se encuentra ampliamente distribuida en materias naturales y es probablemente el constituyente universal de las células vivas. Aún en las fuentes más ricas, la concentración absoluta de vitamina es muy baja, del orden de una parte por millón, por tanto, se requieren grandes cantidades del material inicial para extraer la cantidad suficiente de biotina.

Las fuentes más ricas en biotina son el hígado, el riñón, páncreas, yema de huevo, levaduras, y leche. Los vegetales frescos y algunas frutas contienen cantidades apreciables y la carne y pescado de todos tipos contienen la vitamina en pequeñas cantidades. Se ha reportado que la gelatina Royal es muy rica en biotina.

## Presentaciones Comerciales

Debido a que la biotina por sí misma es muy estable y se presenta en forma sólida no es necesario someterla a ningún tratamiento especial de acondicionamiento, ya que estos tienen el fin de incrementar la estabilidad de aquellas vitaminas que se degradan fácilmente al estar en contacto directo con el medio ambiente.

Las presentaciones comerciales de la biotina para uso veterinario consisten en una mezcla de ésta con excipientes, los excipientes que generalmente se utilizan son: Carbonato de sodio, silicatos, fosfato tricálcico, almidón, dextrina o algún tipo de harina vegetal.

Esta presentación se hace con el fin de dosificarla y poderla incorporar fácilmente a las formulaciones de alimentos.

## CAPITULO II

### FUNDAMENTO DE LAS TECNICAS ANALITICAS UTILIZADAS

#### 1. Espectroscopía:

##### A). Infrarrojo. (11)

La radiación infrarroja se refiere a la parte del espectro electromagnético situado entre las regiones visible y de microondas. Comprende la porción entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $666\text{ cm}^{-1}$  (2.5-15.0-micrones). Las posiciones de las bandas en un espectro de infrarrojo se pueden expresar como números de onda o como longitudes de onda. La unidad de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) es más utilizada ya que es directamente proporcional a la energía de la vibración. La longitud de onda se reporta en micrones. La relación entre número de onda y longitud de onda se establece como sigue:

$$\text{cm}^{-1} = 1/\mu\text{m} \cdot 10^4$$

El contenido energético asociado a cada número de onda en el espectro de infrarrojo produce una absorción diferencial de la energía incidente lo que se traduce en un aumento de la frecuencia vibracional molecular. Considerando que cada enlace molecular posee un valor discreto de energía vibracional, el espectro de infrarrojo que se obtenga contendrá información relativa al tipo de grupos funcionales presentes en la molécula.

La interpretación de la información espectral se puede realizar tomando en consideración los diferentes modos vibracionales conocidos (stretching, y bending) que se reportan en publicaciones especializadas (1) o por comparación del espectro contra espectros de referencia.

## B). Resonancia Magnético Nuclear (12).

El núcleo de hidrógeno tiene propiedades magnéticas. Cuando un compuesto que contiene hidrógeno se coloca en un campo magnético fuerte y simultáneamente se irradia con energía electromagnética, los núcleos de hidrógeno del compuesto pueden absorber energía mediante el proceso conocido como resonancia magnética.

El protón que gira genera un pequeño momento magnético que coincide con el eje de rotación, de modo que el núcleo actúa como un pequeño imán en forma de barra.

Cuando un compuesto que contiene hidrógeno es colocado en un campo magnético externo, los protones pueden alinearse en una de dos formas con respecto al campo magnético externo. El momento magnético del protón puede estar alineado con el campo externo o contra él. Las dos alineaciones del protón no son de igual energía. Cuando el protón está alineado con el campo magnético su energía es menor que cuando está alineado contra el campo magnético.

En un espectrómetro de resonancia magnética nuclear, se suministra energía mediante radiación electromagnética en la región de la frecuencia de radio, de esta manera el protón es desviado de su estado de energía inferior (alineado con el campo) a su estado de energía superior (alineado contra el campo). La energía que se requiere es proporcional a la del campo magnético.

En un campo de 14.092 gauss, una radiación electromagnética de 60MHZ (60 megahertz o 60 millones de ciclos por segundo) suministra la cantidad correcta de energía.

La relación entre la frecuencia de la radiación,  $\nu$  y la fuerza de campo magnético,  $H_0$ , es:

$$\nu = gH_0/2\pi$$

donde:

$g$  = constante giromagnética (26,750 para el caso del núcleo de hidrógeno)

$H_0$  = Intensidad de campo magnético en gauss

$\nu$  = frecuencia en Hz

Los espectrómetros de RMN están diseñados para que la frecuencia de radio se mantenga constante (60MHz) y se hace variar el campo magnético. Cuando el campo magnético se encuentra a la fuerza correcta, los protones cambian de un estado a otro y al hacerlo absorben energía de radiofrecuencia. Esta desviación de los protones genera una pequeña corriente eléctrica en una bobina de alambre que rodea a la muestra. Después de amplificarla, la corriente se presenta como una señal en el espectro. Puesto que el núcleo involucrado es el protón, el espectro suele llamarse RMP (resonancia magnética protónica).

La fuerza del campo magnético se mide a lo largo de la parte inferior de los espectros en la escala  $\delta$  (delta) en unidades de ppm (partes por millón) y en la parte superior en ciclos por segundo. La fuerza del campo magnético aumenta de izquierda a derecha. El resultado de un espectro de RMP muestra muchos picos de absorción que reflejan las diferencias en el ambiente de los protones, por lo que pueden dar gran información con detalle acerca de la estructura molecular.

Los aspectos que se deben tener en cuenta para la

interpretación de un espectro de RMP son los siguientes:

- a). El número de señales; el que indica cuantos tipos diferentes de protones hay en una molécula;
- b). Las posiciones de las señales; las cuales representan algo acerca del ambiente electrónico de cada tipo de protón;
- c). Las intensidades de las señales; las que indican cuantos protones de cada tipo hay;
- d). La división de una señal en varios picos; la que nos revela el ambiente de un protón con respecto a otros protones cercanos.

#### C). Espectrometría de Masas. (13) (14)

Por medio de la espectrometría de masas se obtienen pesos moleculares exactos; puede dar una fórmula molecular, o al menos, reducir las posibilidades a muy pocas y puede indicar la presencia de ciertas unidades estructurales en una molécula.

En un espectrómetro de masas las moléculas en el estado gaseoso y a baja presión son bombardeadas con un haz de electrones energéticos y uno de los efectos que este bombardeo produce es desprender uno de los electrones de la molécula y producir un ión de carga positiva llamado ión molecular. Cada tipo de ión tiene un razón de masa a carga o un valor  $m/z$ . La carga es 1 para la mayoría de los iones, por lo que  $m/z$  representa su masa.



Ion molecular

Un haz de electrones con una energía de 70 electronvolts (aproximadamente 1600 Kcal/mol) no sólo desprende los electrones de las moléculas produciendo iones moleculares, sino que también

imparte a los iones moleculares un excedente muy grande de energía. Después de que se forman los iones moleculares la mayoría se rompen en pedazos; se fragmentan. La fragmentación se puede efectuar de diversas maneras dependiendo del exceso de energía interna contenido en el ión molecular.

El conjunto de iones se analiza de tal manera que se obtiene una señal para cada valor de  $m/z$ ; la intensidad de cada señal refleja la abundancia relativa del ión que produce la señal. El pico mayor se denomina pico base y su intensidad se toma como 100%, la de los otros máximos se expresa en relación con el de la base.

Un diagrama que ilustra las intensidades relativas de las señales correspondientes a los diversos valores  $m/z$  se denomina espectro de masas, el cual es característico para cada compuesto.

La mayoría de los elementos se encuentran naturalmente en forma de varios isótopos: predominando el más liviano y siendo más escasos los más pesados.

En el espectro de masas, el máximo  $M^+$  se debe solamente a las moléculas que contienen el isótopo más común de cada elemento. Conociendo las abundancias naturales relativas de los isótopos, se puede calcular para cualquier fórmula molecular, la intensidad relativa esperada para cada pico isotópico:  $M+1$ ,  $M+2$ , etc. Los resultados de estos cálculos se encuentran disponibles en tablas (35).

Los tipos de iones registrados en un espectro de masas son los siguientes:

a). Ion Molecular.- Corresponde al ión de mayor masa en el espectro y se encuentra constituido por los mismos átomos de la

molécula neutra ya que proviene de ésta después de haber sido ionizada en la cámara del equipo.

b). Iones fragmento.- Resultan de procesos de descomposición del ión molecular que ocurren dentro de la cámara de ionización del espectrómetro.

c). Iones isotópicos.- Son generalmente iones minoritarios que acompañan a los iones anteriores y corresponden en masa y abundancia a la distribución natural de isótopos pesados. Su existencia y el cálculo de sus abundancias permite reconocer la composición elemental y la fórmula mínima del problema en cuestión.

d). Iones multiple-cargados.- Son iones (moleculares o fragmento) que resultan de múltiples ionizaciones en la cámara de ionización y, cuando provienen de iones de masa impar, aparecen en valores  $m/z$  fraccionarios.

e). Iones de reagrupamiento.- Son iones que resultan de rearrreglos unimoleculares que responden a reacciones de descomposición características, cuya aparición evidencia la presencia de funcionalidades específicas en las muestras analizadas.

f). Iones metaestables.- Son aquellos iones que resultan de las descomposiciones unimoleculares que ocurren fuera de la cámara de ionización y se alcanzan a detectar como señales anchas, difusas, de baja abundancia y dispuestas a valores de  $m/z$  no integrales. Su existencia evidencia procesos de reagrupamiento y/o fracturas específicas.

## 2. Colorimetría. (15)

Un método colorimétrico, consiste fundamentalmente en tratar una solución de una sustancia con un reactivo, de tal forma que produzca un color, el cual es proporcional en intensidad a la cantidad de la sustancia presente en la solución. Es deseable, pero no esencial, que la proporcionalidad sea lineal. Este método puede ser aplicado en la determinación de muchos iones metálicos, radicales y compuestos orgánicos. Después de que se ha producido el color, la solución que contiene la cantidad desconocida de la sustancia a prueba se compara con una solución estándar y el resultado se lee por medio del ojo o fotoeléctricamente.

La intensidad del color de la muestra puede ser leída por el ojo, por medio de una celda fotoeléctrica, por una termopila o por registro en un plato fotográfico. El instrumento usado para medir la intensidad del color cuantitativamente es el espectrofotómetro. Dicho instrumento se utiliza para registros colorimétricos de absorción de una determinada banda de longitudes de onda de luz.

La muestra, diluida a un volumen definido, es comparada con una serie de estándares del mismo volumen, en los cuales la cantidad de sustancia a prueba es conocida. De esta forma, la cantidad de la sustancia a prueba es conocida sin necesidad de aplicar la ley de Beer.

Existen varias condiciones para que un método colorimétrico sea ideal:

1. Es deseable que el color desarrollado de una pequeña cantidad de sustancia a prueba sea intenso, estable y no se vea afectado significativamente por cambios en el pH.
2. Es ventajoso que el desarrollo del color se lleve a cabo a

temperatura ambiente y que la variación de temperatura tenga poco efecto sobre él.

3. Si el sistema sigue la ley de Beer, las curvas de calibración pueden simplificarse.

4. Si el color se desarrolla rápidamente se evita esperar hasta que el sistema alcance el equilibrio.

5. Es deseable que el reactivo que se utilice no sea colorido.

6. Para lograr alta selectividad, el desarrollo de color deberá lograrse por reacción entre la sustancia y el reactivo evitando reacciones interferentes.

7. El color desarrollado deberá ser independiente de un exceso de reactivo.

8. La naturaleza de la reacción deberá ser perfectamente conocida a fin de permitir un mejor control en las condiciones.

9. La solubilidad de la sustancia a prueba y del reactivo deberán ser iguales de manera que se evite que el exceso de reactivo precipite o cause precipitación de otras sustancias.

10. Deberá evitarse en lo posible realizar operaciones especiales (por ejemplo extracciones, cromatografías etc.)

11. El orden de mezclado de los reactivos no deberá ser crítico.

La teoría esencial de los métodos colorimétricos de análisis consiste de leyes físicas de luz. Estas han sido la ley de Bouguer, ley de Beer y ley de Lambert.

De acuerdo a ley de Bouguer; Cada capa de composición y espesor igual absorberá una fracción igual de luz que la atraviese. De manera que la luz transmitida disminuirá exponencialmente cuando el medio que la absorbe aumente aritméticamente su espesor. La ley

de Beer expresa que la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración. La ley de Lambert establece que a concentración constante, la intensidad de color es directamente proporcional al espesor (camino óptico). Por conveniencia, la ley de Beer y la de Lambert son comunmente referidas como ley de Beer. La expresión general de la ley de Lambert y Beer es la siguiente:

$$A = abc \quad (\text{ec. 1})$$

A = Absorbancia

a = Coeficiente de absortividadad

b = espesor de la celda

c = Concentracion de la muestra.

### 3. Yodometría. (16)

El yodo es soluble en agua en la proporción de 0.001 moles por litro a la temperatura ambiente. Sin embargo, en presencia de yoduros solubles, como el de potasio, aumenta su solubilidad por la formación de complejo triyoduro:



El ion triyoduro es la especie principal que se encuentra presente en las soluciones de "yodo", tanto en las que se utilizan como reactivo valorante en métodos directos, como en las formadas por oxidación del ión yoduro en métodos indirectos.

El potencial normal del sistema



hace que sea muy utilizable en yodometría. Los oxidantes fuertes oxidan el I<sup>-</sup> a I<sub>3</sub><sup>-</sup> y los reductores fuertes reducen el I<sub>3</sub><sup>-</sup> a I<sup>-</sup>. Así, pueden distinguirse dos métodos yodométricos:

1.- Métodos directos, en que se utiliza una disolución patrón de

yodo para valorar reductores fuertes, normalmente en disolución neutra o débilmente ácida.

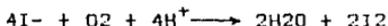
2.- Métodos indirectos, en que los oxidantes se determinan haciéndolos reaccionar con un exceso de yodo; el yodo liberado se valora en disolución débilmente ácida con un reductor patrón, como tiosulfato o arsenito sódicos; el primero de estos componentes se utiliza con mayor frecuencia:



En los métodos en los que se utiliza yodo existen dos fuentes principales de error.

a). El yodo es algo volátil, pudiendo perder la disolución parte de él. Esta fuente de error se minimiza añadiendo a la disolución un exceso de yoduro potásico, para que se forme el triyoduro complejo,  $I_3^-$ . Además, las valoraciones con yodo, sean directas o indirectas, no se efectúan nunca en caliente, ya que ello incrementaría la pérdida de yodo por volatilización.

b). El ion yoduro se oxida con el oxígeno del aire:



Esta oxidación no es perceptible en disolución neutra, pero se hace más apreciable a medida que aumenta la concentración del ión hidrógeno. La luz intensa acelera la oxidación atmosférica del ión yoduro y lo mismo actúan algunos catalizadores, tales como cobre(I), nitrato y óxidos de nitrógeno.

La semirreacción triyoduro-yoduro está muy poco influenciada por el pH. Por otra parte, los potenciales de las semireacciones que implican un cambio en el contenido de oxígeno de moléculas o iones están marcadamente influenciadas por la concentración de ión

hidrógeno; la reacción entre el ión yoduro y los oxidantes oxigenados, y también la reacción inversa, está muy influenciada por las modificaciones del pH.

Una de las ventajas de los métodos en los que interviene el yodo, es la facilidad y sensibilidad con que se detecta el punto final: en los métodos directos por aparición del primer exceso del yodo que se utiliza como reactivo valorante; en los métodos indirectos por la desaparición del yodo que se valora.

1.-Yodo como autoindicador. Una gotita de disolución de yodo 0.1 N comunica un color amarillo muy perceptible en 100-200 ml de agua. Cuando los otros componentes de la mezcla son incoloros, el yodo puede servir como su propio indicador. Sin embargo, este método de detectar el punto final no es tan sensible como los que a continuación se indican.

2.- Almidón. La beta-amilosa que es un producto de descomposición del almidón cuando éste se disuelve en agua y en caliente, da lugar a un color azul intenso con yodo en presencia de yoduro. Esto se debe probablemente a un complejo que se forma por la adsorción de yodo, beta-amilosa-yoduro.

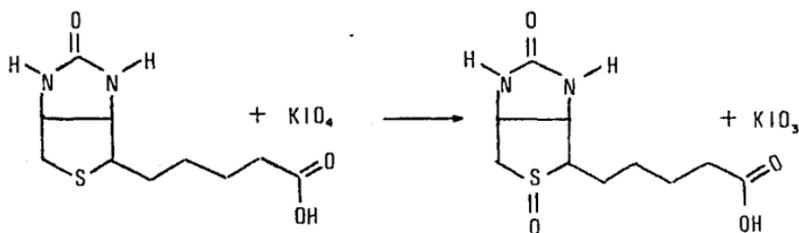
El almidón no puede utilizarse como indicador en disolución fuertemente ácida ya que su descomposición hidrolítica se ve acelerada por el ácido. La sensibilidad al yodo disminuye también por acción del alcohol y el color azul no aparece en presencia de concentraciones alcohólicas superiores al 50%. Una disolución indicadora de almidón bien preparada debe detectar el yodo en disolución 10-5N a la temperatura ambiente. El indicador no debe añadirse en los métodos indirectos hasta que se haya valorado la mayor parte del yodo; una concentración elevada con yodo da con el

almidón un complejo con propiedades indicatoras disminuidas.

3.- Color en disolventes orgánicos. El yodo se disuelve en tetracloruro de carbono, cloroformo y algunos otros disolventes orgánicos formando disoluciones rojo-violetas, que constituyen a veces ensayos más sensibles al yodo que la reacción con almidón; pueden detectarse concentraciones del orden de  $10^{-6}$  N. Una cantidad de yodo inferior al límite de visibilidad en medio acuoso puede concentrarse por extracción con un pequeño volumen de un disolvente no miscible, con lo cual se hace perceptible. Este método para detectar el yodo es especialmente útil cuando se utilizan en las valoraciones disoluciones muy diluidas, o en los casos en que las condiciones de trabajo impiden la utilización de almidón, como sucede en medios fuertemente ácidos.

En el presente trabajo se hizo uso de ésta técnica en dos métodos; uno volumétrico y otro colorimétrico en los cuales están involucradas las siguientes reacciones con biotina:

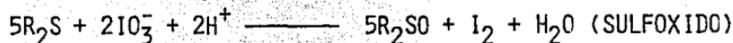
Método volumétrico (17)



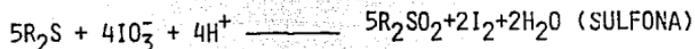
Como se puede observar en el esquema anterior, la biotina reacciona con ion peryodato oxidándose a sulfóxido y liberando ion yodato. El exceso de peryodato es enmascarado con molibdato de

amonio formando el ácido 6-molibdo-1-peryódico lo cual permite que el ión yodato liberado reaccione con el yoduro de potasio para producir el ión triyoduro(yodo). La valoración de este último, se realiza titulándolo con ión tiosulfato utilizando como indicador almidón.

Método colorimétrico (18)



ó



$R_2S = \text{BIOTINA.}$

Como se puede observar, la biotina en medio fuertemente ácido reacciona con el ión yodato para oxidarse a la sulfona correspondiente y liberar yodo el cual es extraído con ciclohexano y es cuantificado utilizando un fotocolorímetro a una longitud de onda de 520nm.

#### 4. Cromatografía.(19)(20)(21)

La cromatografía es un proceso para la separación de mezclas moleculares por distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases, en todos los tipos de cromatografía una fase permanece inmóvil y otra se mueve de una manera continua y la separación cromatográfica depende de que durante el paso del sistema se multipliquen muchas veces las pequeñas diferencias del coeficiente de reparto o en la adsorción y desorción de cada uno de los componentes de la mezcla. Cuanto mayor sea este factor de

multiplicación mayor es la facilidad con que se separan los componentes y mejor es el poder de resolución.

Se considera que un sistema cromatográfico está formado por una serie de platos teóricos, donde un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. La principal ventaja de la cromatografía es que se puede conseguir una alta eficacia debido al gran número de platos teóricos. El equilibrio establecido en cromatografía es muy rápido y ello permite llevar a cabo buenas separaciones en un tiempo corto.

#### a). Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina es una forma de cromatografía de adsorción en la que el adsorbente se difunde en una capa fina sobre una placa de vidrio. Las muestras se aplican sobre la placa en forma de solución con una micropipeta en una zona reducida próxima al extremo de la placa. Entonces la placa es colocada en una cámara, que contiene la fase móvil (revelador). Completado el revelado del cromatograma (por lo general, cuando el frente del solvente ha recorrido la mayor parte de la longitud de la placa), se marca con un lápiz el frente del solvente y se seca la placa.

Puesto que la mayoría de los compuestos son incoloros, es necesario localizar las manchas utilizando una prueba física o química. Se puede utilizar luz ultravioleta para detectar fluorescencia del soporte o de las muestras o bien, utilizar reactivos específicos que desarrollen color con la sustancia a determinar.

Visualizada la zona, se calculan los valores de  $R_f$  para cada sustancia. El valor de  $R_f$  se determina como el cociente de la

distancia recorrida por la substancia entre la distancia recorrida por el disolvente. Este valor deberá ser característico de cada compuesto. Por desgracia, se encuentra que los valores de  $R_f$  dependen de otras variables como la temperatura, tamaño de la muestra, tipo de revelado, espesor de la capa adsorbente, etc. Por consiguiente, para incrementar la seguridad de los valores de  $R_f$  como un criterio de identidad hay que correr un cromatograma con un estándar al lado de la muestra problema, quedando de esta manera sometidos a las mismas condiciones.

b). Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Una variante de las técnicas cromatográficas a presión atmosférica la constituye la cromatografía de líquidos de alta presión. En esta técnica, la fase móvil es forzada a pasar a alta presión (1000 a 3000 lbs/in) a través de un adsorbente sólido empaquetado en una columna de acero inoxidable. La muestra a analizar es inyectada en solución, generalmente utilizando la misma fase móvil como disolvente, a través de una válvula inyectora dispuesta en la parte anterior de la columna.

Los componentes eluidos de la columna pueden detectarse utilizando diferentes dispositivos como: detector de índice de refracción, detector ultravioleta, detectores electroquímicos, detectores de fluorescencia, acoplamiento a espectrómetros de masas, etc. El cromatograma obtenido presentará cada componente eluido como un pico cuya área y altura serán proporcionales a la concentración y su posición con respecto al punto de la inyección (tiempo de retención) será característico para cada componente.

## 5. Polarografía. (22)(23)(24)(25)

La polarografía se puede emplear como método electroquímico en fisicoquímica, en análisis químico cualitativo y cuantitativo, en química orgánica y en química biológica.

Esta técnica mide e interpreta la variación de voltaje que ocurre durante la electrolisis de una solución por medio de dos electrodos, por lo que se considera como una volt-amperometría.

Es posible obtener una curva reproducible de intensidad en función del voltaje, si se aumenta gradualmente el voltaje aplicado a una celda electrolítica, formada por un ánodo de mercurio relativamente grande y un cátodo pequeño de mercurio (electrodo gotero de mercurio del que caen lentamente gotas pequeñas de mercurio desde un tubo capilar fino). El electrolito es una solución diluida de la muestra en análisis (que debe ser electroactiva) en un medio apropiado, con un exceso de un electrolito indiferente (electrolito soporte) para transportar la mayor cantidad de corriente y elevar la conductividad de la solución, asegurando de esta manera, que lo que se determina, si posee carga eléctrica, no migre hacia el cátodo de mercurio.

El electrodo gotero de mercurio actúa como cátodo; es el electrodo indicador o microelectrodo polarizable. El ánodo es un depósito de mercurio con la superficie libre relativamente grande, de modo que es el electrodo no polarizable, que actúa como electrodo de referencia y cuyo potencial permanece casi constante en un medio que contiene aniones capaces de formar sales escasamente solubles en mercurio. La polarización de la celda, está regida por las reacciones que se producen en el cátodo, microelectrodo gotero de mercurio. Con el potenciómetro se aplica

gradualmente a la celda cualquier f.e.m. En estas condiciones, la curva de intensidad en función del voltaje aplicado, es la curva intensidad en función del potencial catódico, desplazada en un voltaje constante que corresponde al potencial del ánodo. Para ciertos fines conviene un ánodo externo de potencial conocido (por ejemplo, un electrodo de calomel saturado). El potencial inicial del cátodo, electrodo gotero de mercurio, es indeterminado y toma cualquier potencial que se le aplique desde una fuente externa, cuando adquiere un potencial impuesto, con una variación muy pequeña o nula de la intensidad de corriente, el electrodo indicador está polarizado.

Si se aplica una f.e.m. externa a la celda, cargada con una solución de electrolito soporte, libre de oxígeno, los cationes presentes en la solución son atraídos al cátodo, electrodo indicador, por a) una fuerza eléctrica debida al gradiente de potencial y por b) la difusión que se debe al gradiente de concentración producido en la superficie del electrodo. La intensidad total de la corriente que pasa por la celda es debida a la suma de estas dos causas. La curva típica de intensidad potencial es la siguiente:

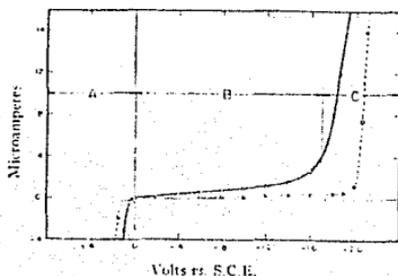


Fig. 9.13. Residual currents for the rotating mercury electrode (solid curve) and the dropping mercury electrode (dashed curve) for 0.02 molar potassium chloride.

El electrodo indicador, siendo perfectamente polarizable, toma correlativamente el potencial negativo, en aumento, que se le aplica; desde A a B no pasa prácticamente corriente por la celda. Cuando existe una especie electroactiva en la solución, se observará que a un valor dado de potencial aplicado, la intensidad de corriente se incrementará hasta alcanzar un régimen de difusión estable (corriente límite de difusión) cuya amplitud será proporcional a la concentración de la especie electroactiva.

El valor del potencial correspondiente a la mitad del valor de la corriente límite de difusión se conoce como potencial de media onda y es una característica cualitativa de la especie presente.

El tratamiento teórico de esta metodología se basa en la ecuación de Ilkovic que establece que el régimen de difusión de especies electroactivas al electrodo indicador dependerá de:

$$I_d = K n F C D m t$$

$I_d$  = Corriente de difusión observada a un cierto tiempo

$n$  = El número de electrones intercambiados.

$F$  = Faradio (96,500 coulombios)

$C$  = Concentración de la especie electroactiva

$D$  = Coeficiente de difusión de la especie

$m$  = Peso de mercurio que escurre por el capilar por segundo

$t$  = Tiempo necesario para formar una gota de mercurio (en segs)

$K$  = Constante de proporcionalidad

### Capítulo III

#### Desarrollo experimental.

Este se encuentra dividido en tres fases, de las cuales, la primera está basada en el análisis cualitativo, la segunda en la cuantificación de biotina pura y validación de los métodos aplicables a premezclas, y la tercera en el análisis de biotina en las premezclas.

#### I. Análisis cualitativo de biotina.

a). Obtención de la espectroscopía de biotina: infrarrojo, resonancia magnético protónica y espectrometría de masas.

Espectroscopía de infrarrojo. El espectro de infrarrojo fue obtenido en un equipo modelo Perkin-Elmer FT, la vitamina se introdujo en forma de pastilla la cual fue elaborada con bromuro de potasio en una proporción de una parte de biotina por cinco de bromuro de potasio.

Espectrometría de resonancia magnético protónica. El espectro de resonancia se obtuvo en un equipo Varian EM-390 utilizando dimetilsulfoxido -d<sub>6</sub> y tetrametil silano como referencia interna.

Espectrometría de masas. El espectro de masas fue obtenido en un equipo Hitachi modelo RMU-7H, utilizando introducción directa, 70eV como potencial de ionización y 250 grados centígrados en la cámara de ionización.

b). Cromatografía en placa fina. Fueron utilizados cromatofolios de sílica gel 60, revelando las placas con mezclas de agua, metanol y acetato de etilo y visualizando con yodo obteniendo diversos valores de R<sub>f</sub> para cada revelador utilizado.

## II. Cuantificación de biotina

### a). Titulación yodométrica.

#### Reactivos utilizados:

Solución acuosa de yoduro de potasio al 3%

Solución acuosa de peryodato de potasio al 0.6%

Solución acuosa de molibdato de amonio al 5%

Solución buffer de acetatos

Solución valorada de tiosulfato de sodio 0.002 N

Solución indicadora de almidón de preparación reciente

#### Material utilizado:

Vasos de precipitados de 100 ml.

Bureta de 25 ml.

Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml.

Pipetas graduadas de 5 ml.

Agitador magnético

Barra magnética.

Soporte para bureta.

#### Metodología:

Se tomaron de 1 a 10 ml de solución de biotina que contenga entre 90 y 950 microgramos, se diluyó con agua hasta 15 ml, adicionando 5 ml de solución de peryodato de potasio, agitando la solución y dejando reposar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 5 ml de solución de molibdato de amonio y 5 ml de solución buffer con agitación constante. Finalmente se adicionaron 5 ml de solución de yoduro de potasio. El yodo liberado se tituló con la solución valorada de tiosulfato de sodio hasta el vire con almidón.

#### Cálculos:

$$ZR = \frac{(m1 - m2)(N)(meq\ b)(V_a)}{(V_x)(w_m)(100)}$$

m1 = ml gastados de tiosulfato de sodio para la muestra.

m2 = ml gastados de tiosulfato de sodio para el blanco.

N = normalidad de la solución de tiosulfato de sodio

meq b = miliequivalentes de biotina.

V<sub>a</sub> = volumen de aforo.

V<sub>x</sub> = volumen de alícuota.

w<sub>m</sub> = peso de la muestra.

#### b). Determinación colorimétrica

##### Reactivos:

Solución acuosa de yodato de potasio al 1%.

Solución de ácido sulfúrico al 30%.

Ciclohexano grado espectroscópico.

##### Material:

Pipetas graduadas de 5 y 20 ml.

Tubos de ensaye de 20x2 cm.

Tapones de hule de 2 cm de diámetro.

Una gradilla.

Un baño de agua a 60 grados centigrados.

Agitador vortex para tubos de ensaye.

Matraces volumétricos de 10 y 100ml.

##### Metodología:

Se preparó una curva de calibración pesando con exactitud 25mg de biotina pura y aforando a 100ml, se tomaron alícuotas de 1 a 10ml (de 1 en 1) de ésta solución y se colocaron en los tubos de ensaye adicionando 2 ml de la solución de yodato de potasio, 3 ml

de la solución de ácido sulfúrico y agua hasta un volumen final de 15 ml. Posteriormente se adicionaron 20 ml de ciclohexano. Los tubos se colocaron en la gradilla y se introdujeron al baño de agua cuidando que el nivel del agua cubra perfectamente la fase acuosa. Los tubos se taparon de tal manera que se permitiera la salida de presión. Pasados 40 minutos se retiraron los tubos del baño y se dejaron enfriar, se agitaron en el equipo vortex y la fase orgánica se decantó en un matraz volumétrico de 100 ml, a la fase acuosa se le hicieron repetidas extracciones hasta desaparición del color amarillo, finalmente se adicionó ciclohexano hasta la marca de aforo.

La solución anterior sirvió para determinar la longitud de onda máxima de absorción, valor al cual se leyó la absorbancia relativa para cada punto de la curva de calibración. Una gráfica de estos valores de absorbancia contra concentración producirá una línea recta en caso de cumplirse la ley de Lambert-Beer.

En todas las determinaciones anteriores se deberá realizar un análisis paralelo con un blanco.

La cantidad de biotina es calculada de la siguiente manera:

$$\text{Biotina mg} = (A_m)(C_s)/(A_s)(W_m)$$

$A_m$  = Absorbancia de la muestra.

$C_s$  = Concentración del estándar en mg.

$A_s$  = Absorbancia del estándar.

$W_m$  = Peso de la muestra en gr.

### c). Cromatografía de líquidos de alta resolución

#### Reactivos:

Metanol grado HPLC.

Agua grado HPLC.

#### Material:

Probetas graduadas de 500 ml.

Matraces Erlenmeyer de 1000 ml.

Matraces volumétricos de 10 ml.

Inyector automático de muestras tipo Reodine (Loop de 50ul).

Equipo de microfiltración (0.45  $\mu$ ) marca millipore.

Equipo de ultrasonido marca Bransonic.

Una columna de ODS-C18 de 20 cm por 10 mm.

Cromatógrafo de líquidos marca Waters.

Detector de longitud de onda variable marca Perkin-Elmer modelo LC-75.

#### Metodología:

Para la determinación de longitud de onda máxima de absorción de biotina pura en metanol. Se preparó una solución de biotina pura en metanol y se corrió su espectro de absorción en la región de absorción de ultravioleta utilizando un espectrómetro marca Perkin-Elmer modelo 552 en celdas de 1cm de longitud y se determinó el máximo de absorción.

Una vez determinado el valor de longitud de onda máxima de absorción de biotina pura, se procedió a determinar el intervalo de concentraciones en el cual se sigue la ley de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción molar. Para realizar lo anterior se pesaron con exactitud 7mg de biotina pura y se aforó a 100ml con

metanol, de esta solución se tomaron alícuotas desde 1 hasta 10ml (de 1 en 1) y aforó cada una a 10ml. Determinando la absorbancia de cada dilución.

Las determinaciones cromatográficas se realizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos equipado con una columna de fase reversa C-18, metanol-agua en diferentes proporciones como fase móvil y se variaron los flujos de 0.5 a 2.5ml/min. Después de inyectar en las diferentes condiciones anteriores una cierta cantidad de biotina pura se determinó que las condiciones óptimas de resolución y tiempo de elución se lograron con una proporción de fase móvil de metanol-agua 50:50 y un flujo de 1.5 ml/min.

Para determinar la linealidad de la respuesta del detector, se procedió a inyectar, bajo las condiciones optimizadas, diferentes concentraciones conocidas de biotina pura (entre 50 y 400ug/ml) y a correlacionar este dato con el respectivo al área y altura del pico correspondiente.

#### d). Polarografía

Reactivos:

Mercurio grado polarográfico.

Solución 0.1M de cloruro de potasio.

Solución estandar de biotina.

Nitrógeno gas.

Material:

Polarografo RADIOMETER-COPENHAGEN tipo P04 No. 115858

Electrodo capilar de mercurio.

Electrodo de referencia (calomel saturado).

Celdas polarográficas de 25ml.

Matraces volumétricos de 25 y 100ml.

Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, y 10 ml.

#### Metodología:

Para determinar si la biotina pura es electroactiva en las condiciones de análisis típico de cationes, se procedió a trazar la curva polarográfica correspondiente el electrolito soporte. Posteriormente se adicionó una cierta cantidad de biotina pura y se trazó el polarograma observando una onda de reducción perfectamente distinguible del muro de reducción del agua, con lo que se confirmó la electroactividad de la biotina en el medio.

Se determinaron las variaciones de la corriente límite de difusión en función de la concentración de biotina partiendo de una solución de 53ug/ml de biotina en electrolito soporte, tomando de esta solución 5, 10, 15, 20 y 25ml y aforando cada una de ellas a 25ml con solución de electrolito soporte. Cada una de estas soluciones se sometió al análisis polarográfico descrito.

### III. Análisis de biotina en premezclas estimulantes

#### a).- Obtención de la espectroscopía.

Espectros de infrarrojo. Los espectros de infrarrojo de muestras de premezclas, fueron obtenidos en la misma forma en que se obtuvo el espectro de infrarrojo para biotina pura.

#### b).-Cromatografía en placa fina.

Para determinar la presencia de biotina en las premezclas, se corrió una cromatografía en placa fina con el sistema de elución indicado como óptimo en el análisis cualitativo de biotina pura.

c).- Titulación Yodométrica.

Para llevar a cabo esta determinación se pesó con exactitud una cantidad de premezcla que contuviera entre 300 y 600ug de biotina, se colocaron en un vaso de precipitado de 100ml y se adicionaron 70ml de agua, se agitó hasta asegurar la completa disolución de biotina, pasando la solución a un matraz aforado de 100ml lavando cuidadosamente el vaso, en caso necesario se filtró recibiendo el filtrado en el matraz aforado y lavando el sólido, hasta llevar a volumen y procediendo como se indicó en la técnica antes descrita.

d).- Colorimetría.

Se pesó con exactitud una cantidad de premezcla que contuviera entre 6 y 10mg de biotina y se procedió como en la técnica descrita en el método colorimétrico para biotina pura.

e).-Cromatografía de líquidos

Se pesó una cantidad de premezcla que contuviera entre 5 y 7.5mg de biotina, se colocó en un matraz volumétrico de 25ml y se aforó con el sistema de solventes de la fase móvil. Se procedió a inyectar de acuerdo a las condiciones óptimas encontradas para biotina pura.

f).- Polarografía

Partiendo de la solución preparada para la determinación polarográfica de biotina pura se procedió a determinar la influencia del soporte (dextrina) tomando alícuotas de 5 a 25ml de esta solución y aforando a 25ml, adicionando a cada alícuota 300mg de premezcla (cuyo soporte es dextrina) y se procedió a determinar

la corriente límite de difusión para cada una de las alícuotas.

IV. Validación de los métodos químicos aplicables a las premezclas.

Se determinaron los siguientes parámetros estadísticos:

- a). Linealidad.
- b). Exactitud.
- c). Precisión.
- d). Cantidad mínima detectable.

## CAPITULO IV

### Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental presentandose espectroscopía, tablas y figuras.

FIGURA No. 1  
ESPECTRO DE I.R.I. DE BIOTINA

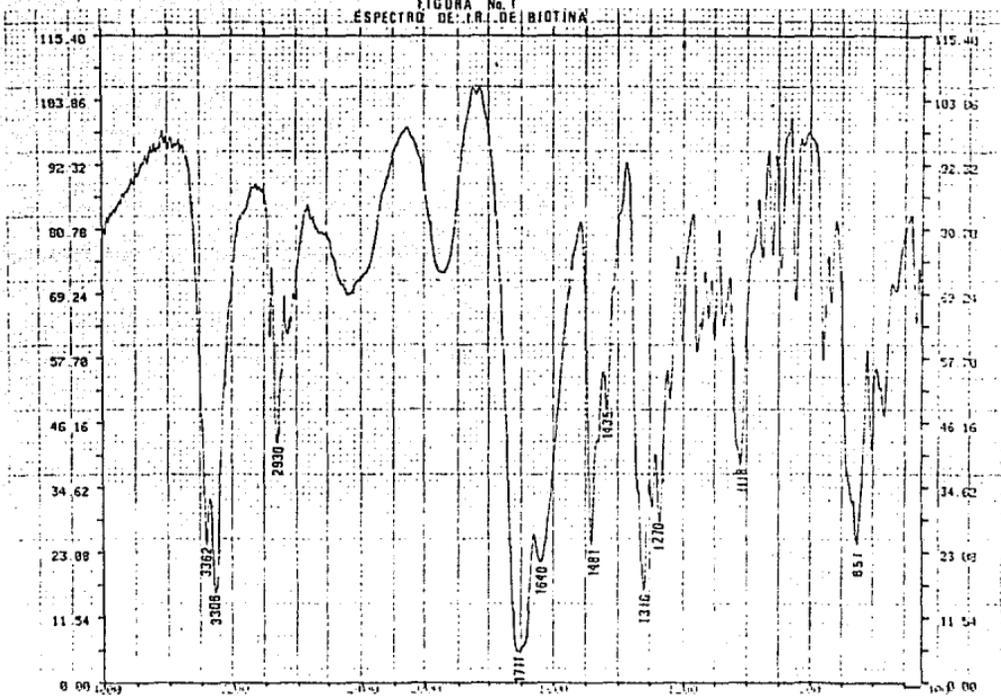




FIGURA No. 3  
ESPECTRO DE R. M. N. DE BIOTINA

ESTRUCTURA DE BIOTINA

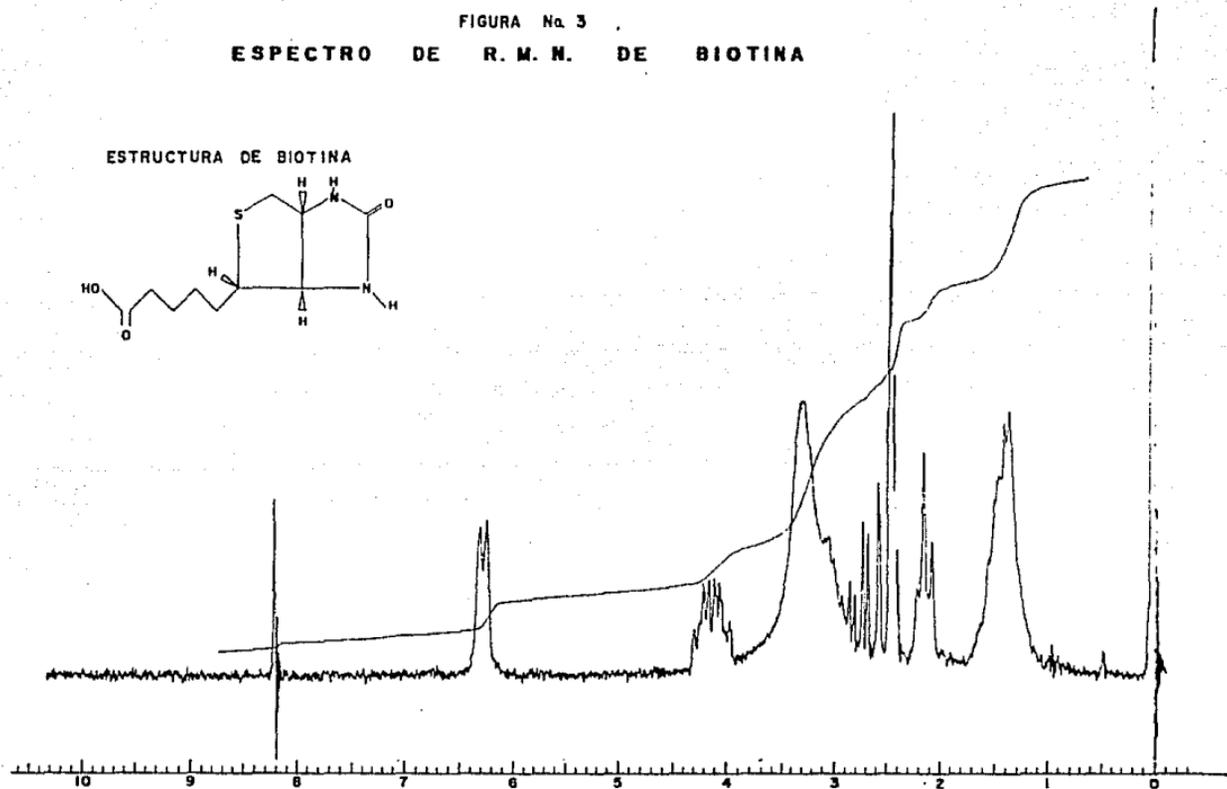
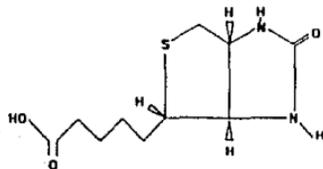
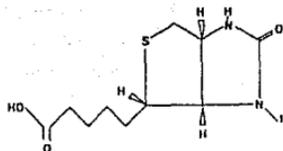
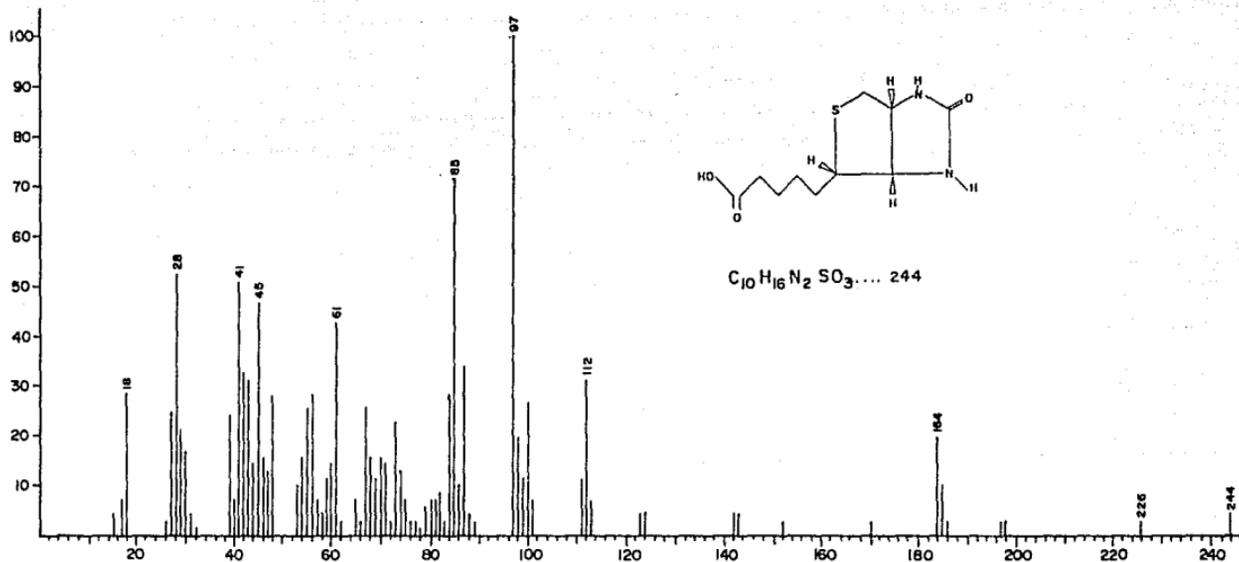


FIGURA No. 4  
ESPECTRO DE MASAS DE BIOTINA



$C_{10}H_{16}N_2SO_3 \dots 244$

TABLA NO. 1

Valores de absorción de biotina en metanol a diferentes longitudes de onda del espectro de ultravioleta.

Longitud de onda	Absorbancia
230	0.023
225	0.051
220	0.123
216	0.240
214	0.322
212	0.416
210	0.530
208	0.664
206	0.812
204	0.967
202	1.160
200	1.340
198	1.530
196	1.640
194	1.700
193	1.740
192	1.600
190	1.460

FIGURA No. 5  
ESPECTRO DE ABSORCION DE BIOTINA

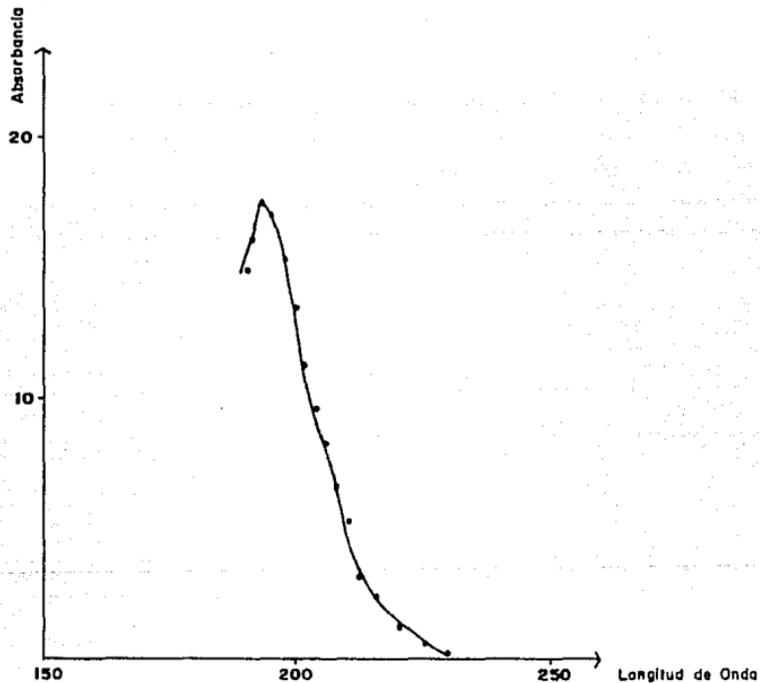


TABLA No. 2

Curva de concentración de biotina en metanol vs absorbancia a una longitud de onda de 193nm.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia
0.0072	0.200
0.0145	0.362
0.0217	0.605
0.0290	0.726
0.0362	0.936
0.0436	1.102
0.0507	1.265
0.0580	1.409
0.0652	1.530
0.0725	1.692

FIGURA No. 6

CURVA DE CONCENTRACION DE BIOTINA VS ABSORBANCIA

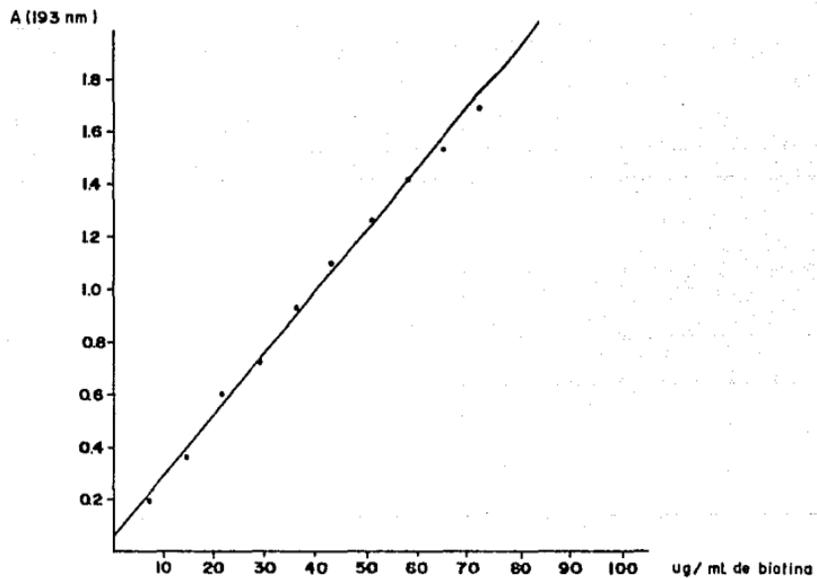


FIGURA No. 7

CROMATOGRAMA PARA BIOTINA PURA

CONCENTRACION: 250 Ug / ml.

FLUJO: 1.5 ml / min.

$\lambda = 205 \text{ nm.}$

VELOCIDAD DE LA CARTA: 30mm / min.

PRESION: 2 lb / psi<sup>2</sup>

FASE MOVIL: MET. H<sub>2</sub>O (50:50)

COLUMNA: FASE REVERSA C-18

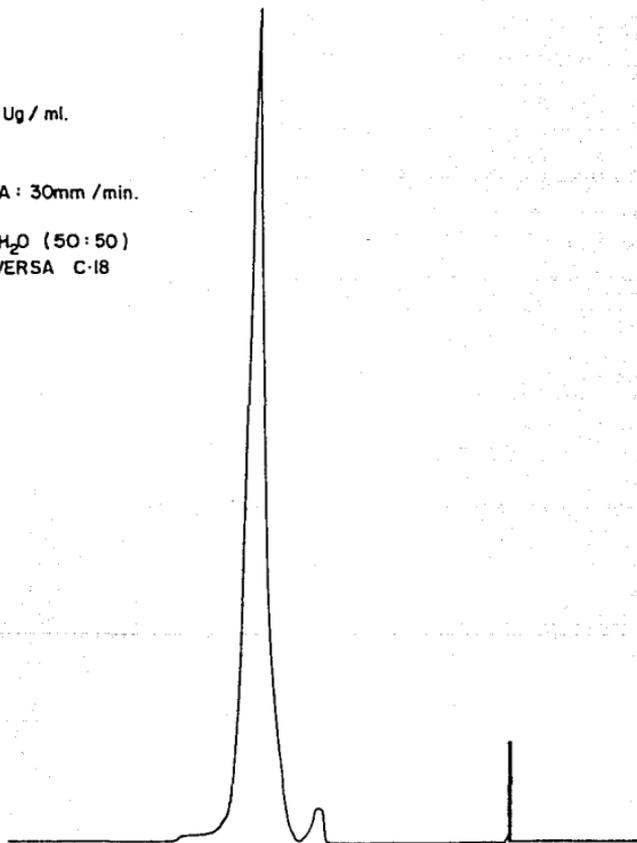


TABLA No. 3

Curva de concentración de biotina vs area del pico y altura del pico.

Concentración (mg/ml)	Area (cm <sup>2</sup> )	Altura (cm)
0.076	1.683	3.36
0.114	2.573	4.80
0.152	3.328	5.80
0.190	4.465	7.76
0.228	5.431	9.45
0.266	6.116	10.48
0.304	7.163	12.28
0.342	8.196	15.15
0.380	9.198	16.23

FIGURA No. 8

CONCENTRACION DE BIOTINA VS AREA Y ALTURA

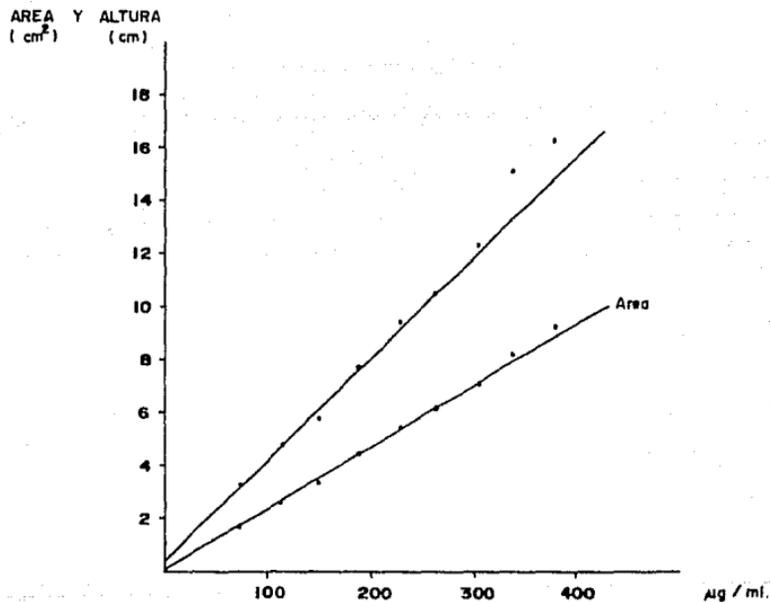


FIGURA No. 9

CROMATOGRAMA PARA MUESTRA DE PREMEZCLA  
EN DEXTRINA

CONCENTRACION: 250 Ug/ml.  
FLUJO: 1.5 ml/min.  
 $\lambda = 205 \text{ nm}$   
VELOCIDAD DE LA CARTA: 30mm/min.  
PRESION: 2 lb / psi<sup>2</sup>  
FASE MOVIL: MET. H<sub>2</sub>O (50:50)  
COLUMNA: FASE REVERSA C-18

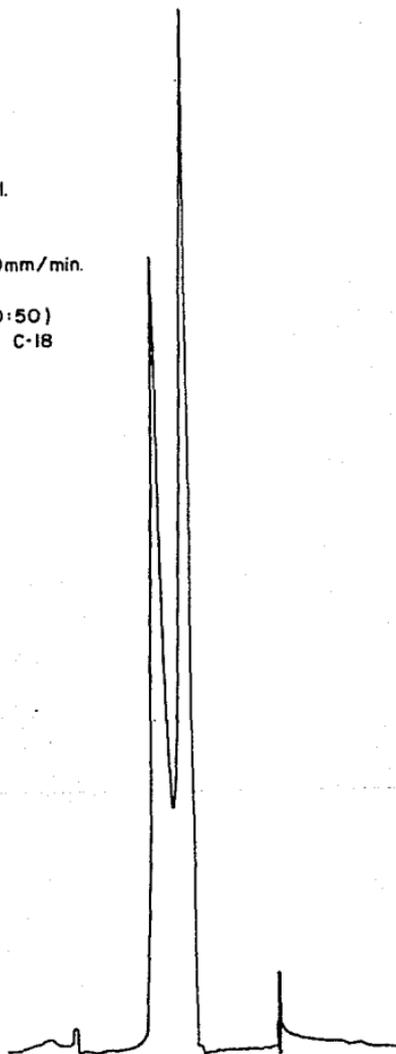


TABLA No. 4

Valores de absorción del ión triyoduro en ciclohexano a diferentes longitudes de onda del espectro visible.

Longitud de onda	Absorbancia	Absorbancia
	Celda de 1cm.	Celda de 5cm.
700	0.024	0.049
680	0.023	0.052
660	0.022	0.053
640	0.021	0.058
620	0.024	0.074
600	0.034	0.125
580	0.053	0.233
560	0.085	0.400
540	0.116	0.567
525	0.126	0.600
520	0.125	0.626
500	0.101	0.516
480	0.058	0.313
460	0.020	0.143
440	-0.001	0.053
420	-0.013	0.017
400	-0.022	0.010

FIGURA No. 10

ESPECTRO DE ABSORCION DEL ION TRIYODURO EN CICLOHEXANO  
(Celdas de 5 cm)

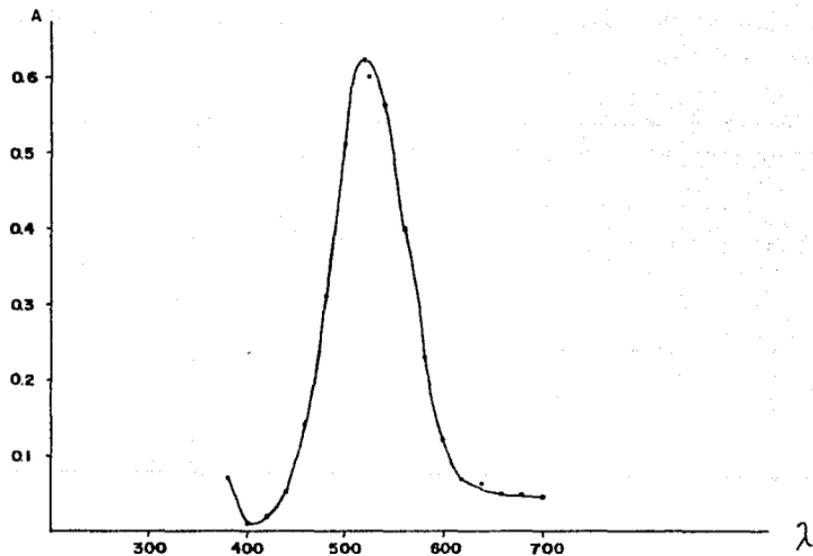


TABLA No. 5

Concentración del ión triyoduro extraído en ciclohexano (después de reaccionar la biotina con yodato) vs absorbancia, en celdas de 5cm y a una longitud de onda de 520nm.

Concentracion (g/ml)	Absorbancia
2.710×10 <sup>-5</sup>	0.111
4.520×10 <sup>-5</sup>	0.199
6.328×10 <sup>-5</sup>	0.269
9.040×10 <sup>-5</sup>	0.380
10.840×10 <sup>-5</sup>	0.454
13.560×10 <sup>-5</sup>	0.573
18.080×10 <sup>-5</sup>	0.759
22.600×10 <sup>-5</sup>	0.954

FIGURA No. 11

CONCENTRACION DE ION TRIYODURO VS ABSORBANCIA

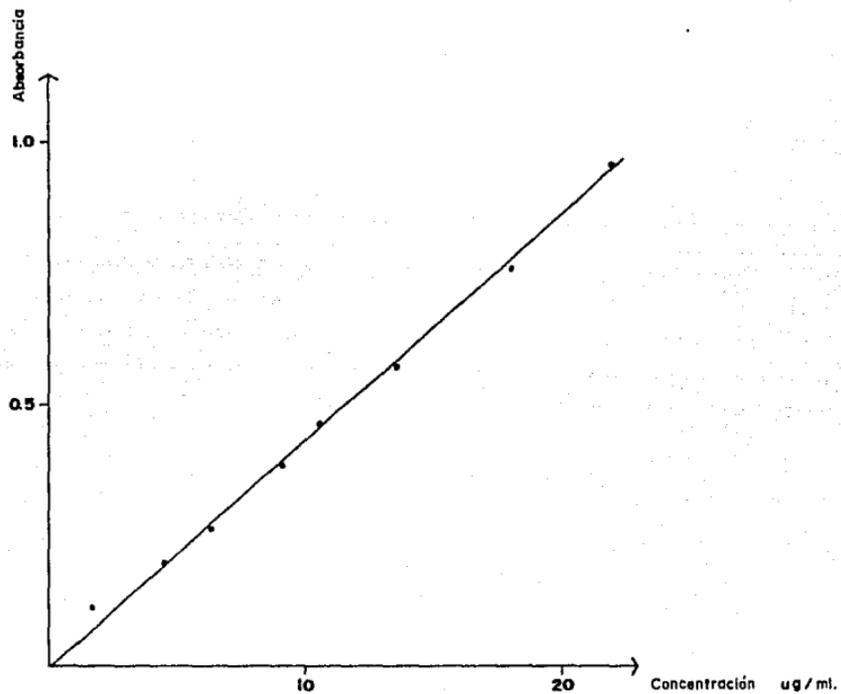


TABLA No. 6

Resultados para la validación del método yodométrico en biotina pura.

ug Adicionados	ug Encontrados	% Recuperado
50.05	57.71	115.30
50.05	50.49	100.87
50.05	54.10	108.09
100.10	104.60	104.49
100.10	108.20	108.09
100.10	104.60	104.49
150.15	158.70	105.69
150.15	158.70	105.69
150.15	158.70	105.69
200.20	212.80	106.29
200.20	205.59	102.69
200.20	209.20	104.49
250.25	249.87	99.84
250.25	241.66	96.56
250.25	234.44	93.68
350.35	349.86	99.86
350.35	345.80	101.55
350.35	342.65	97.80
300.30	306.58	102.09
300.30	299.37	99.90
300.30	299.37	99.90
400.40	400.36	99.99
400.40	378.72	94.58

400.40	385.93	96.38
450.45	443.64	98.58
450.45	461.68	102.59
450.45	429.22	95.38
500.50	490.53	98.00
500.50	486.93	97.28
500.50	490.53	98.05
550.55	551.85	100.23
550.55	544.64	98.92
550.55	544.64	98.92
632.50	625.10	98.93
632.50	636.39	100.61
632.50	613.80	97.04
690.00	696.64	100.96
690.00	692.88	100.41
690.00	689.11	99.87
747.50	734.30	98.23
747.50	726.77	97.22
747.50	734.06	98.20
805.00	817.15	101.50
805.00	813.38	101.04
805.00	813.38	101.04
862.50	866.10	100.41
862.50	892.46	103.47
862.50	866.10	100.41
862.50	866.10	100.41
920.41	941.41	102.28

920.41	941.41	102.28
920.41	922.59	100.23
977.50	982.84	100.54
977.50	975.30	99.77
977.50	960.24	98.23
1035.00	1065.60	102.95
1035.00	1061.90	102.50
1035.00	1061.90	102.59
1092.00	1110.87	101.72
1092.00	1080.74	98.96
1092.00	1084.51	99.31

#### Resultados estadísticos

$r = 0.9992$  (coeficiente de regresión lineal)

$b = 1.007$  (pendiente)

$a = -2.687$  (ordenada al origen)

$n = 61$  (número de datos)

$X = 553.29$

$Y = 554.58$

$S'X = 319.24$

$S'Y = 321.78$

$S'XY = 102,648.47$

$SXX = 379,222,654.8$

$SYY = 385,281,152.8$

$SXY = 381,954,956.9$

$Se = 12.63$

Exactitud del método:

$y = bx + a$

a) Errores de tipo constante:

Hipótesis para la ordenada al origen  $H_0: a = 0$

$H_1: a \neq 0$

$$t_{cal} = \frac{a - 0}{Se} \sqrt{n SXX}$$
$$SXX = \sum (X_i - \bar{X})^2$$

$t_{cal} = 0.83$ , con  $(n - 2)$  grados de libertad y coeficiente alfa de 0.005 el valor t de tablas resultó 2.576.

b) Errores de tipo proporcional:

Hipótesis para la pendiente:  $H_0: b = 1$

$H_1: b \neq 1$

$$t_{cal} = \frac{b - 1}{Se} \sqrt{SXX}$$
$$SXX = \sum (X_i - \bar{X})^2$$

$$t_{cal} = 1.38$$

Determinación de precisión:

$Y_{cal} = Y \pm Se$ ;  $Se = 12.63$  lo que corresponde al 2.27% de Y

Cantidad mínima detectable:

$$C_{md} = Z \cdot ord.$$

$$ord = Se \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{SXX}}$$

$ord = 3.236$ , con un riesgo alfa del 0.05 (5%) y  $Z = 1.65$

$$C_{md} = 5.34 \text{ ug}$$

TABLA No. 7

Resultados de linealidad del método yodométrico.

ug adicionados	ug encontrados
50.05	53,37
100.10	105.32
150.15	157.25
200.20	209.19
250.25	242.48
300.30	302.97
350.35	346.72
400.40	390.26
450.45	434.26
500.50	486.92
550.55	543.91
632.50	621.33
690.00	696.64
747.50	736.85
805.00	811.12
862.50	872.87
920.41	937.64
977.50	976.81
1035.00	1049.06
1092.00	1091.29

TABLA No. B

Resultados para la validación del método colorimétrico en biotina pura.

ug Adicionados	ug Encontrados	% Recuperado
27.12	26.93	99.41
45.20	47.48	105.04
63.12	63.83	101.12
90.40	89.76	99.29
108.40	107.00	98.70
135.60	134.80	99.41
180.80	180.80	100.00
220.60	220.61	100.00
24.40	27.26	111.72
40.80	43.14	105.73
57.10	52.96	92.74
81.60	82.21	100.74
97.90	97.88	99.97
122.40	119.81	97.88
166.20	161.59	99.01
204.00	198.99	97.54
28.08	30.11	107.22
46.80	47.63	101.77
65.50	65.50	100.00
93.60	93.58	99.97
112.30	110.60	98.48

140.00	136.63	97.59
180.70	182.41	100.94
234.00	233.97	99.98
39.00	40.00	102.56
78.00	77.33	99.14
117.00	116.33	99.42
156.00	156.00	100.00
195.00	196.00	100.51
42.48	45.55	106.42
85.60	83.22	97.21
128.40	126.68	98.66
171.20	171.30	100.05
214.40	215.70	100.60
41.60	42.51	102.18
83.20	87.93	105.68
124.80	117.38	94.05
166.40	163.40	98.19
208.00	212.90	102.35

#### Resultados Estadísticos

$r = 1.00$  (coeficiente de regresión lineal)

$a = 0.68$  (ordenada al origen)

$b = 0.99$  (pendiente)

$n = 39$  (número de datos)

$$X = 113.21$$

$$Y = 113.00$$

$$S'X = 61.40$$

$$S'y = 60.98$$

$$S'XY = 3741.23$$

$$SXX = 5,734,102.2$$

$$SYY = 5,655,930.4$$

$$SXY = 5,690,410.8$$

$$Se = 2.48$$

Exactitud del método:

$$y = b x + a$$

a) Errores de tipo constante:

Hipótesis para la ordenada al origen:  $H_0: a = 0$

$$H_0: a = 0$$

$$t_{cal} = \frac{a - 0}{Se} \sqrt{\frac{n \cdot SXX}{SXX + (nX)}}$$

$t_{cal} = 0.81$  con  $(n - 2)$  grados de libertad y coeficiente alfa de 0.005 el valor t de tablas resultó 2.576.

b) Errores de tipo proporcional:

Hipótesis para la pendiente:  $H_0: b = 1$

$$H_0: b = 1$$

$$t_{cal} = \frac{b - 1}{Se} \sqrt{\frac{SXX}{n}}$$

$$t_{cal} = -1.54$$

Determinación de precisión:

$Y_{cal} = Y \pm Se$ ;  $Se = 2.48$  que corresponde a 2.19% de  $Y$

Cantidad mínima detectable:

$Cmd = Z \text{ ord}$ ,

$$\text{ord} = \frac{1}{n} + \frac{n(X)}{SXX}$$

$\text{ord} = 0.183$ , con un riesgo alfa de 0.005 (5%) y  $Z = 1.65$

$cmd = 1.37 \text{ ug}$ .

FIGURA No. 12  
 LINEALIDAD DEL METODO  
 COLORIMETRICO

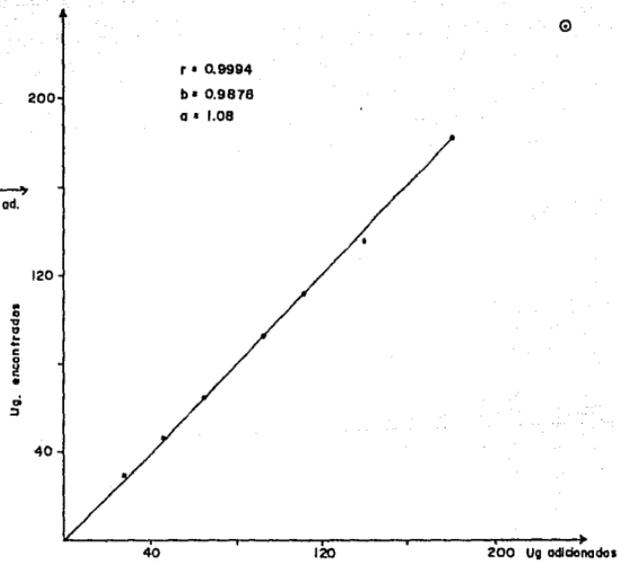
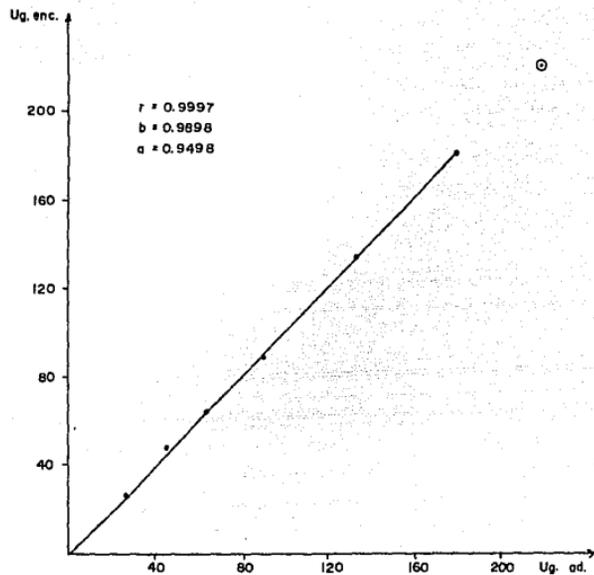


TABLA No. 9

Resultados de determinación yodométrica de biotina en muestras de premezclas cuyo soporte es almidón.

No. de muestra	Determinación 1 (%)	Determinación 2 (%)
84-11-1458	0.93	0.95
85-04-718	0.77	0.74
85-01-2382	1.19	1.17
85-03-870	1.06	1.05
85-05-579	1.69	1.68
85-06-674	1.60	1.64
85-03-87	1.05	
85-09-783	2.78	2.81
85-11-48	2.90	3.10
85-12-327	1.96	

TABLA No. 10

Resultados de la determinación colorimétrica de biotina en muestras de premezclas con diferentes soportes.

Muestras cuyo soporte es harina de trigo

No. de Muestra	Determinación 1 (%)	Determinación 2 (%)
84-10-23	1.70	1.87
84-04-219	1.84	1.76
84-05-1237	1.34	1.65

Muestras cuyo soporte es harina de soya, almidón y carbonatos

84-12-323	0.85	0.98
85-01-2161	1.90	1.81
85-01-319	1.30	1.30

Muestras cuyo soporte es almidón

84-11-1458	1.36	1.60
85-03-87	0.96	0.86
85-03-718	1.33	1.22
85-05-579	3.16	1.86
85-05-606	0.84	0.38
85-06-674	0.89	0.99
86-03-752	1.26	1.08
84-11-48	1.19	0.74

Muestras cuyo soporte es dextrina

84-12-244	2.71	2.77
85-03-577	1.89	1.74
85-04-1436	3.12	2.88

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

85-02-1750	2.65	2.70
85-04-750	2.29	2.20
85-04-312	1.93	1.72
84-04-1436	2.00	2.07
85-06-1103	1.75	1.98
85-06-1263	3.37	3.22
86-08-28	1.84	
86-08-290	1.97	
86-08-184	1.84	
86-08-04	1.56	1.40
86-08-1413	2.20	1.96
86-05-999	3.2	

FIGURA No. 13  
LINEALIDAD DEL METODO YODOMETRICO

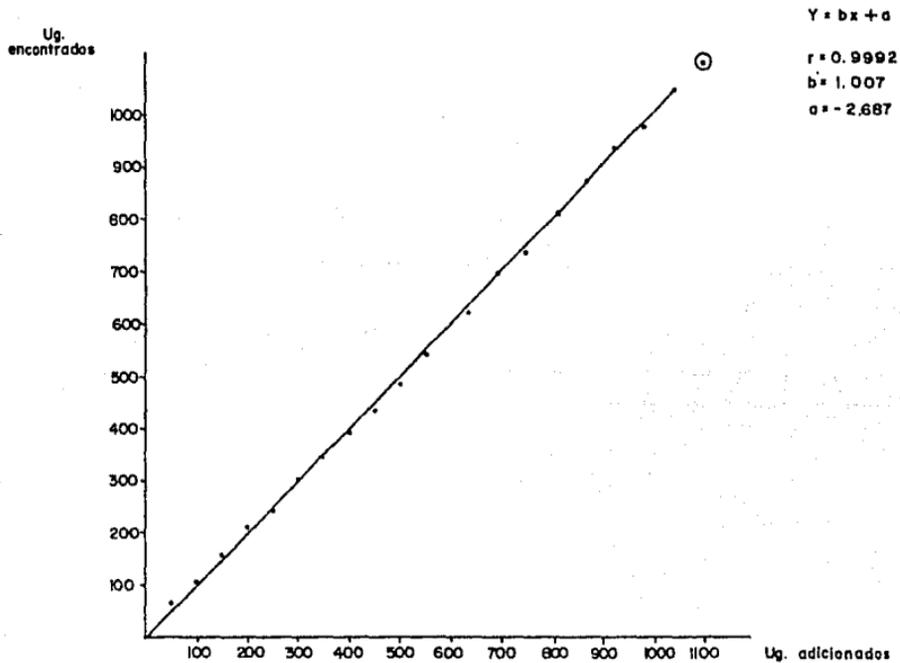


FIGURA No. 14

REACCION DE REDUCCION PROPUESTA:

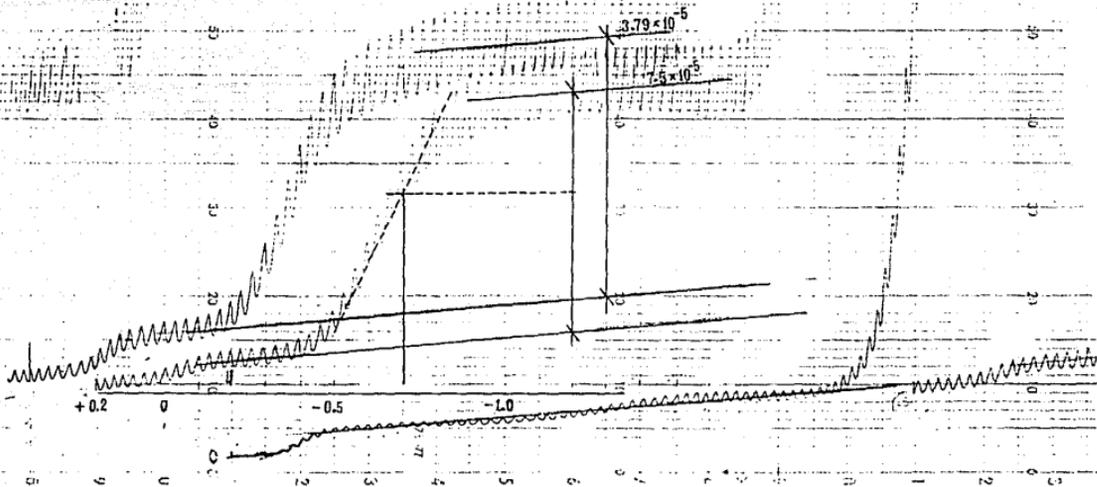
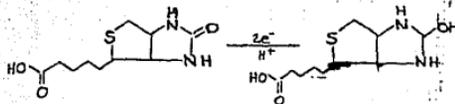


FIGURA No. 15

CONCENTRACION DE BIOTINA VS CORRIENTE LIMITE DE DIFUSION

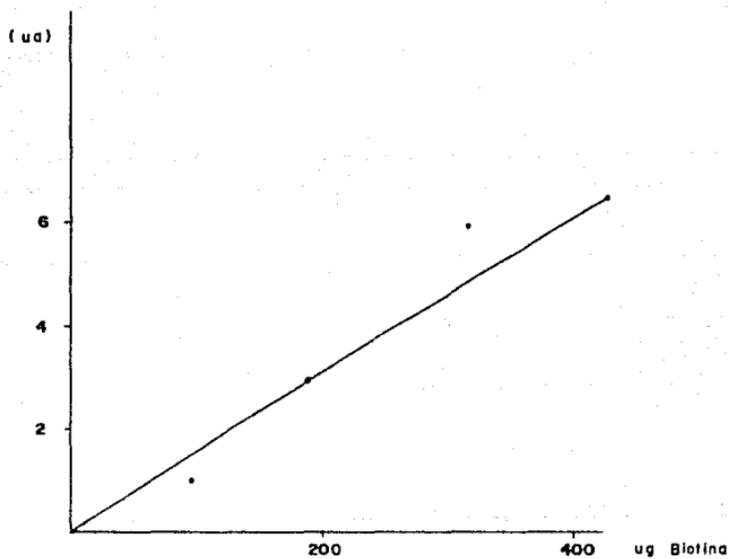
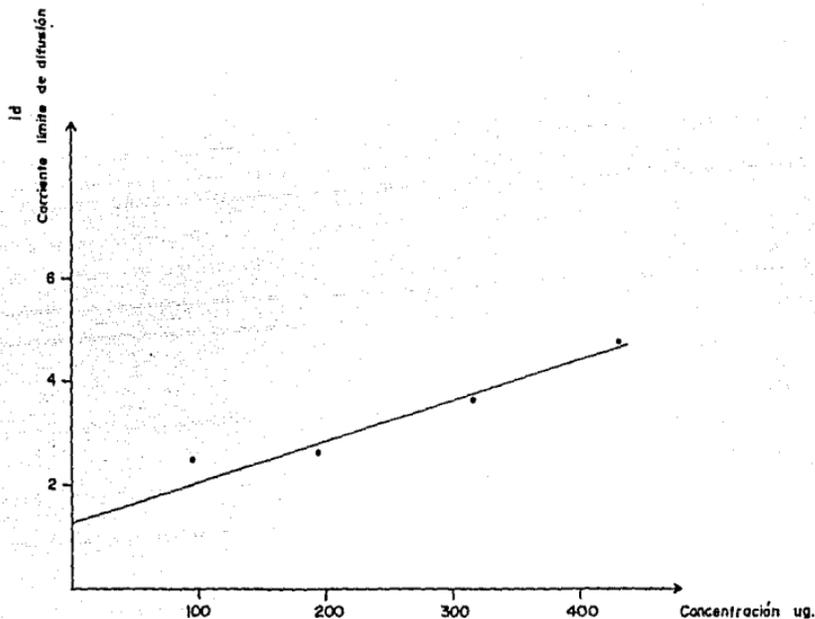


FIGURA No. 16

CONCENTRACION DE BIOTINA ADICIONANDO DEXTRINA VS CORRIENTE LIMITE DE DIFUSION



## CAPITULO V

### Análisis de Resultados

#### Determinaciones cualitativas.

##### a). Espectroscopía.

##### 1.- Espectro infrarrojo

El espectro de infrarrojo obtenido para D(+) biotina pura (Fig. No 1) presenta dos bandas resueltas en 3362 y 3306  $\text{cm}^{-1}$  las cuales se asignan a la vibración de alargamiento longitudinal de N-H. (26). Las bandas localizadas en 2930  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de alargamiento longitudinal asimétricas y simétricas (27) de los diferentes metilenos y metinos presentes en la molécula. En la región comprendida entre 1720 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  aparecen tres bandas resueltas que corresponden a vibraciones de alargamiento longitudinal de carbonilos. El espectro reportado para biotina (28), además de corresponder con el espectro experimental, presenta la misma banda dobleteada en 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Considerando la posición de la banda C=O en el espectro de infrarrojo del ácido n-valérico (29) y la correspondiente en el espectro de 4-metil-2-imidazolidinona (30) y las reportadas para N,N'-bis metoximetil urea (31); el doblete observado en 1700  $\text{cm}^{-1}$  puede atribuirse a la vibración del carbonilo del grupo ácido que, debido a la flexibilidad de la cadena lateral, puede o no encontrarse asociado intramolecularmente. Por consiguiente, la banda dispuesta en 1640  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del carbonilo de tipo urédico (31).

El resto del espectro lo constituyen bandas de intensidad media a baja entre las que se distinguen las debidas a las vibraciones de deformación de metilenos en 1481 y 1435  $\text{cm}^{-1}$ , las de

deformación fuera de plano de  $\text{CH}_2\text{-S}$  (26) en  $1270\text{ cm}^{-1}$  y la debida a la vibración de alargamiento longitudinal  $\text{C-S}$  (27) en  $651\text{ cm}^{-1}$ .

El espectro infrarrojo obtenido para una muestra comercial de biotina en dextrina (Fig. No. 2) no permite observar con claridad las bandas más intensas del espectro debido a la gran cantidad de dextrina presente en la muestra. Las operaciones realizadas restando el espectro de dextrina pura al de la muestra comercial no permitieron obtener el espectro de biotina como se esperaba, por consiguiente, no es posible utilizar esta metodología para detectar la presencia de biotina en formulaciones comerciales.

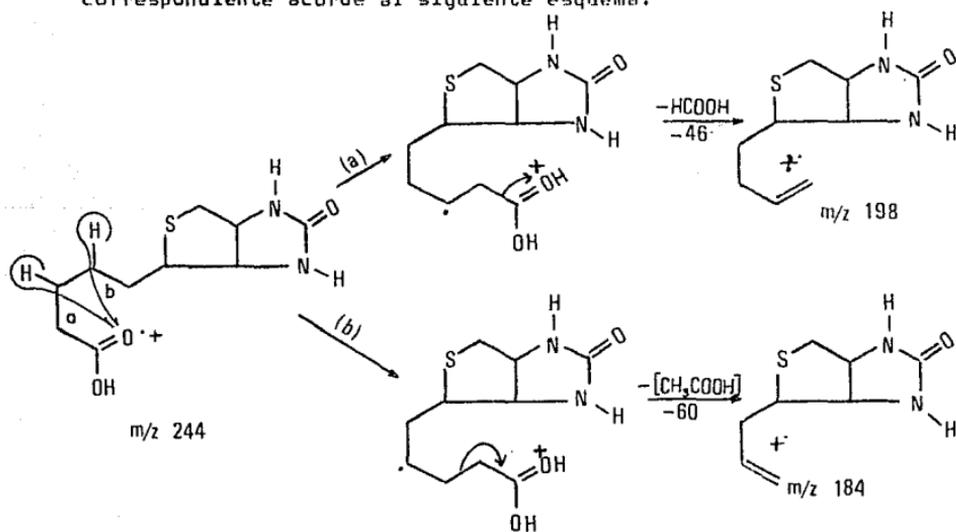
## 2.- Espectro de resonancia magnética nuclear.

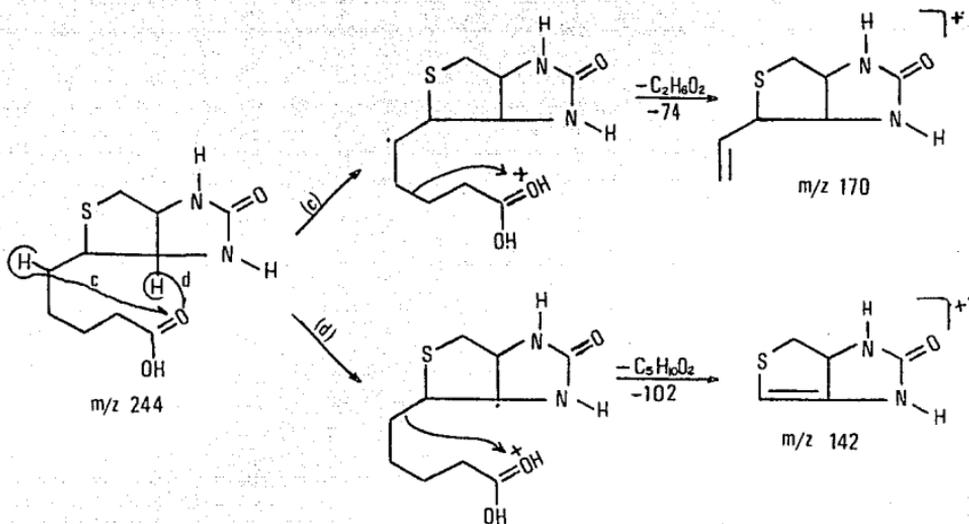
El espectro de resonancia magnética protónica obtenido para D(+)-biotina pura (Fig. No.3) presenta las siguientes señales: En  $1.4\text{ppm}$  se observan las señales correspondientes a los metilenos de la cadena lateral del ácido valérico (32). La señal en  $2.1\text{ppm}$  se presenta como un triplete y corresponde al metileno vecino al carbonilo del ácido (32). En  $3.2\text{ppm}$  se observa un sistema complejo debido a los tres hidrógenos cercanos al azufre en el anillo tiofénico (33). Las señales presentadas en  $4.1\text{ppm}$  son debidas a los dos hidrógenos de bases de fusión de los anillos A y B. La señal de  $6.2\text{ppm}$  es debida a los hidrógenos uréicos del anillo de imidazolidona (34). La señal de  $8.1\text{ppm}$  es debida al hidrógeno del grupo ácido (32). Las señales entre  $2.3$  y  $2.8\text{ppm}$  son debidas al disolvente (dimetilsulfóxido).

### 3.- Espectro de masas

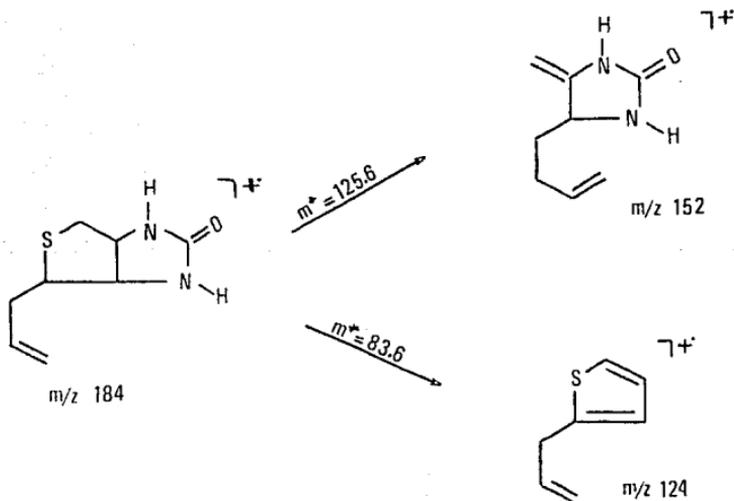
El espectro de masas obtenido para biotina pura (Fig. No. 4) presenta un pequeño ión molecular dispuesto a  $m/z = 244$ . El primer ión-fragmento que se observa aparece a  $m/z = 226$  ( $M - 18$ ) y corresponde a la pérdida de  $H_2O$ , a través de un reagrupamiento de hidrógeno de origen incierto, a partir del ión molecular.

Existen otros iones en el espectro, dispuestos a valores de  $m/z$  pares, que involucran procesos de descomposición unimolecular acompañados de transferencia de hidrógenos. La serie dispuesta a  $m/z = 198$  ( $M - 46$ ),  $184$  ( $M - 60$ ),  $170$  ( $M - 74$ ) y  $142$  ( $M - 102$ ) corresponde a la pérdida de la cadena lateral con un hidrógeno reagrupado con retención de la carga en el fragmento más pesado. La racionalización de este proceso se puede encontrar al considerar el reagrupamiento de tipo McLafferty (35) hacia el carbonilo terminal seguido de la heterólisis del enlace correspondiente acorde al siguiente esquema:

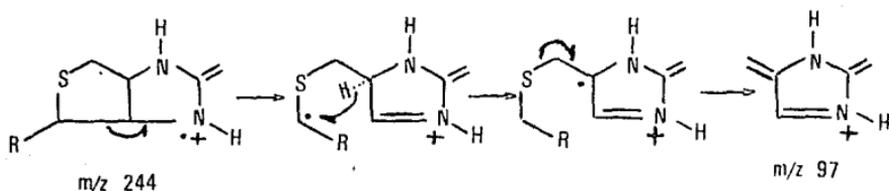




Los iones de reagrupamiento localizados a  $m/z = 152$  y  $124$  resultan de las descomposiciones consecutivas del ión a  $m/z = 184$ . Lo anterior fué evidenciado a través de los iones metaestables (36) localizados en  $m^* = 125.6$  y  $83.6$  respectivamente:

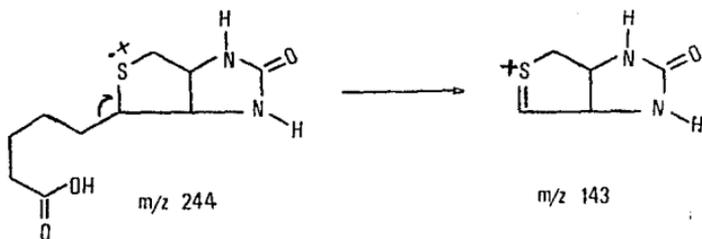


El pico base del espectro se puede racionalizar considerando a uno de los nitrógenos del anillo B como sitio de ionización primaria, la formación de ión amonio correspondiente, el reagrupamiento de hidrógeno hacia el sitio radical y la homólisis del enlace alfa al azufre acorde al siguiente esquema:

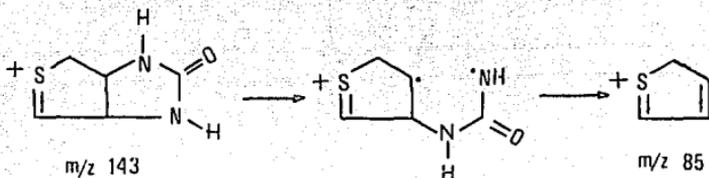


La estructura conjugada propuesta para el pico base ( $m/z = 97$ ) va de acuerdo con la estabilidad esperada para el mismo.

La fragmentación dirigida por el azufre heterocíclico produce, mediante ruptura 'beta' homolítica (37) y pérdida de la cadena lateral, el ión tionium dispuesto a  $m/z = 143$



La descomposición posterior del ion  $m/z = 143$ , involucraría la pérdida de 58 unidades de masa (HNCONH) característica de imidazolidinonas fusionadas.



El espectro de masas reportado para el derivado trimetil sililado de la biotina (38), como era de esperarse, presenta un patrón de fragmentación distinto al reportado en éste trabajo de tesis; uno de los iones mas intensos aparece a  $m/z$  =445 ( $M - 15$ ) (90%) lo que permitiría determinar cuantitativamente el contenido de biotina en muestras comerciales, previo tratamiento de sililación, en un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases. Por no contar con la metodología acoplada, esta experiencia queda fuera del alcance de esta tesis.

#### b). Cromatografía en capa fina.

La presencia de soportes inertes en las muestras analizadas no permiten la aplicación directa de las técnicas espectrofotométricas antes descritas. Por esta razón se optó por desarrollar un sistema de elución aplicable a cromatografía en capa fina obteniendo los siguientes resultados:

Sistemas:	Rf's
1).Acetato de etilo : Metanol (4:3)	0.32
2).Acetato de etilo : Metanol (1:1)	0.30
3).Acetato de etilo : Metanol : Etanol (5:5:1)	0.32
4).Acetato de etilo : metanol : Agua (10:10:1)	0.50

Utilizando como visualizador yodo.

Encontrando el sistema ideal, se requería el uso de algún reactivo visualizador permanente (39) (ver características de estos reactivos en el capítulo II) para poder detectar mediante un densitómetro, las diferencias de lecturas de densidad óptica en función de la concentración y así aplicar ésta metodología hacia las determinaciones cuantitativas.

Por carecer del reactivo específico (solución de yodoplatinato) no fue posible realizar esta experiencia, sin embargo su adaptación y evaluación resultaría sumamente sencilla.

Determinaciones cuantitativas.

a). Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.

Si consideramos la fórmula estructural de la biotina indicada en el capítulo I, los únicos grupos cromóforos en la molécula son los correspondientes a los dos carbonilos los cuales contribuyen a absorciones a longitud de onda muy baja, del orden de 200nm, con coeficientes de extinción también muy bajos. Con el propósito de determinar el valor de longitud de onda máxima en las condiciones que se utilizarían en el cromatógrafo de líquidos se trazó el espectro UV de biotina pura (Fig. No. 5). El valor de longitud de onda máximo determinado en 193nm está en correspondencia con el valor esperado para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  de compuestos carbonílicos (40). No obstante que el metanol presenta la transición electrónica  $n \rightarrow \pi^*$  en longitud de onda igual a 183nm, su coeficiente de extinción máximo es de 500 (40), esto representa el 10% aproximadamente del valor de extinción determinado para la biotina pura. A fin de determinar el intervalo de concentraciones

en el que se cumple la ley de Lambert-Beer, se realizó otra experiencia preliminar variando las concentraciones de biotina pura y registrando el valor de la absorbancia a 193nm. En la tabla No. 2 y Fig No. 6, se presentan los resultados obtenidos con una linealidad satisfactoria y un coeficiente de regresión lineal de 0.9953. De la misma curva se determinó el valor del coeficiente de extinción molar como 5425.1 cm.M/lt.

La linealidad de la respuesta espectrofotométrica así como el valor del tiempo de retención (1.56 min) se obtuvieron después de inyectar en el cromatógrafo de líquidos, bajo las condiciones indicadas en el capítulo anterior, diferentes concentraciones de una solución estándar de biotina pura y podemos observar que los resultados son proporcionales tanto con el área como con la altura del pico. En la fig. No 7 se presenta el cromatograma obtenido y en la tabla No. 3 y Fig. No. 8 los resultados obtenidos de concentración de biotina contra altura y área del pico.

En la Fig. No. 9 se presenta un cromatograma típico para una muestra de premezcla cuyo inerte es dextrina. Como se puede apreciar, el tiempo de retención y la resolución del pico correspondiente a biotina aparecen en la posición esperada. Existe además otro pico a 1.9 minutos y que corresponde a la elución de la dextrina. Sin embargo, tanto el área como la altura de éste pico no resultó proporcional a la concentración de dextrina debido a que en las condiciones instrumentales, este alto polímero se fraccionó (solamente las especies de bajo peso molecular fueron eluidas) dejando la mayor cantidad de dextrina retenida fuertemente en la columna como resultado de la baja solubilidad de ésta en el medio eluyente y la gran afinidad con el soporte de la

columna. Por esta razón no fue posible realizar las determinaciones analíticas con los otros tipos de premezclas y se optó por utilizar otros métodos alternos.

b). Titulación yodométrica.

Después de analizar 10 muestras de premezcla acorde al procedimiento descrito en el capítulo anterior y realizando dos determinaciones de cada muestra se presenta el promedio de 4 análisis realizados por muestra y se obtuvieron los resultados presentados en la tabla No. 9.

Nota! Puesto que se trata de una titulación indirecta oxidoreducción, es de esperarse que en los casos en donde el excipiente resulta ser parcial o totalmente soluble en agua, el consumo de oxidante alcance valores extremadamente altos. El método anterior solamente es aplicable para muestras de premezclas que contengan almidón o carbonato de sodio como inerte. Para los otros tipos de premezclas fue necesario adaptar el método colorimétrico antes descrito.

c). Colorimetría.

La aplicación de este método como variante de la titulación yodométrica presenta las siguientes ventajas:

- 1.- Se utiliza un oxidante (yodato) menos energético que en la titulación yodométrica (periyodato), lo cual minimiza la influencia de inertes solubles.
- 2.- Se aprovecha la mayor solubilidad y constante de reparto del yodo liberado en disolventes orgánicos.

3.- La curva de absorción del yodo en el espectro visible es intensa y no presenta interferencia con alguna de las demás especies presentes.

En la tabla No. 4 y Fig. No. 10 se presenta la curva de absorción del ión triyoduro en ciclohexano cuyo máximo corresponde a una longitud de onda de 520nm. Como se puede apreciar en los valores numéricos de esta tabla, utilizando una celda de cuarzo de 5cm incrementa en promedio cinco veces el valor de la absorbancia, razón por la cual se decidió utilizar este tipo de celdas para las lecturas colorimétricas.

En la tabla No. 5 se presenta la gráfica de concentración del ión triyoduro contra absorbancia, confirmándose que se sigue la ley de Lambert-Beer.

En la Fig. No. 11 se presenta la gráfica de los resultados antes mencionados, para la que corresponde un coeficiente de correlación de 0.9994.

Todas las muestras de premezclas disponibles fueron analizadas por esta metodología (ver capítulo anterior). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 10.

Es importante notar que para todas aquellas muestras que contienen almidón como excipiente los resultados obtenidos son numéricamente inferiores a los valores encontrados en la titulación yodométrica (ver tablas No.9 y 10) de las mismas muestras. Lo anterior no es sorprendente debido a que la presencia de almidón en estas muestras enmascara el yodo liberado conduciendo a valores inferiores de recuperación.

#### d). Polarografía.

Con el propósito de determinar si la reacción de reducción electroquímica de la biotina, en un medio acuoso y con un electrodo gotero de mercurio, caía dentro del dominio electroactivo, se trazó la curva polarográfica del electrolito soporte (solución de cloruro de potasio 0.1M) y posteriormente se adicionaron 300ug de biotina y se obtuvo el polarograma que se presenta en la Fig. No. 14. Como se puede observar, la onda de reducción de biotina presenta una corriente límite de difusión satisfactoria y el potencial de media onda de este sistema aparece a  $-0.70\text{v}$  contra el electrodo de calomel saturado.

Al determinar las magnitudes de la corriente límite de difusión contra concentraciones variables de biotina pura se obtuvieron los resultados indicados en la Fig. No. 15. La recta ajustada presenta un coeficiente de regresión de 0.9653

Posteriormente, adicionando una pequeña cantidad de dextrina a la solución del electrolito soporte, se demostró que ésta no constituye una especie electroactiva dentro del intervalo de potencial considerado.

Los resultados obtenidos en el experimento en el que se varió la concentración de biotina manteniendo constante la cantidad de dextrina en el sistema, se presentan en la Fig. No. 16. Como se puede observar, la presencia de dextrina en el sistema, no obstante ser una especie no electroactiva, afecta los valores de corriente límite de difusión como resultado de la influencia de éste alto polímero sobre el sistema de difusión en régimen estacionario. Esta observación nos permite preveer que como

resultado de ésta pérdida de sensibilidad, y que a la concentración de dextrina considerada en este modelo experimental, utilizar muestras de premezcla para análisis directo vía polarográfica, la cantidad de biotina presente en el sistema caería muy por abajo del límite de concentraciones consideradas y que al aumentar la cantidad de premezcla original, de modo que la concentración de biotina cayese dentro del intervalo considerado, introduciría una gran cantidad de dextrina polimérica que afectaría seriamente los valores de viscosidad y régimen de difusión estacionario.

Validación de los métodos químicos aplicables a premezclas.

a). Método Yodométrico

Para demostrar la linealidad del método, se probó la hipótesis y ésta fue aceptada ya que la "t<sub>calc.</sub>" es mucho menor que la "t" de tablas con n-2 grados de libertad y  $\alpha = 0.05$ ; el método es lineal hasta el valor de mayor concentración trabajada.

En cuanto a la exactitud, se probaron las hipótesis para determinar la existencia de errores de tipo constante y de tipo proporcional en donde las "t<sub>calc.</sub>" en ambos casos son menores de las "t" de tablas con n-2 grados de libertad y  $\alpha = 0.005$  y un riesgo menor al 1%, por lo tanto no existen errores de tipo constante ni de tipo proporcional por lo que el método es exacto.

La precisión del método es de 2.27% de acuerdo a los resultados de "Se."

La cantidad mínima detectable en éste método es de 5.34 $\mu$ g, lo cual nos indica que para nuestros propósitos este método es lo suficientemente sensible.

b). Método colorimétrico.

Hasta el nivel de concentración máxima que se trabajó, se probó y se aceptó la hipótesis para la linealidad de este método ya que la "t<sub>calc.</sub>" es muchas veces menor que la "t" de tablas encontrada para n-2 grados de libertad y alfa = 0.05.

En este método al igual que el anterior se probaron las hipótesis para determinar la presencia de errores de tipo proporcional y de tipo constante; se probó que no hay ninguno de estos dos tipos de errores por lo que el método es exacto.

La precisión del método es de 2.19% de acuerdo al valor de "Se" determinado.

La cantidad mínima detectable es de 1.37ug y esto nos indica que la sensibilidad es adecuada para nuestros propósitos.

## CONCLUSIONES

Durante el desarrollo experimental de la presente tesis, se pudieron evidenciar las fronteras de aplicabilidad de cada metodología, desde la falta de sensibilidad hasta la pérdida de selectividad por efectos de interferencia. Estos parámetros potencializan a uno de los métodos como el de aplicación mas general y la evaluación de sus inconveniencias, debidas a fenómenos de sensibilidad y/o posibles interferencias, conducen a proponerlo como método de mayor validación relativa. Las conclusiones que se pueden obtener de este estudio son las siguientes:

- 1.- La espectrofotometría en el infrarrojo no es una técnica aplicable ni aún para la identificación de biotina en premezclas.
- 2.- La técnica de resonancia magnética protónica de onda continua, como la utilizada en ésta tesis, no permite identificar la presencia de biotina en premezclas. Como antes se indicó, es posible que el uso de un equipo de pulsos pueda identificar, y eventualmente cuantificar las señales debidas a biotina en premezclas.
- 3.- La espectrometría de masas aplicada al análisis de las muestras de premezclas, en principio, podría permitir la cuantificación de biotina utilizando la técnica SIM (single ion monitoring). Sin embargo, la naturaleza de los excipientes de las premezclas no permiten la realización de esta técnica debido a la descomposición térmica que sufren, con lo cual se altera sensiblemente el valor de vacío de operación. Una variante de ésta técnica la constituyen los sistemas acoplados cromatógrafo de

gases-espectrómetro de masas con el inconveniente de que las muestras de premezclas deberán someterse a procesos previos de derivatización.

4.- La aplicación de la cromatografía en capa fina permite la identificación de biotina en premezclas sin importar el tipo de excipiente. Las inferencias cuantitativas son previsibles cuando se utilizan visualizadores específicos, procedimientos estandarizados y densitómetros electrónicos.

5.- La potencialidad de la cromatografía anterior, con una instrumentación más sofisticada, se aprovechó cuando se utilizó la cromatografía de líquidos de alta presión. La resolución de los componentes de las premezclas y la relación área-concentración en las condiciones experimentales resultaron satisfactorias. El inconveniente que se observó, y que por ende limitó su aplicación, consistió en la fuerte interacción de los excipientes y las porciones polares del soporte de la columna, además de la poca solubilidad de éstos en la fase móvil; lo que condujo a obstrucciones en la columna y aumento de presión en el sistema de bombeo de disolventes.

6.- Los resultados de la validación del método yodométrico reportados en ésta tesis cumplen con los parámetros estadísticos de linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad.

7.- El método yodométrico es aplicable sólo a las muestras de premezclas cuyo excipiente es almidón o carbonato de sodio.

8.- Los resultados de la validación del método colorimétrico reportados en esta tesis cumplen con los parámetros estadísticos de linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad.

9.- La técnica colorimétrica de evaluación de biotina en premezclas es satisfactoria para todas las premezclas. Sin embargo, en el caso donde el excipiente es almidón, se observa pérdida de sensibilidad.

10.- No existe diferencia significativa entre los métodos yodométrico y colorimétrico, cuando se comparan los parámetros estadísticos de linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad, por lo que ambos son aceptados como métodos de cuantificación de biotina.

11.- La técnica polarográfica como fue descrita anteriormente, no es aplicable para la cuantificación de biotina en premezclas debido a los factores antes discutidos. Sin duda el uso de electrodos sólidos giratorios podría representar una alternativa de valoración superando los problemas inherentes al régimen de difusión.

Por consiguiente, no existe un método químico de aplicación universal (ni aún el método microbiológico) para la cuantificación de biotina en los diferentes tipos de premezclas. El método microbiológico, de aplicación más generalizada, solamente determina el contenido de enantiómero biológicamente activo (D(+)-biotina). Los métodos reportados en esta tesis, no realizan esta discriminación, por lo que los valores así determinados se esperarán superiores a los que se obtendrían utilizando el método microbiológico.

Es necesario enfatizar que el presente trabajo de tesis, por haberse desarrollado bajo un enfoque analítico, no contempla el tratamiento de datos estadísticos con el rigor que caracterizaría

a un trabajo dirigido con propósitos de control de calidad. Los resultados experimentales aquí reportados nos indican que la participación de los excipientes presentes en las premezclas, es poco significativa en cuanto a la reacción principal de óxido-reducción se refiere. El tratamiento estadístico aquí reportado, evidencia la cuantitatividad de la reacción entre biotina y titulante indicando su alto grado de confianza estadística.

Será competencia del químico analítico seleccionar el método mas indicado para la valoración de biotina en premezclas, sin embargo recomendamos que, en todos los casos, las determinaciones se realicen con una prueba en blanco paralela y, eventualmente, realizando determinaciones en paralelo a muestras de premezclas que contengan cantidades adicionales de biotina pura como estándar interno.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wagner, A.F., Vitamins and Coenzymes., Interscience Publishers., p.p.138-159., (1964).
- 2.- Kirk-Othmer., Encyclopedia of Chemical Technology., 2nd. Ed., John Wiley and Sons., Vol. 3., p.p.518-527., (1964).
- 3.- Sebrell, W.H. & Harris, R.S., The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology., Academic Press Inc. Publishers., Vol. I., p.p.525-618., (1954).
- 4.- du Vigneaud, V., 'The Structure of Biotin'., Science., 96., p.455., (1942).
- 5.- Ewing, W.R., Poultry Nutrition., 4th. Ed., p.p.1146-1157., (1951).
- 6.- The Merck Index., 10th. Ed., clave 1229., p. 174., (1983).
- 7.- Acheson, R.M., Quimica Heterociclica., p.p. 180-183., (1981).
- 8.- Mayer, F., Methods of Vitamin Assay., 3th. Ed., p.p. 245-255., (1966).
- 9.- University of Nottingham Seminar Churchill Livingstones., Vitamins., p.p. 15, 171 y 172., (1971).
- 10.- Strohecker, R., Analisis de Vitaminas, Metodos Probados., p.p.212-218., (1967).
- 11.- Silverstein, R.M., Spectrometric Identification of Organic Compounds., John Wiley and Sons., 4th. Ed., p.p. 95-187., (1981).
- 12.- Ibid., p.p.181-215.
- 13.- Ibid., p.p.3-43.
- 14.- Jauregui, J.F., Curso de Espectrometría de Masas., UNAM., División de Estudios Superiores, Facultad de Química.

- 15.- Snell, F.D., Colorimetric Methods of Analysis., D. Van Nostrand Company, Inc., 3th. Ed., Vol. 1., p.p.1-20., (1956).
- 16.- Ayres, G.H., Analisis Quimico Cuantitativo., Ed. Harla., p.p.430-447., (1979).
- 17.- Ahmed, J. & Verma, K.K., "Determination of d-Biotin at the Microgram Level", Talanta., 26., 1025-1026., (1979).
- 18.- Plinton, C. & Mahn, F.P., "Colorimetric Determination of Biotin", J. Pharm. Sci., 58(7), 875-876, (1969).
- 19.- Abbott, D., Andrews, R.S., Introduccion a la Cromatografia., 3a. Ed., p.p.1-3, 54-60, 81-84., (1973).
- 20.- Hadden, N., Basic Liquid Chromatography., Varian Aerograph., p.p. 1-1 a 1-8, 2-1 a 2-9., (1971).
- 21.- Mc. Nair, H.M., Cromatografia Liquida de Alta Presion., D.E.A., 2a. Ed., (1980).
- 22.- Serna, A., Vera, J., & Marin, D., "Polarographic Behaviour of Biotin", J. Electroanal. Chem., 45(1), 156-159, (1973).
- 23.- Meites, L., Polarographic Techniques., John Wiley and Sons., p.p.1-5., (1967).
- 24.- Brezina, M. & Zuman, P., Polarography In Medicine, Biochemistry and Pharmacy., p.p.3-6., (1958).
- 25.- Arvia, A.J. y Balzan, J.A., Polarografia., Monografia No. 3., Serie de Quimica., p.p.73-74.
- 26.- Colthup, N.B., Baly, L.H. & Wibenley, S.E., Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy., Academic Press., p.306., (1964).
- 27.- Nakanishi, K., Infrared Absorption Spectroscopy-Practical., Holden-day., p.54., (1962).
- 28.- Espectro No. 25729 Colección Sadtler Estandar.

- 29.- Espectro No. 00304 Colección Sadtler Estandar.
- 30.- Espectro No. 12577 Colección Sadtler Estandar.
- 31.- Dolphin, D. & Wick, A., Tabulation of Infrared Data., Wiley-Interscience., (1977).
- 32.- Pouchert, Ch.J. & Campbell, J.R., The Aldrich Library of NMR Spectra., Vol. II., Espectro 146-A.
- 33.- Ibid., Vol. VIII., Espectro 14-D.
- 34.- Ibid., Vol. III., Espectro 135-D.
- 35.- Beynon, J.H., Saunders, R.A. & Williams, A.E., The Mass Spectra of Organic Molecules., Elsevier Publishing Co., p.216., (1968).
- 36.- Waller G., Biochemical Applications of Mass Spectrometry., Wiley Interscience., p.p.157-163., (1972).
- 37.- Porter, G.N. & Baldas, J., Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds., Wiley Interscience., p.p.233-235; (1971).
- 38.- Ibid.(36)., p.p.529-531.
- 39.- Stahl. E., Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook., Academic Press Inc., p.p.245 y 325., (1965).
- 40.- Ibid. (11)., p.312.
- 41.- Miller I. & Freud J.E., Probabilidad y Estadística para Ingenieros., Editorial Reverte Mexicana., Primera edición., Cap. XII, (1967).
- 42.- Massart D. & Dijkstra A., Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures., Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry., Elsevier Scientific Company., Vol. 1., p.87., (1978).