



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE VITAMINAS B₆ Y B₁₂
POR MÉTODOS VOLTAMPEROMÉTRICOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MIGUEL ANGEL RIVERA RECILLAS



Ciudad Universitaria, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Francisco Rojo Callejas
VOCAL: Profesor: Julio César Aguilar Cordero
SECRETARIO: Profesor: Josefina Elizalde Torres
1er. SUPLENTE: Profesor: Tania Gómez Sierra
2° SUPLENTE: Profesor: Luis Alejandro Díaz Flores

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 3C,
Edificio A, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química.

ASESOR DEL TEMA:

Julio César Aguilar Cordero

SUSTENTANTE:

Miguel Angel Rivera Recillas

CONTENIDO

Índice de figuras	4
Índice de tablas	6
Abreviaturas	7
1. Introducción	8
Objetivo.....	10
2. Marco teórico.....	11
Vitaminas del complejo B.....	11
Vitamina B ₆	12
Vitamina B ₁₂	14
Importancia nutrimental de las vitaminas	16
Importancia de su cuantificación.....	18
Métodos de cuantificación de vitamina B ₆	20
Métodos de cuantificación de vitamina B ₁₂	21
Voltamperometría.....	22
Voltamperometría cíclica (CV)	22
Voltamperometría de onda cuadrada (SWV).....	24
Técnicas electroquímicas para el análisis de alimentos.....	25
3. Metodología.....	28

Reactivos	28
Instrumentación	29
Preparación del electrodo modificado (MWCNT)	29
Preparación de muestras	30
Determinaciones electroquímicas	31
4. Resultados y discusión	32
Comportamiento electroquímico de la vitamina B ₆	32
Comportamiento electroquímico de la Vitamina B ₁₂	35
Curvas de calibración	38
Modificación de ET con nanotubos de carbono.....	41
Cuantificación en muestras comerciales.....	47
Tiaminal B ₁₂ Trivalente A.P.	47
Piridox GNC	51
Boing	53
5. Conclusiones.....	56
6. Perspectivas	56
7. Anexo	57
8. Referencias.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de los compuestos de vitamina B ₆	12
Figura 2. Estructuras de los compuestos de vitamina B ₁₂	15
Figura 3. Señal de excitación potencial-tiempo en CV.....	23
Figura 4. Esquema de la señal de excitación en SWV	25
Figura 5. Voltamperogramas cíclicos para PN 500 μ M en PBS 100 mM, con burbujeo de nitrógeno	32
Figura 6. Voltamperograma de onda cuadrada (corriente de ida) para PN en diferentes concentraciones.....	33
Figura 7. Voltamperograma cíclico para PN en diferentes concentraciones	34
Figura 8. Variación de la i_p con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en CV, para PN en ET de carbono vítreo.....	34
Figura 9. Voltamperograma cíclico para CM.....	36
Figura 10. Voltamperogramas de onda cuadrada para CM a diferentes concentraciones.	36
Figura 11. Variación de la i_p con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en CV, para CM en carbono vítreo.....	37
Figura 12. Curva patrón obtenida para PN con ET de carbono vítreo por SW, muestreando solo corrientes de ida	39
Figura 13. Curva patrón obtenida para PN con ET de carbono vítreo por SWV, sumando las señales de corriente de ida y vuelta.	39
Figura 14. Curva de calibración de CM obtenida por CV.....	40
Figura 15. Curva patrón obtenida para CM con ET de carbono vítreo por SWV, muestreando solo corrientes de ida.	40

Figura 16. Variación de la i_p con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en CV, para ET modificado (MWCNT)	41
Figura 17. Corriente de pico para misma concentración de PN a diferentes tiempos, usando SW con ET modificado	42
Figura 18. Curva patrón obtenida con ET modificado (MWCNT) por CV, sin limpiar o modificar entre lecturas.	43
Figura 19. Curva patrón obtenida con ET modificado (MWCNT) por SW, sin limpiar o modificar entre lecturas.	44
Figura 20. Voltamperogramas de onda cuadrada para misma concentración de PN en ET modificado, sin limpiar o modificar entre lecturas	45
Figura 21. Curva patrón obtenida con ET modificado (MWCNT) por SW, modificando entre lecturas.	46
Figura 22. Voltamperogramas cíclicos para mezcla estándar de PN, CM y muestra comercial diluida.	48
Figura 23. Voltamperogramas cíclicos para mezcla estándar de PN y CM a 40, 50 y 70 μM	49
Figura 24. Voltamperogramas de onda cuadrada para determinar el recobro de PN en Pirydox de GNC.	52
Figura 25. Voltamperogramas de onda cuadrada de muestra de Boing con dilución 1:10, por adiciones estándar de PN.	53
Figura 26. Curva de calibración obtenida por el método de adiciones estándar en muestra de Boing con dilución 1:10, por SWV.....	54
Figura 27. Espectros UV-visible para la cuantificación de PN en la muestra comercial Pirydox.....	63
Figura 28. Espectros UV-visible de CM para las concentraciones: 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 μM , en PBS 0.1 M.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingesta diaria recomendada de vitamina B ₆ por grupo	13
Tabla 2. Ingesta diaria recomendada de vitamina B ₁₂ por grupo	16
Tabla 3. Efecto de las técnicas de conservación sobre el contenido de vitaminas hidrosolubles de los alimentos	17
Tabla 4. Algunos métodos y electrodos empleados en determinaciones voltamperométricas de colorantes en alimentos.	26
Tabla 5. Algunos métodos y electrodos usados en la determinación voltamperométrica de metales en alimentos	27
Tabla 6. Resultados para la cuantificación de PN y CM en Tiaminal B12 Trivalente A.P.	50
Tabla 7. Resultados para la cuantificación de PN en Pyrydox GNC por el método propuesto y el espectrofotométrico.	51
Tabla 8. Límites de detección de PN reportados para los métodos: electroquímico, HPLC y espectrofotométrico.....	62

ABREVIATURAS

- AdSV.** Voltamperometría de redisolución adsortiva.
- ASV.** Voltamperometría de redisolución anódica.
- CadSV.** Voltamperometría de redisolución de adsorción catalítica.
- CGE.** Electrodo de carbono vítreo.
- CLAR.** Cromatografía de líquidos de alta resolución.
- CM.** Cianocobalamina.
- CSV.** Voltamperometría de redisolución catódica.
- CV.** Voltamperometría cíclica.
- DER.** Desviación estándar relativa.
- DPP.** Polarografía diferencial de pulsos.
- ER.** Electrodo de referencia.
- ES.** Electrolito soporte.
- ET.** Electrodo de trabajo.
- HMDE.** Electrodo de gota de mercurio estática.
- HPLC.** Cromatografía de líquidos de alta resolución.
- i_p .** Corriente de pico.
- MGA.** Método general de análisis.
- MWCNT.** Nanotubos de carbono multi pared.
- OSWV.** Voltamperometría de onda cuadrada de Osteryoung.
- PBS.** Disolución de buffer fosfatos.
- PN.** Piridoxina
- SWV.** Voltamperometría de onda cuadrada.

1. INTRODUCCIÓN

La cuantificación de vitaminas es importante para evaluar la calidad de un producto alimenticio o farmacéutico respecto al contenido de estos componentes. En la industria y la investigación es relevante proporcionar alternativas para el análisis y cuantificación, no sólo de los compuestos mencionados, sino también de algunos otros, pues en el caso de los alimentos, al tratarse de matrices complejas, se presentan dificultades al momento de realizar análisis de sustancias específicas y que son de interés nutrimental o tecnológico.

El análisis de sustancias en la rama de los alimentos requiere de innovación, sobre todo en el aspecto de introducir técnicas analíticas alternativas a las que se emplean en los métodos que comúnmente se usan para ello. Por ejemplo, en muchos casos, los métodos espectrofotométricos utilizados en el análisis de alimentos presentan problemas debido a la inevitable presencia de sustancias interferentes, que podrían en ocasiones evitarse empleando otras técnicas analíticas, tales como las electroquímicas. Dichas técnicas pueden utilizarse para cuantificar componentes, como los ya mencionados anteriormente, en alimentos y preparados farmacéuticos, con alta sensibilidad y especificidad, para establecer así metodologías de análisis que puedan llevarse a cabo satisfactoriamente a nivel docente, investigación e industrial.

Desafortunadamente, en México no hay metodologías oficiales indicadas por la normatividad correspondiente, para la especiación y

cuantificación de muchos analitos. Tal es el caso de las vitaminas B₆ Y B₁₂, pues su contenido en alimentos, productos alimenticios y farmacéuticos requiere ser conocido por distintas causas, tales como los parámetros de calidad. La falta de dichas metodologías, en la mayoría de los casos, ha provocado el uso de algunas establecidas por normas u organizaciones internacionales, como la farmacopea de Estados Unidos, y que involucran el uso de técnicas complejas como HPLC que presentan desventajas en cuanto al precio y tiempo de análisis.

Ya se han realizado trabajos que involucran el uso de técnicas electroquímicas potenciodinámicas para la detección y cuantificación de cianocobalamina y piridoxina. No obstante, la mayoría de estos trabajos se han limitado a la detección en preparados farmacéuticos y matrices relativamente sencillas, tales como los suplementos o multivitamínicos (Zhang y Wang, 2011).

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es aplicar un método de análisis electroquímico, sencillo, rápido, eficaz, confiable y de bajo costo, para la cuantificación de vitamina B₆ y B₁₂ (piridoxina y cianocobalamina) en matrices farmacéuticas y alimentarias, utilizando las técnicas potenciodinámicas: voltamperometría cíclica y de onda cuadrada.

2. MARCO TEÓRICO

Vitaminas del complejo B

Las vitaminas componen un grupo de compuestos orgánicos que son, en cantidades relativamente pequeñas, esenciales para un funcionamiento adecuado del cuerpo humano. Tienen una gran variedad de características químicas y biológicas que se han estudiado desde su descubrimiento, el cual se ha dado, en la mayoría de los casos, cuando se estudiaban enfermedades causadas por la deficiencia de alguno de estos componentes. Se conocen trece vitaminas (cada una con sus vitámeros), que actúan como nutrimentos reguladores del metabolismo intermedio y que se encuentran de manera natural en los alimentos. Una de las clasificaciones de vitaminas más utilizadas es la dada por sus propiedades de solubilidad, dividiéndose en liposolubles e hidrosolubles. Las vitaminas liposolubles son las vitaminas: A, D, E y K. Las hidrosolubles están constituidas por la vitamina C y las que constituyen el denominado complejo B: tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), ácido pantoténico (B₅), piridoxina (B₆), ácido fólico (B₉) y cianocobalamina (B₁₂) (Ball, 2006).

La agrupación de las vitaminas del complejo B se relaciona a cuestiones históricas, pues según la American Chemical Society, Elmer McCollum (1879–1967), fue el primero en introducir la idea de un “factor A liposoluble” y un “factor B hidrosoluble”. Las posteriores investigaciones llevaron a la caracterización de cada una de las

vitaminas y sus correspondientes vitámeros. La clasificación de los nutrimentos por sus propiedades químicas no incluye a las vitaminas como un grupo; no obstante, las vitaminas del complejo B quedan agrupadas como bases nitrogenadas (Casanueva y Kaufer), por lo que esto podría ser la razón de que hayan sido denominadas en su conjunto como complejo B.

Vitamina B₆

Vitamina B₆ es el nombre genérico que se da a tres compuestos químicos y a algunos de sus derivados: piridoxina (PN), piridoxal (PL) y piridoxamina (PM). Estos compuestos pueden fosforilarse en su posición 5 (Coburn, 1996), y la prevalencia de alguno de ellos depende de la vía metabólica considerada, siendo el PL el que más actividad tiene como cofactor (Percudani y Peracchi, 2009). Los ésteres fosfato correspondientes de piridoxina, piridoxal y piridoxamina se denominan PNP, PLP y PMP, respectivamente. En la Figura 1 se muestra la estructura de los vitámeros de B₆.

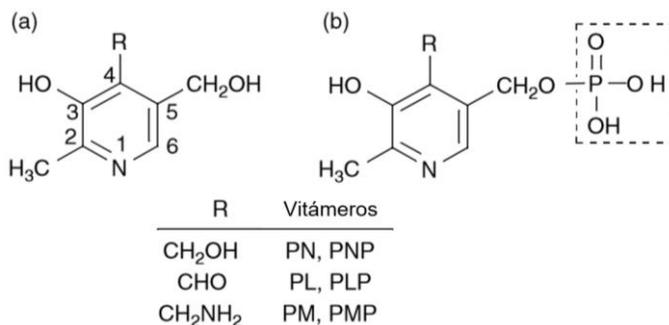


Figura 1. Estructuras de los compuestos de vitamina B₆. (a) Formas no fosforilada y (b) Formas fosforiladas (Ball, 2008).

Esta vitamina no es sintetizada por el humano, pero su ingesta se obtiene de alimentos como leche, carne, frutas y vegetales. La única forma de esta vitamina que se emplea para suplementar productos alimenticios es piridoxina, debido a su menor reactividad. No obstante, la ingesta de esta vitamina en dosis elevadas puede resultar en padecimientos neurológicos tales como ataxia (Tova Navarra, 2004) En la Tabla 1 se presentan valores de ingesta diaria recomendada de vitamina B₆ para algunos grupos de personas.

En disolución acuosa, la vitamina B₆ puede existir en una gran variedad de formas, dependiendo si se encuentra en su forma de alcohol, aldehído o amina. En el caso de la primera, la piridoxina, pueden presentarse, principalmente, las formas catiónica, neutra y aniónica, pues tiene reportados dos valores de pKa iguales a 5 y 9 (dos Santos et al, 2010). Los trabajos de Saidi y Warthesen y de Shephard y Labadarios han permitido establecer que la piridoxina tiene una mayor estabilidad en disolución frente a condiciones tales como temperatura de almacenamiento y pH que el piridoxal y la piridoxamina.

Tabla 1. Ingesta diaria recomendada de vitamina B₆ por grupo (FAO/WHO, 2004).

Grupo	Ingesta recomendada (mg/día)
0 – 6 meses	0.1
1 – 3 años	0.5

7 – 9 años	1.0
Mujeres 10–18 años	1.2
Hombres 10–18 años	1.3
Mujeres 19-50 años	1.3
Hombres 19-50 años	1.3
Mujeres 51 + años	1.5
Hombres 51 + años	1.7

Vitamina B₁₂

Los compuestos de la vitamina B₁₂ pertenecen al grupo de los corrinoides, que presentan un sistema cíclico de tipo tetrapirrol, con un átomo de cobalto en el centro (Guggisberg, Risse, & Hadorn, 2012). Según la nutrición y la farmacología, B₁₂ es el nombre genérico que reciben las cobalaminas que presentan actividad contra la anemia perniciosa. Algunas de las formas en las que se presenta esta vitamina son: cianocobalamina, adenosilcobalamina, metilcobalamina, e hidroxocobalamina (Heudi, Kiliñç, Fontannaz, & Marley, 2006). La estructura de estos vitámeros se muestra en la Figura 2. Todos actúan como coenzimas en varias reacciones biosintéticas a través de su conversión enzimática a metil y adenosilcobalamina, los compuestos con actividad metabólica. Se sabe que las formas reducidas están involucradas en transferencia de metilos en sistemas biológicos.

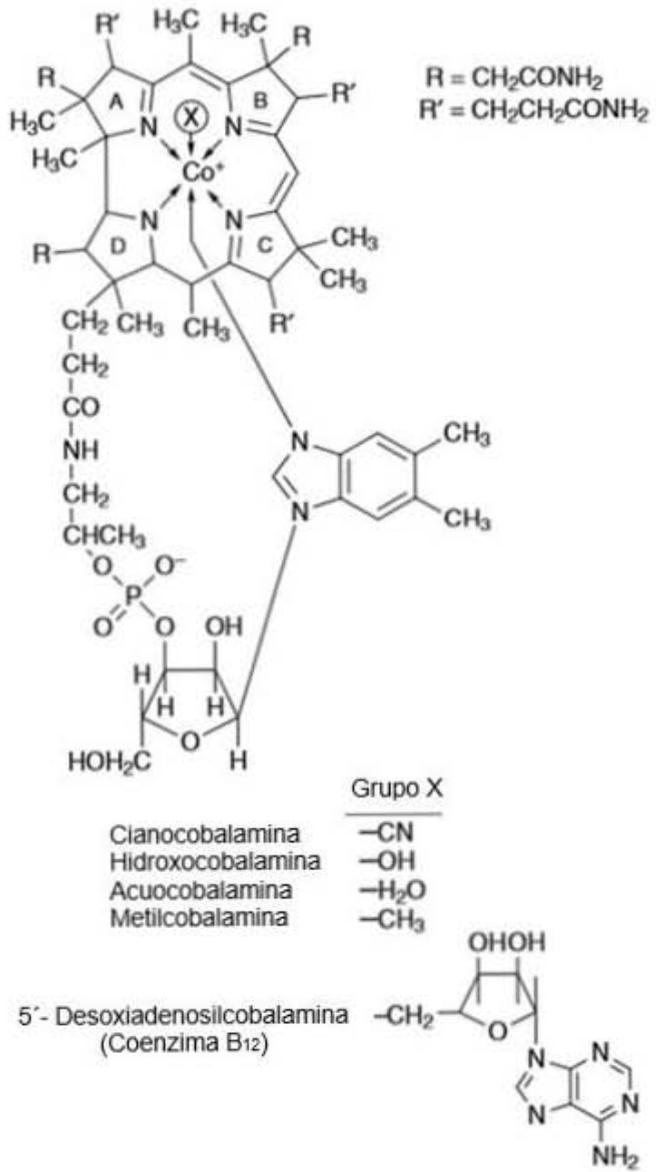


Figura 2. Estructuras de los compuestos de vitamina B₁₂ (Ball, 2008).

La cianocobalamina es la forma sintética de la vitamina B₁₂ empleada para preparados farmacéuticos, suplementos y alimentos fortificados. Las disoluciones acuosas de esta sustancia son estables a temperatura ambiente si se resguardan de la luz. Su degradación depende de la presencia de otras sustancias y vitaminas, tales como agentes oxidantes o reductores, ácido ascórbico y sales de hierro(II). Al igual que la vitamina B₆, no es sintetizada por el humano y debe obtenerse de fuentes tales como la leche, el pescado o el huevo. En la Tabla 2 se observan valores de ingesta diaria recomendada para algunos grupos de personas.

Tabla 2. Ingesta diaria recomendada de vitamina B₁₂ por grupo (FAO/WHO, 2004)

Grupo	Ingesta recomendada (µg/día)
0 – 6	0.3
1 – 3 años	0.7
7 – 9 años	1.5
10–18 años	2.0
19-65 años	2.0
65 + años	2.0

Importancia nutrimental de las vitaminas

El hombre se ha visto en la necesidad de procesar sus alimentos para alargar su vida de anaquel, hacerlos más estables, inocuos y atractivos. Sin embargo, a pesar de los múltiples beneficios que esto

conlleva, el procesamiento también puede ser perjudicial al afectar la calidad nutrimental de los productos alimenticios. La concentración de nutrimentos indispensables para el ser humano, tales como las vitaminas o algunos minerales, se modifica y disminuye por operaciones de molienda, enlatado, fermentación, extrusión, procesamiento térmico, entre otras (Reddy y Love, 1999). Por tanto, estas técnicas implican una pérdida de nutrimentos sumada a la ya de por sí pequeña cantidad en la que se encuentran en comparación a los principales componentes como las proteínas o hidratos de carbono. En la Tabla 3 se muestran algunos de los efectos que las técnicas de conservación ocasionan sobre diversas vitaminas.

Tabla 3. Efecto de las técnicas de conservación sobre el contenido de vitaminas hidrosolubles de los alimentos (Casanueva, 2008).

TÉCNICA	EFEECTO	VITAMINA AFECTADA (PORCENTAJE DE DESTRUCCIÓN)
Pasteurización	Remueve el oxígeno e inactiva las enzimas por efecto térmico	Tiamina (10-15 %) Riboflavina, niacina, piridoxina y ácido pantoténico (1-5 %)
Enlatado	Elimina el oxígeno	Vitamina C (10 % después de dos años)
Congelación	Inhibe la acción enzimática	Vitamina C (25 %)
Radiación gama	Inhibe la acción enzimática	Pérdidas mínimas de vitamina C y tiamina

A lo anterior hay que sumarle las dietas pobres, en cuanto a calidad nutrimental se refiere, que diversos grupos de poblaciones tienen, principalmente en países en vías de desarrollo y en sectores de escasos recursos económicos (Warnick *et al*, 2004). Por todo ello, se ha optado por añadir este tipo de componentes lábiles a diversos productos alimenticios, que van desde alimentos como cereales para el desayuno o bebidas, hasta los denominados suplementos alimenticios.

Importancia de su cuantificación

Dicho lo anterior, es imperativo contar con metodologías analíticas que permitan cuantificar sustancias de interés nutrimental, por tratarse de nutrimentos indispensables, como las vitaminas, con el fin de determinar la calidad de un producto o suplemento alimenticio.

Desafortunadamente, en México no existen metodologías oficiales que permitan cuantificar de manera rápida y sensible algunas de las vitaminas como las B₆ y B₁₂. Esta última cuenta con un único método establecido en la norma oficial mexicana NOM-131-SSA1-1995 “Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales”, el cual es microbiológico y requiere de hasta más de 24 horas para llevarse a cabo con el uso de numerosos reactivos.

La importancia de contar con metodologías confiables que permitan conocer la cantidad de estas vitaminas en preparados farmacéuticos, alimentos y suplementos alimenticios, viene dada por su ya mencionada característica de nutrimentos indispensables en la dieta del humano. Dependiendo de su estado fisiológico, un individuo necesita ingerir una cierta cantidad de nutrimentos, que varía con la edad y sexo, entre otros factores; por tanto, es importante que los alimentos o productos que consuma cuenten con información veraz en cuanto a su contenido en dichas sustancias.

Por otro lado, existen casos en los que las personas cuya ingesta de vitaminas requiere ser elevada por presentar alguna deficiencia, por ejemplo, consumen preparados farmacéuticos o suplementos alimenticios libremente y en exceso, pues la falta de regulación legislativa lo permite. Otros factores, como las costumbres o hábitos de alimentación, determinan la necesidad de consumir este tipo de productos. Tal es el caso de las personas que por su alimentación no obtienen la cantidad suficiente de nutrimentos, como los vegetarianos. Otro ejemplo es el de los individuos que practican deportes como el fisicoculturismo, que tienden a consumir suplementos que en ocasiones son innecesarios. Por tanto, es de suma importancia evaluar los diferentes preparados y productos que están en el mercado, para precisar si las especificaciones que reportan a los consumidores son verdaderas e informarlos sobre las cantidades de nutrimentos que ingieren con ellos.

Métodos de cuantificación de vitamina B₆

I. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11^a Edición

Valoración. *MGA 0241, CLAR.*

En este método se usa cromatografía de líquidos de alta eficiencia, empleando ácido p-hidroxibenzoico como patrón interno y como fase móvil una disolución de 1 – hexanosulfonato de sodio en ácido acético glacial. La columna a utilizar es de octadecil silano ligado químicamente a partículas de sílice porosa o a micropartículas cerámicas de 1,5 a 10 μm de diámetro.

Valoración. *MGA 0361.*

Este método hace uso de la espectrofotometría UV, pues se hace la determinación del contenido de clorhidrato de piridoxina al leer las absorbancias de las preparaciones de referencia y de la muestra a 291 nm en celdas de 1 cm, usando ácido clorhídrico 0.1 N como blanco de ajuste.

II. Farmacopea Europea

Se realiza una valoración de la muestra en un medio de anhídrido acético, en presencia de ácido fórmico. El titulante empleado es ácido perclórico y se utiliza un blanco en las mismas condiciones.

Métodos de cuantificación de vitamina B₁₂

I. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11^a Edición

Valoración. MGA 0361

Esta metodología implica el uso de la espectrofotometría UV-visible. La cuantificación del contenido de cianocobalamina se lleva a cabo con los valores de absorbancia de las disoluciones de referencia y de la muestra a 361 nm en celdas de 1 cm, usando agua como blanco de ajuste.

II. Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012

Este método permite cuantificar cianocobalamina utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina, relacionando directamente el crecimiento celular con la concentración de cianocobalamina presente. Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial libre de cianocobalamina. El crecimiento celular se mide turbidimétricamente, y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra.

Los métodos descritos, como el microbiológico y los que involucran HPLC, tienen el inconveniente de ser, relativamente, caros y tener un tiempo de análisis largo. Por otro lado, los métodos espectroscópicos son de utilidad solo para muestras en donde la vitamina en cuestión es el único componente o principio activo.

A continuación, se explica el fundamento de las técnicas electroquímicas empleadas, ambas pertenecientes al grupo denominado voltamperometría.

Voltamperometría

La voltamperometría es un conjunto de métodos electroanalíticos en los que se aplica una señal de excitación de potencial variable a un electrodo de trabajo en una celda electroquímica. La respuesta mensurable es en forma de corriente característica. La celda electroquímica está constituida por tres electrodos sumergidos en una disolución que contiene al analito de interés y un electrolito inerte relativamente concentrado. Uno de los tres electrodos es el de trabajo, cuyo potencial se hace variar con el tiempo, y sus dimensiones se minimizan para incrementar su tendencia a ser polarizado. El segundo electrodo es uno de referencia, cuyo potencial permanece constante durante todo el experimento. El tercero es un contraelectrodo que simplemente conduce la electricidad desde la fuente de la señal, a través de la disolución, hasta el electrodo de trabajo.

Voltamperometría cíclica (CV)

La voltamperometría cíclica es la técnica más usada para obtener información cualitativa de reacciones electroquímicas. Es de enorme interés en la investigación de la termodinámica y procesos redox por su habilidad para proporcionar información de este tipo, así como de la cinética de reacciones de transferencia de electrones heterogéneas

y sobre reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción. La voltamperometría cíclica ofrece una rápida localización de los potenciales redox de las especies electroactivas y otorga información sobre el efecto del medio en el proceso de óxido-reducción. Esta técnica potenciodinámica consiste en imponer un barrido de potencial lineal en un electrodo de trabajo estacionario, usando una señal de potencial aplicado en función del tiempo, $E = f(t)$, de forma triangular y repetido un número n de ciclos que varían según la información que se busque del sistema. Los valores de potencial donde la pendiente de la función $E = f(t)$ cambia de signo reciben el nombre de potenciales de inversión. La corriente resultante a lo largo de la perturbación es medida por el potenciostato para obtener una función $i = f(E)$ dependiente de parámetros físicos y químicos, cuya representación gráfica es llamado voltamperograma cíclico. La Figura 3 muestra la señal de perturbación característica $E = f(t)$ en la CV.

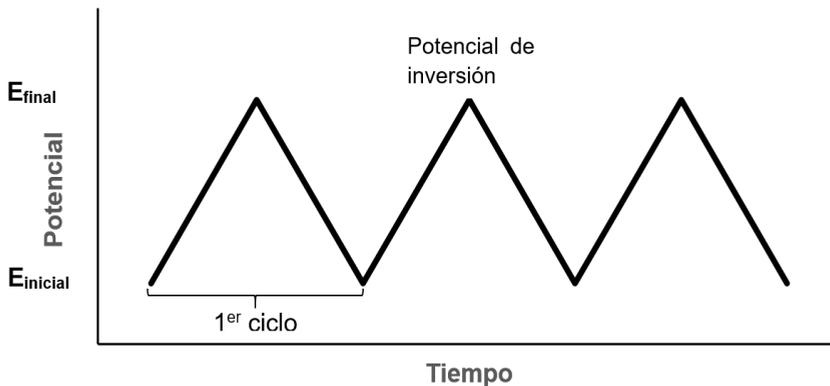


Figura 3. Señal de excitación potencial-tiempo en un experimento de voltamperometría cíclica. Barrido de E en forma triangular con dos potenciales de inversión, repetido un número n de ciclos.

Voltamperometría de onda cuadrada (SWV)

La voltamperometría de onda cuadrada es una técnica poderosa para determinaciones analíticas y cinéticas. Su origen se remonta a los estudios de Mirko Kalousek y Geoffrey Barker. De acuerdo a Mirceski, Komorsky-Lovric y Lovric (2007), actualmente la técnica se basa en la combinación de una señal de potencial en función del tiempo de forma escalonada con una en forma de onda cuadrada. La señal de perturbación se puede ver como una serie de pulsos de potencial que va, en cada ciclo, de valores mayores a menores. La magnitud de cada pulso de potencial es la mitad de la amplitud de la señal de onda cuadrada y la duración de cada pulso es la mitad del periodo de un escalón. El incremento de potencial, ΔE , es la altura de escalón. La corriente es medida durante los últimos microsegundos de cada pulso y la diferencia entre la corriente medida en dos pulsos sucesivos del mismo escalón es registrada como la respuesta neta. Las corrientes resultantes son graficadas en función del potencial asociado a la onda cuadrada. La Figura 4 ilustra la señal de perturbación característica $E = f(t)$ en la SWV.

Una de las ventajas de esta técnica, es que presenta dos curvas $i = f(E)$, es decir, la corriente de ida y la de reversa, por lo que ambas pueden restarse o sumarse para mejorar parámetros tales como límites de detección y cuantificación, además de que discrimina la corriente capacitiva.

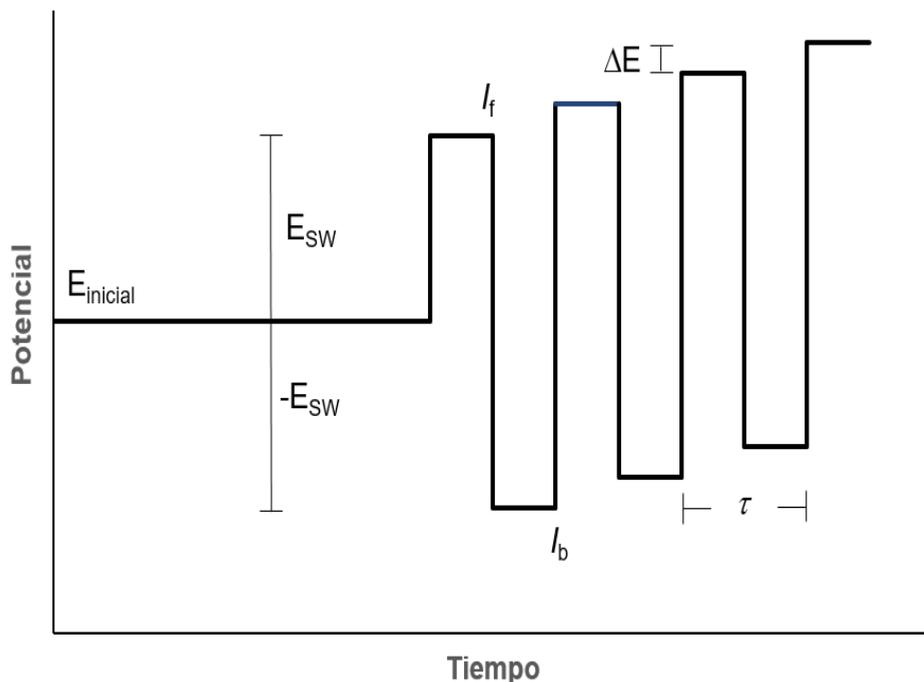


Figura 4. Esquema de la señal de excitación en SWV. E_{inicial} potencial de inicio, E_{SW} altura del pulso, ΔE incremento de potencial, τ periodo de escalón, I_f y I_b son los puntos donde son muestreadas las corrientes de ida y reversa, respectivamente (Mirceski, Komorsky-Lovric y Lovric, 2007).

Técnicas electroquímicas para el análisis de alimentos

Uno de los primeros trabajos que reporta el uso de técnicas electroquímicas en el análisis de sustancias en alimentos fue publicado por Fogg y Yoo (1979). Dicho trabajo describe la metodología para la determinación de tartrazina, verde S y amarillo No. 6 en bebidas, a través de polarografía de pulsos diferencial (DPP). La determinación simultánea de colorantes en jugos también se ha

realizado (Ni, Y., Bai, J., and Jin, L, 1996). Se presentan algunos ejemplos de técnicas electroquímicas para la determinación de colorantes en la Tabla 4.

Tabla 4. Algunos métodos y electrodos empleados en determinaciones voltamperométricas de colorantes en alimentos (Gulaboski y Pereira, 2008).

Colorante	Método	Electrodo	Muestra
Rojo allura AC	DPP	Hg	Dulces y bebidas
Carmín de índigo	CSV	HMDE	Dulces y jugos
Amarillo de quinoleína	CSV	HMDE	Bebidas
Tartrazina	AdSV	HMDE	Bebidas
Eritrosina	CSV	HMDE	Bebidas

También se han empleado técnicas electroquímicas para la determinación de metales como contaminantes (Tabla 5). Procedimientos para detectar y cuantificar metales que forman amalgamas con mercurio como Pb, Zn, Cu, Cd, Sb y Tl. Otra técnica como CSV permite determinar Al, Cr, Co, Fe, Ni, Ti, o U. En la Tabla 5 se observan algunos métodos y electrodos usados para la determinación de cationes metálicos.

Tabla 5. Algunos métodos y electrodos usados en la determinación voltamperométrica de metales en alimentos (Gulaboski y Pereira, 2008).

Metal	Tratamiento de muestra	Muestra	Método	Electrodo
Ni (II)	-	Vegetales enlatados	CadSV	HMDE
Hg (II)	-	Bebidas alcohólicas	ASV	Au
U (VI)	-	Azúcar	CSV	GCE
Se (VI)	Digestión	Riñones de cerdo	ASV	Au
Sn (IV)	-	Fruta enlatada	ASV	CGE
Cu (II)	-	Cerveza	ASV	GCE

Las técnicas voltamperométricas también se han utilizado en el análisis de herbicidas y plaguicidas, pues la mayoría de estos compuestos orgánicos son electroactivos, aunque algunos de ellos requieren de derivatización para su determinación. Hance (1970) fue uno de los primeros en investigar el comportamiento de herbicidas con polarografía, con la cual estudió 38 herbicidas con 5 electrolitos soporte, y de estos usó 16 para precisar sus límites de detección.

La capacidad de interacción que tienen muchas de las sustancias presentes en los alimentos con enzimas, por ejemplo, ha permitido el desarrollo de electrodos o biosensores selectivos a estas. Este es uno

de los principales campos de investigación actualmente. Dichos estudios permitirán otorgar dispositivos capaces de determinar un analito de interés en matrices relativamente complicadas sin comprometer su estructura y funcionalidad. Esto es de suma importancia, pues en el análisis de alimentos, a nivel docencia, investigación e industrial, se realizan prácticas inadecuadas en el uso de sensores. Un ejemplo evidente, es el uso del electrodo combinado de vidrio en matrices con alto contenido proteico o en medios sólidos.

3. METODOLOGÍA

Reactivos

Como electrolito soporte se usó un buffer de fosfatos de concentración igual a 100 mM, ajustado a $\text{pH} = 7.01 \pm 0.03$, disolviendo las cantidades apropiadas de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 y aforando a 100 mL, preparándose nuevas disoluciones cada semana. El electrolito soporte se guardó a temperatura ambiente.

Para preparar las disoluciones estándar de piridoxina (PN) y cianocobalamina (CM) de concentración igual a 10 mM, se disolvieron las cantidades necesarias de cada una en el electrolito soporte y se llevaron a un volumen de 5 mL, para el caso de PN, y 1 mL para CM. Se prepararon nuevas disoluciones todos los días para evitar errores en las determinaciones, debido a la degradación de las vitaminas.

Instrumentación

El electrodo de trabajo y el electrodo de referencia empleados fueron marca CHinstruments. El electrodo de trabajo fue de carbono vítreo. El electrodo de referencia consistió en un electrodo de Ag/AgCl. El contraelectrodo fue una barra de grafito. Se usó un potenciostato marca Palm Sens, el cual se vinculó con una computadora personal para realizar los análisis con el programa PSTrace. El agua destilada y desionizada se obtuvo de un equipo PURELAB Ultra de ELGA. Las determinaciones de pH se realizaron con un pHmetro marca Thermo SCIENTIFIC. Se usó una balanza semi microanalítica marca METTLER TOLEDO. Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizó un espectrómetro marca Agilent Technologies, vinculado a una computadora de escritorio mediante el programa UV-Vis ChemStation Software.

Preparación del electrodo modificado (MWCNT)

Para modificar el electrodo de carbono vítreo, se empleó una suspensión de nanotubos de carbono, la cual se preparó adicionando 2 mg de nanotubos en 5 mL de tolueno y aplicando sonicación durante 15 minutos. Se tomaron 20 μL de esta suspensión y se colocaron en la superficie del electrodo de carbono vítreo, previamente limpiado con alúmina de 0.05 micras, y enjuagado con agua destilada y desionizada. El electrodo se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos hasta que el disolvente se evaporara y se formara la capa de nanotubos.

Preparación de muestras

Para la cuantificación de las vitaminas en la muestra comercial de Tiaminal B₁₂ Trivalente A.P., se pesó el contenido de 15 cápsulas para determinar la masa promedio del contenido de una de ellas. Una vez pesada la muestra, se colocó en 20 mL del ES y se mantuvo en agitación durante 45 minutos. Para la cuantificación de CM, la muestra se llevó a un volumen final de 25 mL. En el caso de la determinación de PN, se realizó la dilución necesaria para obtener una concentración que estuviera en el intervalo de concentraciones empleado.

En la determinación de PN en la muestra comercial de Piridox de GNC, se pesó el contenido de 40 pastillas y se trituraron en un mortero de porcelana. Se pesó la masa equivalente a una pasilla y se colocó en 200 mL del electrolito soporte, llevando a agitación durante 45 minutos. La muestra se llevó a un volumen final de 250 mL con el ES. Finalmente, se realizó la dilución pertinente para obtener una concentración dentro del intervalo de la curva de calibración. Se realizó el mismo procedimiento para la determinación espectrofotométrica de PN.

Para la muestra de Boing, se tomó 1 mL de la bebida y se llevó a un volumen final de 10 mL con el ES, adicionando volúmenes crecientes de la disolución estándar de PN para llevar a cabo el método de adiciones estándar.

Determinaciones electroquímicas

El comportamiento electroquímico de las vitaminas B₆ y B₁₂ fue estudiado por voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV). Para llevar a cabo los voltamperogramas de PN se usaron barridos de 0 a 1.5 V. Para la CM se emplearon barridos de 0 a -1.6 V. Siempre que se hicieron determinaciones de CM, en disoluciones estándar o en muestra, se requirió burbujear nitrógeno para eliminar la señal de reducción de oxígeno, que se traslapa con la señal de reducción correspondiente a CM. Cuando se requirió la detección simultánea de PN y CM en un solo voltamperograma, se empleó voltamperometría cíclica con potencial de inicio igual a 0 V, barriendo a -1.4 V y posteriormente a 1.3 V, burbujeadando nitrógeno. Para medir las corrientes de pico se usó el programa PSTrace con la opción de línea base no lineal, para establecer la línea base con polinomios de tercer a quinto grado.

En todos los experimentos se utilizó una celda con una capacidad de 10 mL y se colocaron 5 mL de las disoluciones estándar y de las muestras comerciales, según correspondiera.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento electroquímico de la vitamina B₆

Se llevaron a cabo diferentes barridos de potencial con voltamperometría cíclica para determinar el comportamiento electroquímico de la piridoxina en el electrodo de carbono vítreo. La Figura 5 muestra dos voltamperogramas cíclicos obtenidos para esta sustancia con diferentes potenciales de inversión. De acuerdo a ellos, se corrobora la ausencia de una señal de reducción para piridoxina, indicando que la reacción al electrodo es irreversible (Zhang y Wang, 2011). El intervalo de barrido de potencial elegido para llevar a cabo tanto voltamperometría cíclica como de onda cuadrada fue, generalmente, desde 0 a 1.5 V.

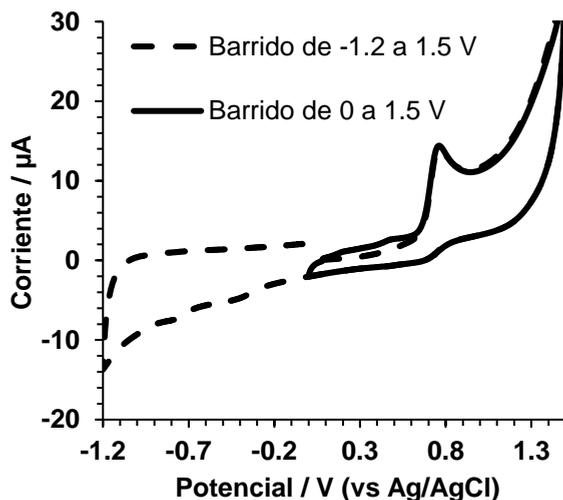


Figura 5. Voltamperogramas cíclicos para PN 500 μM en PBS 100 mM, con burbujeo de nitrógeno. E de escalón = 2 mV, velocidad de barrido = 100 mV s⁻¹.

La Figura 6 muestra los voltamperogramas de onda cuadrada, muestreando la corriente de ida, de PN a diferentes concentraciones. Se observó que la corriente de pico de oxidación de PN aumenta proporcionalmente con la concentración.

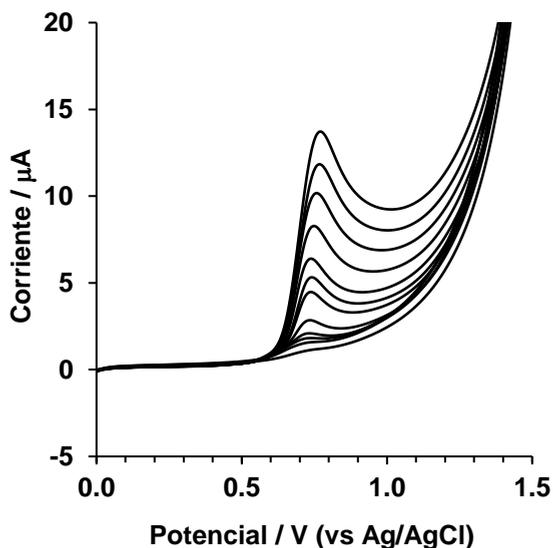


Figura 6. Voltamperograma de onda cuadrada (corriente de ida) para PN en concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 y 80 μM ; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 10 Hz.

En la Figura 7 se presentan los voltamperogramas cíclicos para diferentes concentraciones de PN. Al igual que en el caso de la SWV, la corriente de pico aumenta proporcionalmente con la concentración de PN. En las dos técnicas se presenta la señal de su oxidación de PN en 770 mV vs Ag/AgCl.

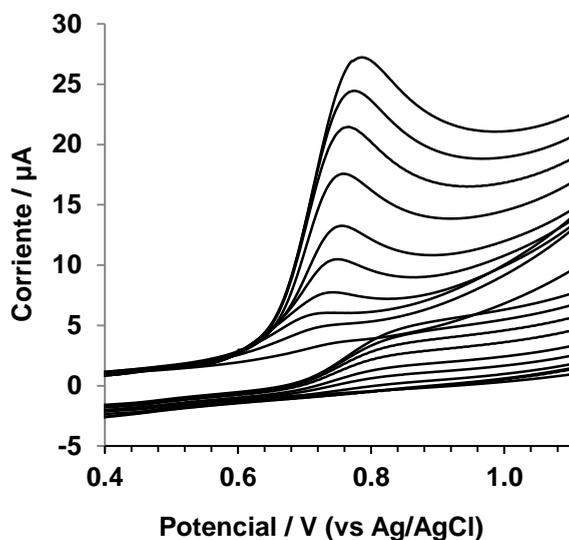


Figura 7. Voltamperograma cíclico para PN en concentraciones de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 μM . E de inversión 1 = 1.7 V, E de inversión 2 = 0 V, E de escalón = 2 mV, velocidad de barrido = 100 mV s^{-1} .

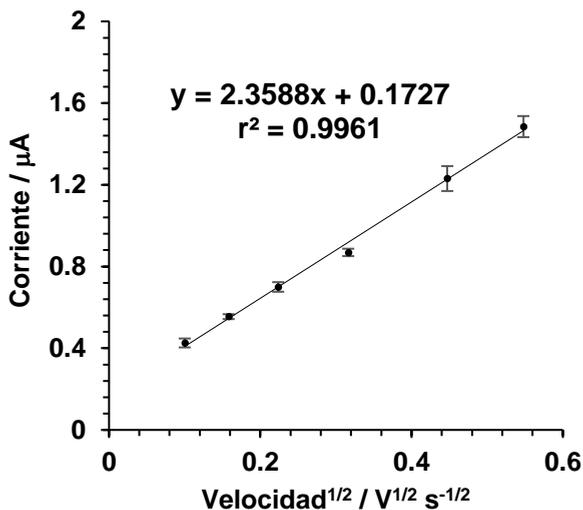


Figura 8. Variación de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en CV, para PN 50 μM en ET de carbono vítreo. E de inversión 1 = 1.7 V, E de inversión 2 = 0 V, E de escalón = 2 mV.

La variación de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en CV, indica que la reacción de oxidación de PN al electrodo está controlada por difusión (Figura 8).

El mecanismo de electrooxidación de PN se ha estudiado y se sabe que puede involucrar reacciones de transferencia de electrones complejas. Se ha concluido que dicho mecanismo es dependiente de las condiciones experimentales, específicamente del valor de pH, debido a la compleja distribución de especies resultado de los equilibrios ácido-base de PN. Se ha propuesto un mecanismo que involucra la oxidación de piridoxina a piridoxal y una posterior oxidación a ácido piridóxico (Hernández et al, 2003).

Comportamiento electroquímico de la vitamina B₁₂

En la Figura 9 se muestra el voltamperograma cíclico para cianocobalamina en el electrodo de carbono vítreo, en el que se observa una señal en -0.88 V vs Ag/AgCl correspondiente, posiblemente, a una reacción de electroreducción cuasirreversible para el proceso Co(III)/Co(II) (Hernández et al, 2003). La corriente de pico varió lineal y proporcionalmente con la concentración de cianocobalamina, en voltamperometría cíclica y de onda cuadrada. Barridos de potencial más amplios permitieron observar una señal de intensidad de corriente menor en 80 mV con respecto al electrodo de referencia empleado.

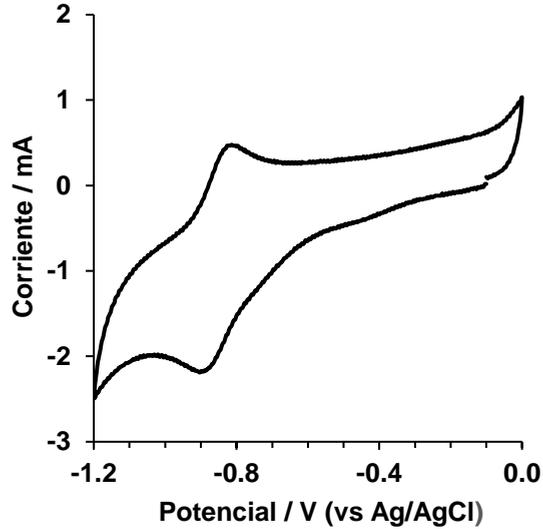


Figura 9. Voltamperograma cíclico para cianocobalamina, se observa señal de una electroreducción cuasireversible. E de inversión 1 = -1.2 V, E de inversión 2 = 0 V, E de escalón = 2 mV.

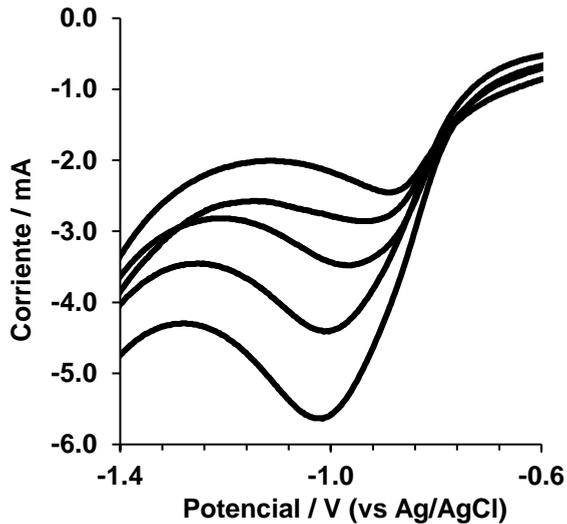


Figura 10. Voltamperogramas de onda cuadrada (i de ida) para cianocobalamina, a concentraciones de 50, 90, 130, 170 y 220 μM ; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

La corriente de pico, en CV y en SWV, varió de manera proporcional a la concentración de cianocobalamina (Figura 10). El proceso de electroreducción de la cianocobalamina, al igual que el de piridoxina, es dependiente del pH e involucra mecanismos de intercambio de electrones atribuidos al átomo de cobalto del anillo tetrapirrólico. De acuerdo a Hernández et al (2003), la corriente de pico obtenida para CM se ve menos afectada que la de PN con la variación de pH.

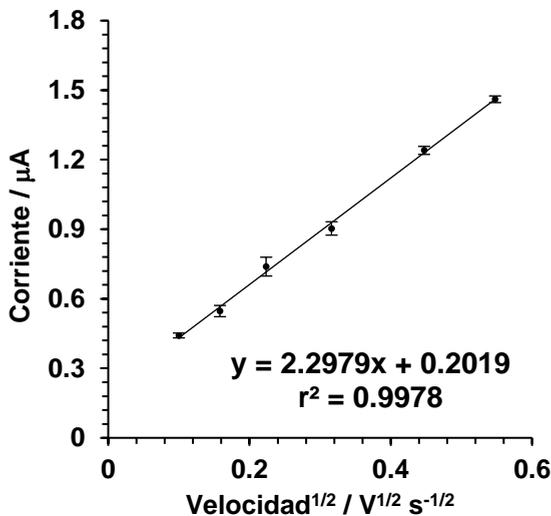


Figura 11. Variación de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en CV, para CM en ET de carbono vítreo. E de inversión 1 = 1.7 V, E de inversión 2 = 0 V, E de escalón = 2 mV.

Se observó que la reacción de reducción cuasirreversible de cianocobalamina está controlada por difusión, pues la corriente de

pico en CV varió linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 11).

Curvas de calibración para B₆ y B₁₂

Las Figuras 12 y 13 representan las curvas de calibración obtenidas para PN. Para la curva de la Figura 12, se tomó solo la corriente de ida de la voltamperometría de onda cuadrada. En el caso de la Figura 13, se realizó la suma de la corriente de ida y la de vuelta. El hecho de que la reacción al electrodo de la PN sea irreversible representa una ventaja, ya que la señal en la curva de ida es idéntica a la de vuelta (reverse) y se pueden sumar para obtener una señal con pico de corriente mayor. Ello implica mayor facilidad para resolver corrientes de pico a concentraciones alrededor de 10 μM .

En el caso de la cianocobalamina, las curvas patrón obtenidas con el ET de carbono vítreo muestran gran reproducibilidad al igual que las de PN (Figuras 14 y 15), con desviación estándar relativa menor al 5 %. Sin embargo, dado que el proceso de reducción de CM es cuasireversible, la señal correspondiente a la corriente de vuelta no se puede sumar a la de ida, por lo que no se puede implementar un ajuste para incrementar la corriente de pico como sucedió en el caso de PN.

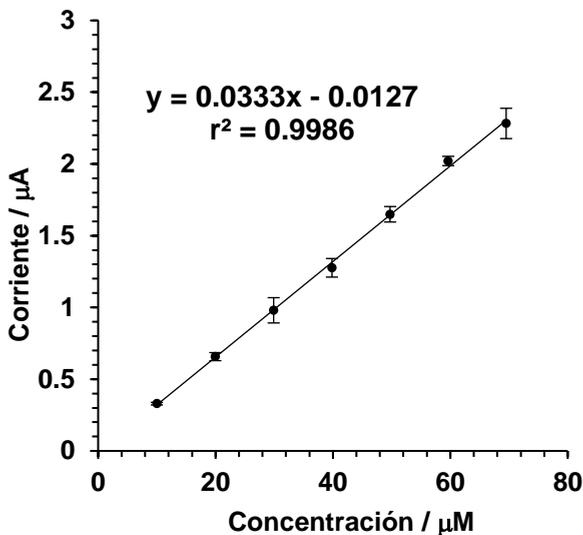


Figura 12. Curva patrón obtenida para PN con ET de carbono vítreo por SWV, muestrando solo corrientes de ida; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

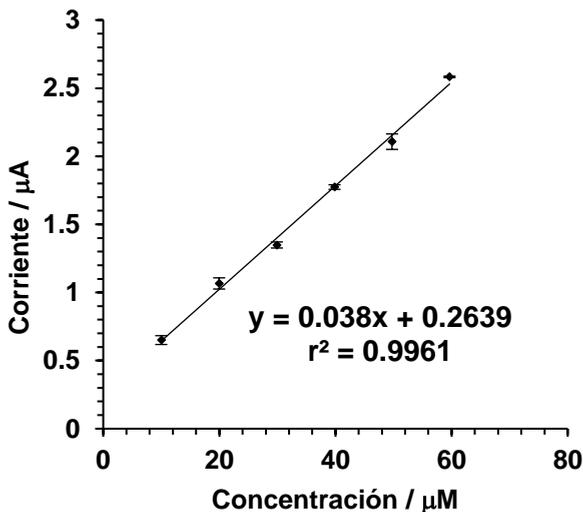


Figura 13. Curva patrón obtenida para PN con ET de carbono vítreo por SWV, sumando las señales de corriente de ida y vuelta; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

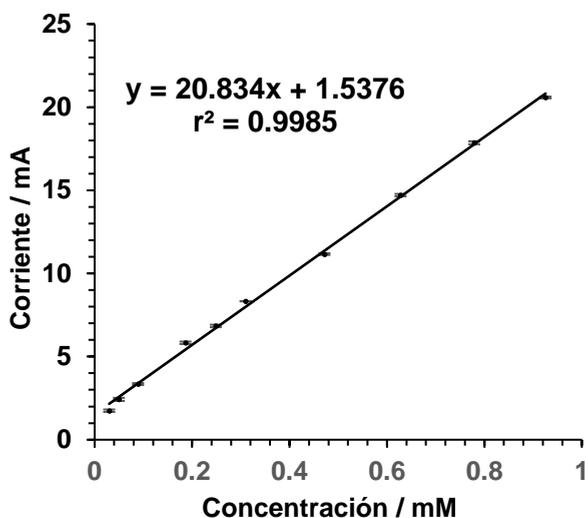


Figura 14. Curva de calibración de CM obtenida por voltamperometría cíclica, en PBS 100 mM.. E de inversión 1 = -1.2 V, E de inversión 2 = 0 V, E de escalón = 2 mV..

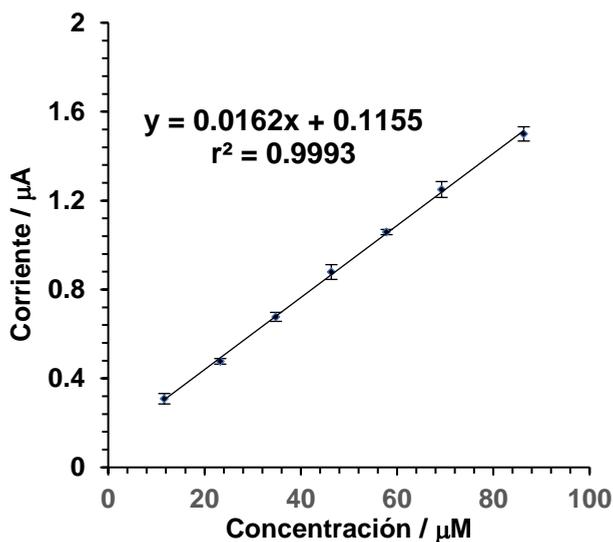


Figura 15. Curva patrón obtenida para CM con ET de carbono vítreo por SWV, muestreando solo corrientes de ida; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

Modificación de ET con nanotubos de carbono

Se llevó a cabo la modificación del electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono con la finalidad principal de incrementar la sensibilidad en la detección de piridoxina, lo que facilitaría su detección en matrices en las que se encuentre en muy pequeñas cantidades. En la Figura 16 se muestra el estudio de la variación de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica, determinando así que el proceso de oxidación se sigue llevando a cabo por difusión. Cabe señalar que este análisis se realizó sin limpiar o volver a modificar el electrodo entre lecturas.

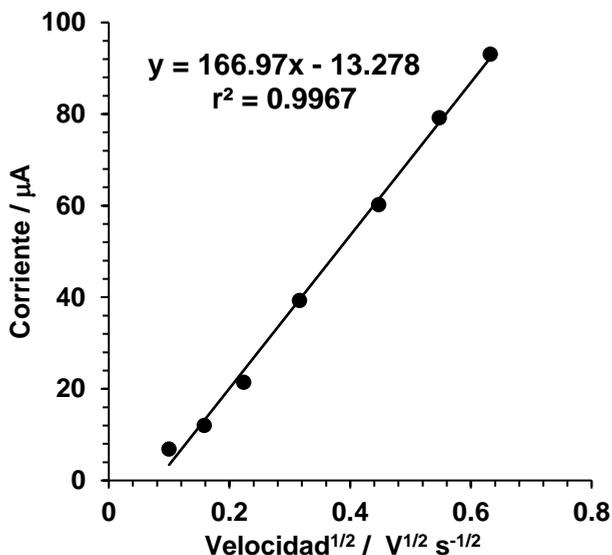


Figura 16. Variación de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en CV, para PN con ET de carbono vítreo modificado (MWCNT); en PBS 100 mM. E de inversión 1 = 1.7 V, E de inversión 2 = 0 V, E de escalón = 2 mV.

La Figura 17 ilustra la evolución de la corriente de pico con el tiempo para un solo electrodo modificado, manteniéndolo en la disolución durante todo el análisis. Se observa que, de manera general, la intensidad de la señal decrece conforme aumenta el tiempo, probablemente debido a un proceso de adsorción en los nanotubos de carbono.

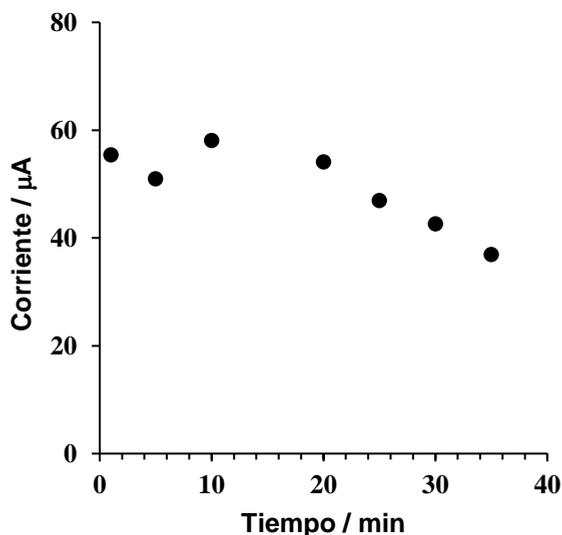


Figura 17. Corriente de pico para misma concentración ($60 \mu\text{M}$) de PN a diferentes tiempos de lectura una vez introducido el electrodo en la disolución, usando SW con ET modificado (MWCNT); en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

Posteriormente se trató de obtener curvas patrón con el electrodo modificado, tomando los voltamperogramas y sus repeticiones en el menor tiempo posible (agitación de 10 s, y lectura), para tener la menor desviación estándar posible. La señal de PN aumenta entre 4

y 10 veces (dependiendo del tipo de voltamperometría) en el electrodo modificado con respecto a la obtenida con el de carbono vítreo. Sin embargo, la variación de la señal con respecto al tiempo incrementa la desviación estándar hasta 20 veces, lo cual representa una desventaja en cuanto a la precisión del análisis.

Las Figuras 18 y 19 muestran las curvas patrón obtenidas para PN, empleando el electrodo modificado y sin limpieza entre lecturas. Dichas curvas y las barras de error expuestas en ellas hacen hincapié en el problema de variación de la señal con el tiempo. Por lo tanto, se optó por modificar el electrodo después de cada lectura, quedándose con un único dato de corriente por modificación, buscando determinar si esta técnica podría reducir la desviación estándar.

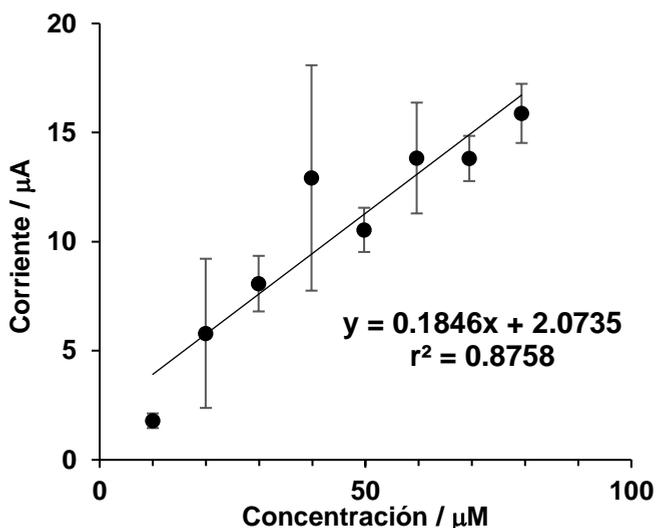


Figura 18. Curva patrón obtenida con ET modificado (MWCNT) por CV, sin limpiar o modificar entre lecturas; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5mV, frecuencia = 60 Hz.

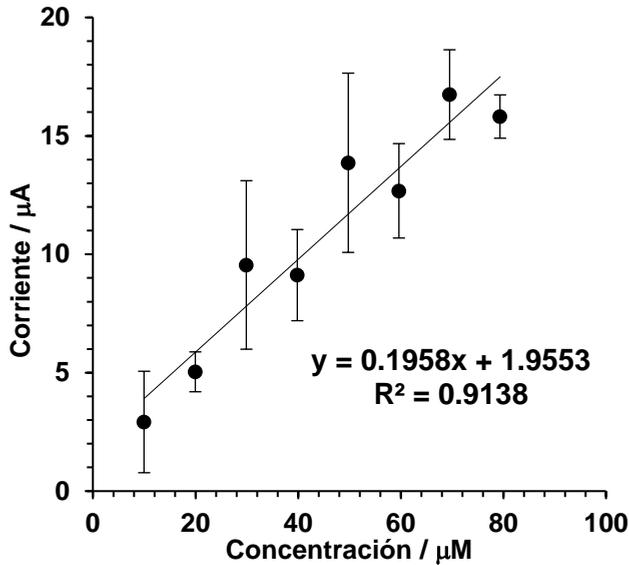


Figura 19. Curva patrón obtenida para PN con ET modificado (MWCNT) por SWV, sin limpiar o modificar entre lecturas; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 40mV, frecuencia = 60 Hz.

En la Figura 20 se ilustran los voltamperogramas de onda cuadrada para la técnica descrita anteriormente, es decir, cuando se modificó el electrodo después de cada lectura. A pesar de que la desviación estándar relativa disminuye, presenta valores de 15 %, por lo que este método tampoco es viable para mejorar la reproducibilidad y precisión del análisis. Además, realizar estudios mediante este método implica mayor tiempo de análisis, ya que se requiere dejar secar el disolvente de la suspensión de nanotubos de carbono en cada modificación, y a esto hay que agregarle la limpieza del electrodo entre lectura. Los 5

puntos mostrados en la Figura 20 tomaron poco más de una hora, por lo que la practicidad del método se ve reducida drásticamente.

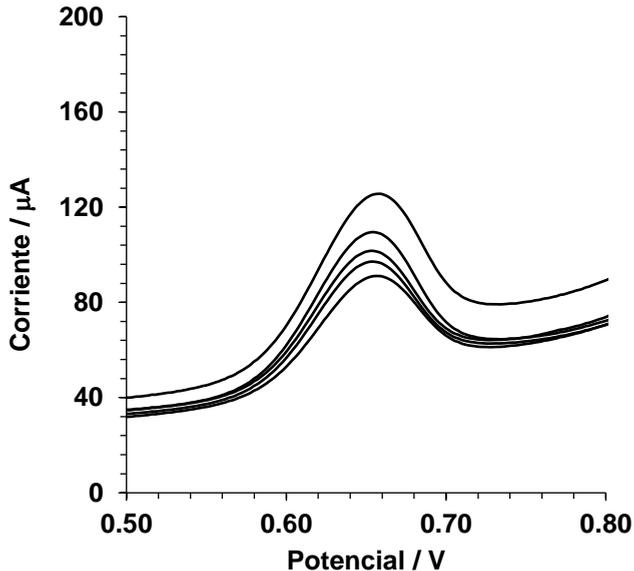


Figura 20. Voltamperogramas de onda cuadrada para misma concentración de PN ($60 \mu\text{M}$) en ET modificado, sin limpiar o modificar entre lecturas; en PBS 100 mM. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

En la Figura 21 se muestra una curva de calibración obtenida por el método en cuestión. A pesar de que se tiene el comportamiento lineal buscado y que la sensibilidad es tal que se pueden observar concentraciones menores a $10 \mu\text{M}$, la desviación estándar relativa es más del 15 % en la mayoría de los puntos. Se aprecian asimismo las barras de error que ilustran la variabilidad de la corriente de pico en un mismo punto.

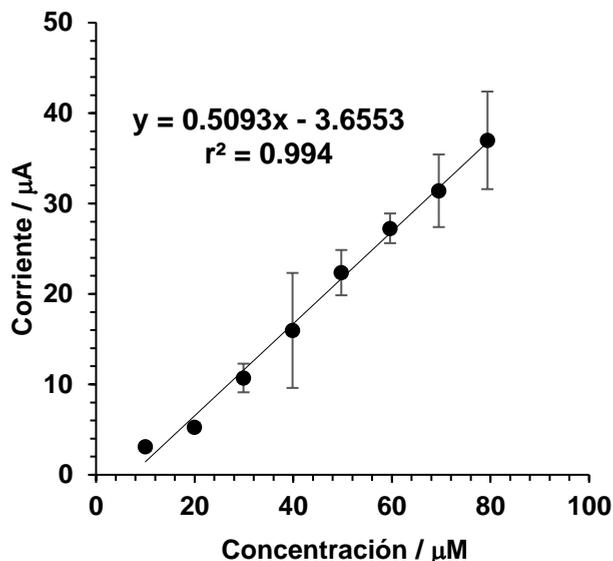


Figura 21. Curva patrón obtenida con ET modificado (MWCNT) por SWV, modificando entre lecturas. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

Dicho todo lo anterior, se concluyó que la modificación del electrodo con nanotubos de carbono, empleando las técnicas descritas, requiere de mayor investigación para lograr una variabilidad aceptable. Múltiples factores, como la cantidad de nanotubos que se colocan en la superficie del electrodo, que no es la misma en cada modificación, determinan que este electrodo modificado no tenga la precisión deseada. Algunos trabajos hablan sobre la aplicación de diferentes tratamientos al electrodo MWCNT para lograr respuestas similares. Por ejemplo, Babaei, Taheri y Mohammad Afrasiabi (2011) llevaron a cabo una limpieza cuidadosa de la superficie del electrodo modificada con nanotubos y, posteriormente, realizaron barridos de

potencial mediante voltamperometría cíclica para lograr respuestas estables, de acuerdo a su trabajo. Posiblemente se logren obtener mejores resultados con una modificación, por ejemplo, con nano partículas de oro o alguna otra. No obstante, esta investigación requiere de mayor cantidad de tiempo

Cuantificación en muestras comerciales

Dada la poca reproducibilidad del ET modificado con nanotubos de carbono, se decidió usar el electrodo de carbono vítreo, sin modificar, para realizar las curvas de calibración correspondientes, así como la posterior cuantificación de piridoxina y cianocobalamina en las muestras comerciales de preparados farmacéuticos y alimentos.

I. Tiaminal B12 Trivalente A.P.

Esta muestra comercial contiene piridoxina, cianocobalamina y tiamina. Antes de proceder a realizar la cuantificación de PN y CM en la muestra comercial, se determinó si la presencia de tiamina (vitamina B₁) interfería en la señal de alguna de las primeras. Los voltamperogramas cíclicos de la Figura 22 muestran que la tiamina no presentó señales de oxidación o reducción en el intervalo de potencial que se estudió a lo largo del presente trabajo (-1.4 a 1.4 V), por lo que la muestra comercial y la disolución estándar de PN y CM tienen un comportamiento electroquímico similar. No obstante, se sabe que la tiamina puede presentar señales de reducción, dependiendo el medio, a valores de potencial menores (Benítez, 1991). Ello sugiere que la cuantificación simultánea de las tres vitaminas, en las condiciones

necesarias, es viable. La ausencia de interferencia por parte de B₁ era esperada, debido al trabajo de Zhang y Wang, quienes precisaron que la vitamina B₂ (riboflavina), la C (ácido ascórbico), así como glucosa, no otorgan interferencia para la cuantificación de PN y CM.

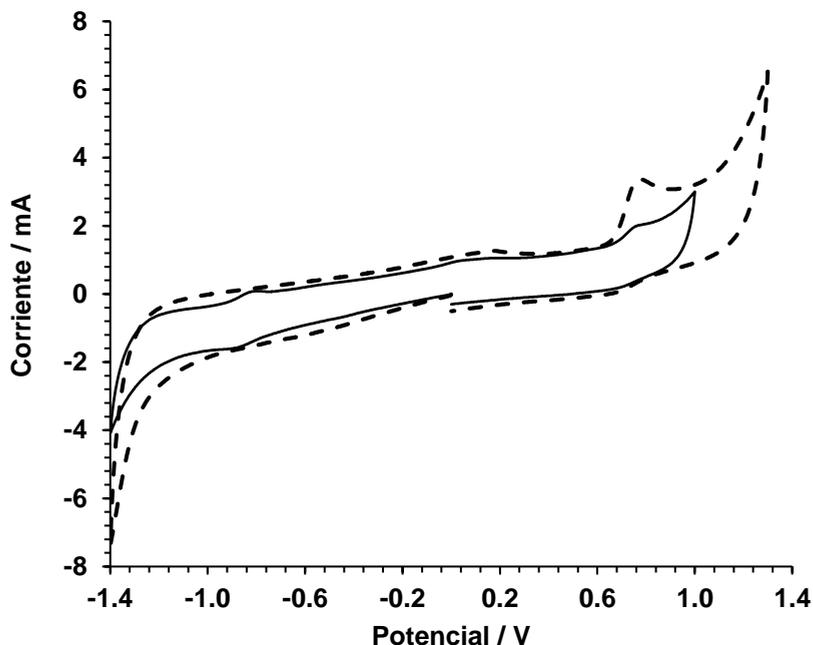


Figura 22. Voltamperogramas cíclicos para mezcla estándar de PN y CM (línea continua) y muestra comercial Tiaminal B12 Trivalente A.P. (línea fragmentada) diluida. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5mV, frecuencia = 60 Hz.

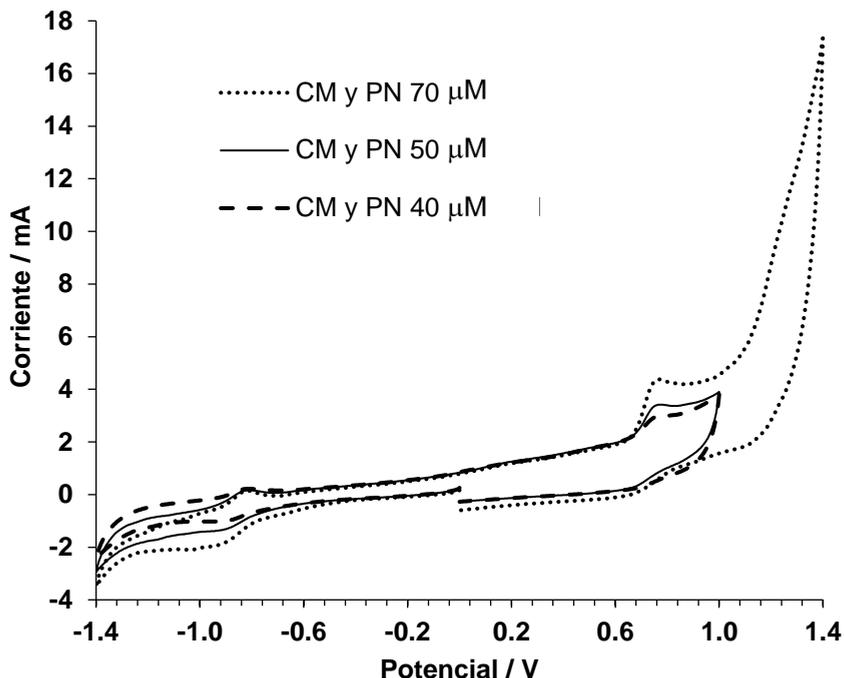


Figura 23. Voltamperogramas cíclicos para mezcla estándar de PN y CM de misma concentración: 40, 50 y 70 μM . E de escalón = 2 mV, amplitud = 5mV, frecuencia = 60 Hz.

Por otra parte, el estudio de la mezcla estándar de PN y CM con voltamperometría cíclica, mostrado en la Figura 23, sugiere que la cuantificación de ambas vitaminas puede realizarse con dicha técnica sin tener que realizar barridos de potencial por separado, como se hizo, por voltamperometría de onda cuadrada, y en el caso donde estas dos vitaminas se encuentren sin presencia de interferentes. Sin embargo, dado que en matrices alimentarias y farmacéuticas la

concentración de CM es mucho menor a la de PN, la señal de CM puede desaparecer al realizar las diluciones necesarias de la muestra para poder observar la señal de PN sin inconveniente. Para esta muestra, la señal de PN era muy grande con respecto a la de cianocobalamina debido a que su concentración, sin diluir, era cercana a la del electrolito soporte, por lo que al realizar la dilución pertinente la señal de CM prácticamente desapareció. Se optó entonces por cuantificar CM en la muestra sin diluir y empleando el método de curva patrón. Para precisar el contenido de PN, se realizó la dilución correspondiente y se usó el método de adiciones estándar.

En la Tabla 6 se muestran los resultados para la cuantificación de piridoxina y cianocobalamina en la muestra de Tiaminal B12 Trivalente A.P., obteniendo un porcentaje de analito cuantificado con respecto a la cantidad indicada por el fabricante del 94 y 87.6 %, respectivamente. Estos resultados sugieren que el método electroquímico empleado, con las condiciones ya descritas anteriormente, es viable para la determinación de PN y CM en muestras comerciales farmacéuticas.

Tabla 6. Resultados para la cuantificación de PN y CM en Tiaminal B12 Trivalente A.P.

Analito	Cantidad indicada por fabricante	Cantidad encontrada	DER (%)
CM	250 µg / tableta	219 µg / tableta	0.75
PN	50 mg / tableta	47 mg / tableta	1.73

II. Pyrydox GNC

Se cuantificó el contenido en piridoxina del suplemento Pyrydox de GNC por medio de voltamperometría de onda cuadrada y con espectrofotometría UV-visible, leyendo la absorbancia a 320 nm, longitud de onda de máxima absorción de la PN en las mismas condiciones de medio empleadas para la voltamperometría. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7, demostrando que la cantidad cuantificada como clorhidrato de piridoxina es muy similar en ambas metodologías. Cabe señalar que, en el método electroquímico no se requirió filtrar y separar a los excipientes de la muestra, a diferencia del método espectrofotométrico en donde su eliminación era necesaria para obtener valores de absorbancia razonables. Además, no se requiere de limpiar el ET de carbono vítreo entre determinaciones, es decir, se realizó la curva patrón y las mediciones de las muestras con y sin adición de estándar. Ello implica menor tiempo de análisis y representa una ventaja frente a metodologías más complejas que requieren de un tiempo de análisis relativamente largo.

Tabla 7. Resultados para la cuantificación de PN en Pyrydox GNC por el método propuesto y el espectrofotométrico.

Método	Cantidad indicada por fabricante (mg/tableta)	Cantidad encontrada (mg/tableta)	DER (%)
Electroquímico SWV	126	134.5	1.35
Espectrofotométrico	126	135.9	0.99

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de recuperación del método electroquímico para esta muestra. En la Figura 24 se muestran los voltamperogramas obtenidos por SWV para la muestra con y sin adición de estándar.

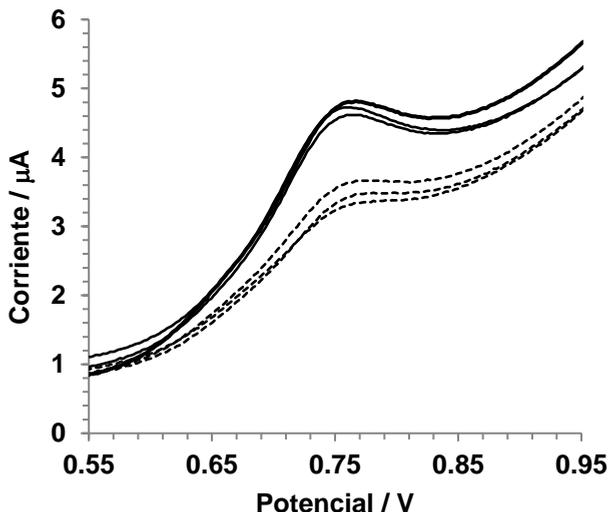


Figura 24. Voltamperogramas de onda cuadrada para determinar el recobro de PN en Pyrydox de GNC. Las curvas continuas corresponden a la muestra con adición de estándar y las curvas punteadas representan la muestra sin adición de estándar. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

El porcentaje de recuperación para la muestra fue de 110 %. Si bien no es el resultado ideal, se acerca a los valores que se consideran adecuados para este tipo de muestras y puede mejorar al realizar la validación completa y pertinente del método electroquímico.

III. Boing

Se determinó la concentración de PN en una muestra de Boing de manzana a través de un método de adiciones estándar. En la Figura 25 se observa cómo fue creciendo su señal característica de electrooxidación, alrededor de 0.79 V vs Ag/AgCl, con la adición de alícuotas de la disolución de estándar.

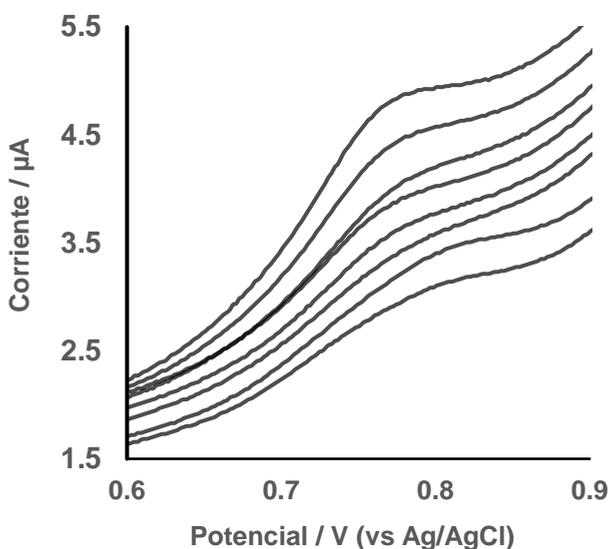


Figura 25. Voltamperogramas de onda cuadrada (corriente de ida) de muestra de Boing con dilución 1:10, por adiciones estándar de PN. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 26. La concentración de piridoxina encontrada fue igual a 129 μM , con una desviación estándar relativa de 1.8 %. (26.52 μg de vitamina por mililitro de jugo). Es muy probable que la señal descrita sea

efectivamente de piridoxina, puesto que esta matriz es relativamente sencilla ya que solo contiene, de acuerdo a la información nutrimental, 10 g de carbohidratos en 125 mL de producto, además de las vitaminas A, B₁ y C. Ya se mencionó anteriormente que la tiamina no proporciona interferencia en el método, además Zhang y Wang (2011) mencionan que, en presencia de glucosa y vitamina C, tampoco hay interferencia en la determinación de PN. Ello implica que, de haber interferencia para esta determinación, es muy probable que se deba a la presencia de vitamina A. Estudios comparativos empleando otras metodologías analíticas podrían ayudar de precisar lo anterior. No obstante, se puede hallar una manera de oxidar completamente a la PN que, se cree, hay en la muestra y realizar un blanco para el análisis.

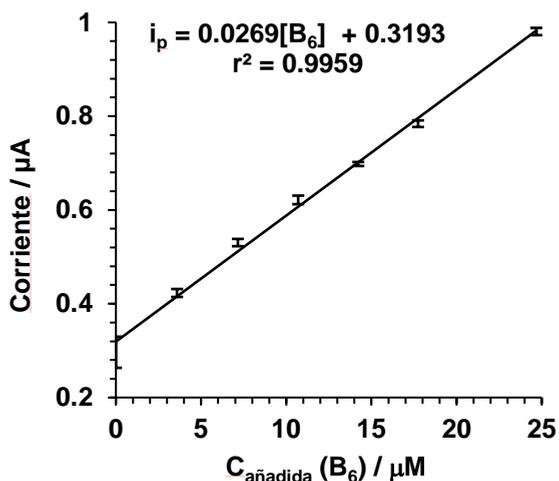


Figura 26. Curva de calibración obtenida por el método de adiciones estándar en muestra de Boing con dilución 1:10, por SWV. E de escalón = 2 mV, amplitud = 5 mV, frecuencia = 60 Hz.

Los resultados anteriores, correspondientes a las muestras comerciales, confirman que el método electroquímico propuesto en este trabajo es una alternativa a aquellos citados previamente. El procedimiento para realizar estos últimos requiere de tiempos de análisis mayores, pues los pasos a realizar o la instrumentación son de mayor complejidad (ver anexo). Por su parte, el método potenciodinámico incluso puede no llegar a requerir de la preparación de la muestra y la construcción del arreglo instrumental empleado solo necesita de 5 a 10 minutos. Los voltamperogramas de un punto, por triplicado, se obtienen en 2-3 minutos, por lo cual se pueden obtener curvas de calibración en menos de 30 minutos y un análisis completo de una muestra toma 1 hora. Además de ser relativamente barato, tiene la ventaja de que no se requiere personal altamente capacitado. En cuanto a la sensibilidad en la detección de vitamina B₆, el método electroquímico puede llegar a tener límites de detección comparables a los obtenidos por HPLC, e incluso puede llegar a ser más sensible que los métodos espectroscópicos (ver tabla 8 del anexo). Otra ventaja del método potenciodinámico, es que, como se mencionó, se puede realizar la determinación simultánea de las dos vitaminas estudiadas, algo que no se pudo realizar con el método espectrofotométrico, pues las bandas de las dos vitaminas se interfieren entre sí (Figuras 27 y 28).

5. CONCLUSIONES

Se logró cuantificar, de manera aceptable, el contenido en vitaminas B₆ y B₁₂ en diferentes muestras comerciales a través del método electroquímico propuesto en este trabajo. Mediante su comparación con un método espectroscópico, se asevera que es una alternativa adecuada, es decir, eficaz, de bajo costo, rápido y sencillo.

6. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos para el método permiten considerar que, mediante el tratamiento de muestra adecuado, es potencialmente aplicable en la determinación, no solo de vitaminas, sino de diferentes analitos electroactivos que son de interés nutrimental, permitiendo determinar la calidad de un producto alimenticio o farmacéutico en cuanto a estos componentes.

7. ANEXO

Métodos de cuantificación de vitamina B₆

I. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11^a Edición

Valoración. *MGA 0241, CLAR.*

Fase móvil. Mezclar en un matraz volumétrico de 2 L, 20 mL de ácido acético glacial, 1.2 g de 1 – hexanosulfonato de sodio y 1.4 L de agua. Ajustar el pH a 3 con ácido acético glacial o con disolución de hidróxido de sodio 1.0 N. Agregar 470 mL de metanol, diluir con agua a volumen, mezclar y filtrar a través de un filtro de 0.5 µm, desgasificar. Hacer los ajustes necesarios.

Preparación de patrón interno. Preparar una solución de ácido p-hidroxibenzoico con la fase móvil, que contenga 5 mg/mL.

Preparación de referencia. Pasar 50 mg de la SRef de clorhidrato de piridoxina, a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con la fase móvil y mezclar. De esta disolución pasar 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 1 mL de la preparación de patrón interno, diluir a volumen con la fase móvil y mezclar.

Preparación de la muestra. Pasar 50 mg de la muestra a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver, diluir a volumen con la fase móvil y mezclar. De esta disolución pasar 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 1 mL de preparación de patrón interno, diluir a volumen con la fase móvil y mezclar.

Condiciones del equipo. Detector UV a 280 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm que contenga empaque L1. Velocidad de flujo de 1.5 mL/min.

Procedimiento. Inyectar por separado, 20 µL de la preparación de la muestra. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos mayores. El tiempo de retención relativo para el clorhidrato de piridoxina es de 0.7 y para el ácido *p*-hidroxibenzoico es de 1. Calcular la cantidad de clorhidrato de piridoxina en la muestra tomada por la fórmula:

$$C_{B_6 \text{ en muestra}} = 1000 C \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right)$$

Donde:

C. Concentración en miligramos por mililitro de la SRef de clorhidrato de piridoxina en la preparación de referencia.

A_m . Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de la muestra.

A_{ref} . Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de referencia.

Valoración. MGA 0361.

Preparación concentrada de referencia. Pesar una cantidad de la SRef equivalente a 10 mg de clorhidrato de piridoxina, pasar a un

matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar al aforo con disolución de ácido clorhídrico 0.1 N, mezclar.

Preparación de referencia. Pasar una alícuota de 10 mL de la preparación concentrada de referencia a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con agua y mezclar. Esta disolución contiene 10 µg/mL de clorhidrato de piridoxina.

Preparación de la muestra. Pesar y triturar hasta polvo fino no menos de 20 tabletas. Pesar una cantidad de polvo equivalente a 20 mg de clorhidrato de piridoxina y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL. Adicionar 50 mL de ácido clorhídrico 0.1 N y calentar en baño de agua durante 15 min, agitando ocasionalmente. Enfriar y llevar al aforo con ácido clorhídrico 0.1 N. Filtrar descartando los primeros 20 mL del filtrado. Transferir 5 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al aforo con ácido clorhídrico 0.1 N.

Procedimiento. Leer las absorbancias de la preparación de la muestra y de la preparación de referencia a 291 nm en celdas de 1 cm usando ácido clorhídrico 0.1 N como blanco de ajuste. Calcular la cantidad de clorhidrato de piridoxina en la porción de muestra tomada por medio de la fórmula:

$$C_{B_6 \text{ en muestra}} = C D \frac{A_m}{A_{ref}}$$

Donde:

C. Concentración en miligramos por mililitro de la SRef de clorhidrato de piridoxina en la solución de referencia.

D. Factor de dilución de la muestra.

A_m . Absorbancia de la preparación de la muestra.

A_{ref} . Absorbancia de la preparación de referencia.

II. Farmacopea Europea

Realizar una valoración potenciométrica. Disolver 0.5 g en 5 mL de ácido fórmico anhidro. Adicionar 50 mL de anhídrido acético. Titular con ácido perclórico 0.1 M y correr un blanco bajo las mismas condiciones.

El cálculo se realiza siguiendo la equivalencia: 1 mL de ácido perclórico es equivalente a 20.56 mg de clorhidrato de piridoxina.

Métodos de cuantificación de vitamina B₁₂

I. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ª Edición

Valoración. *MGA 0361*

Preparación de la muestra. Disolver con agua 30 mg de la muestra en un matraz volumétrico de 1000 mL, llevar al aforo con agua y mezclar.

Preparación de la referencia. Disolver con agua una cantidad exactamente pesada de la SRef de cianocobalamina, diluir cuantitativamente con agua hasta obtener una disolución que contenga 30 µg/mL.

Procedimiento. Determinar las absorbancias de ambas disoluciones, en celdas de 1 cm a la longitud de máxima absorbancia de 361 nm, utilizando agua como blanco. Calcular la cantidad en miligramos de cianocobalamina en la muestra utilizada, por la fórmula:

$$C_{B_{12} \text{ en muestra}} = C (A_m/A_{ref})$$

Donde:

C. Concentración en microgramos por mililitro de la SRef de cianocobalamina en la preparación de referencia.

A_m. Absorbancia de la preparación de la muestra.

A_{ref}. Absorbancia de la preparación de referencia.

II. Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012

Para llevar a cabo este método, se requiere desarrollar el microorganismo en caldo Micro Inoculum, lo cual toma de dos a tres días. La preparación de la muestra requiere de cianuro de sodio y ácido clorhídrico. Asimismo, se requiere la preparación y estandarización de los medios de cultivo y de la disolución patrón,

además de otro periodo de 24 horas para la incubación. El contenido de vitamina B₁₂, expresado en µg/100 g de producto es igual a:

$$\text{Vitamina B}_{12, \mu\text{g}/100\text{ g}} = \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

En donde:

C. Media de las concentraciones leídas en la curva de calibración, en ng/mL.

V₁. Volumen en el que se ha disuelto la toma de ensayo, en mL.

V₂. Parte alícuota de V₁, en mL.

V₃. Volumen al que se ha diluido la parte alícuota V₂, en mL.

m. Toma de ensayo, en gramos.

Tabla 8. Límites de detección de PN reportados para los métodos: electroquímico, HPLC y espectrofotométrico.

Método	Límite de detección
<i>Electroquímico</i>	0.1 µM (Wu y Song, 2008)
<i>HPLC</i>	0.3 µM (Díaz y Fariñas, 2000)
<i>Espectrofotométrico</i>	20 µM (Srividy y Balasubramanian, 1997)

Determinaciones espectrofotométricas

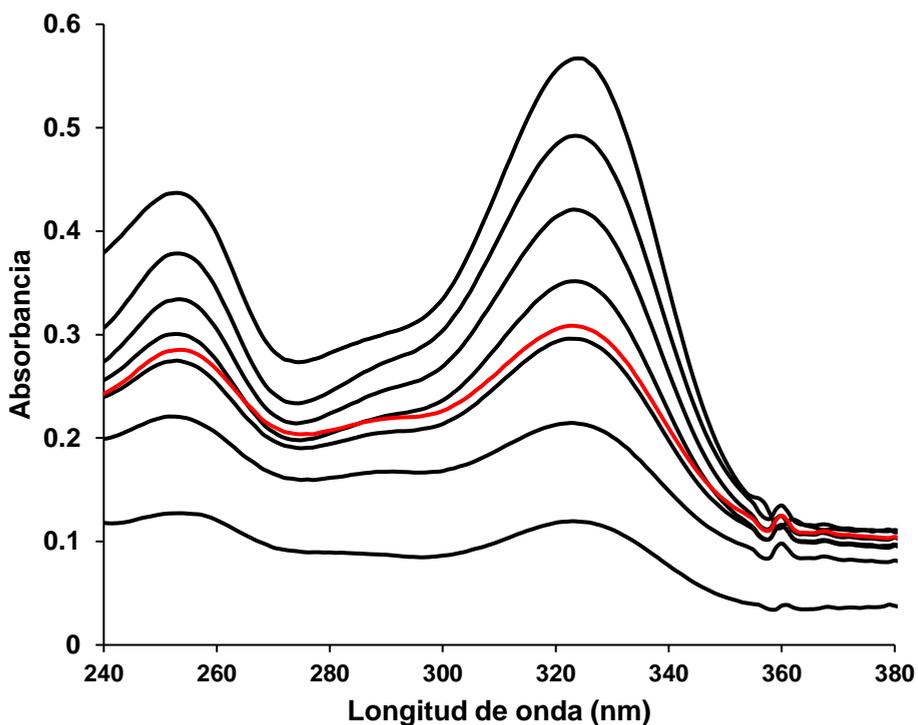


Figura 27. Espectros UV-visible para la cuantificación de PN en la muestra comercial Pyridox. En negro, las bandas de la curva de calibración para las concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μM , en PBS 0.1 M. En rojo, la banda correspondiente a la muestra previamente diluida de Pyridox en PBS 0.1 M.

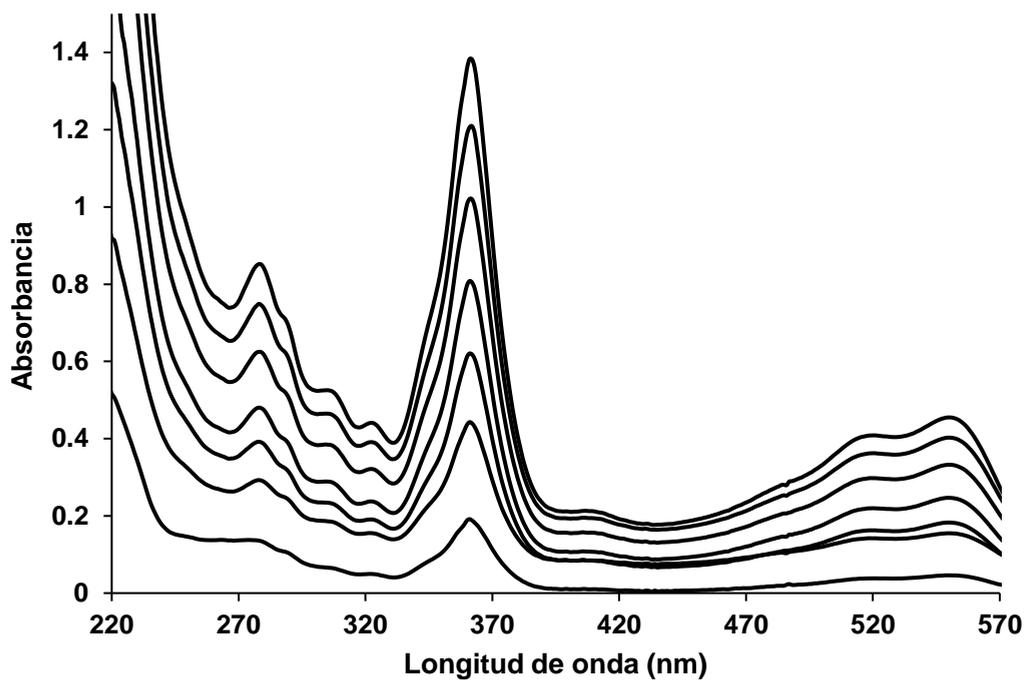


Figura 28. Espectros UV-visible de CM para las concentraciones: 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 μM , en PBS 0.1 M.

8. REFERENCIAS

Babaeil A., Taheril, A., Afrasiabi, M. (2011). *A multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode as a new sensor for the sensitive simultaneous determination of paracetamol and tramadol in pharmaceutical preparations and biological fluids*. J. Braz. Chem. Soc. vol.22 no.8.

Ball, F. (2006). *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*, Florida, FL: Taylor & Francis.

Benítez, E. (1991). *Determinación polarográfica de vitamina B₁₂ en preparados multivitamínicos* (tesis de maestría). UNAM, Facultad de Química.

Casanueva, E. (2008). *Nutriología médica*, Médica Panamericana.

Coburn, S.P. (1996). *Modeling vitamin B6 metabolism*. Adv. Food Nutr. Res 40, 107-132.

Díaz, I., Fariñas, O. (2000). *Validación del método analítico para la determinación de 3 vitaminas hidrosolubles en un suplemento vitamínico*, Rev. Cubana Farm. 2000; 34(2): 93-9.

FAO/WHO expert consultation, (2004), *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*: Bangkok, Thailand.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11^a edición, Vol. 2, 2014, 893-894, 1264-1265 y 2205-2207.

Fogg, A., y Yoo, K. (1979). *Direct differential-pulse polarographic determination of mixtures of the food colouring matters tartrazine-Sunset Yellow FCF, tartrazine-Green S and amaranth-Green S in soft drinks*, Analyst, 104, 723.

Guggisberg, D., Risse, M. C., & Hadorn, R. (2012). *Determination of Vitamin B12 in meat products by RP-HPLC after enrichment and*

purification on an immunoaffinity column. Meat Science, 90(2), 279–283.

Gulaboski, R. y Pereira (2008), *Electroanalytical Techniques and Instrumentation in food analysis*. Handbook of Food Analysis Instruments. CRC Press.

Hance, R. (1970). *Polarography of herbicides—A preliminary survey*, Pest. Sci., 1, 112.

Hernández, S., Ribero, G., Goicochea, H. (2003), *Enhanced application of square wave voltammetry with glassy carbon electrode coupled to multivariate calibration tools for the determination of B₆ and B₁₂ vitamins in pharmaceutical preparations*, Talanta 61, 743 - 753.

Heudi O., Kiliç, T., Fontannaz, P. y Marley, E. (2006), *Determination of Vitamin B12 in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction*, J. Chromat. A. ;1101 (1-2), 63-8.

Ni, Y., Bai, J., y Jin, L. (1996). *Simultaneous adsorptive voltammetric analysis of mixed colorants by multivariate calibration approach*, Anal. Chim. Acta, 329, 65.

Paulin, C. (2007). *Revisión bibliográfica sobre la cuantificación de tiamina y piridoxina (vitaminas hidrosolubles) en medicamentos y muestras biológicas* (tesis de licenciatura). UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Percudani, R., Peracchi, A. (2009). *The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin b6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families*. BMC Bioinformatics, 10, 273.

Reddy, M., Love, M. (1999). *The impact of food processing on the nutritional quality of vitamins and minerals*. Adv Exp Med Biol. 459, 99-106.

dos Santos, T., da Costa, D., Pita, S., Semaan, F. (2010). *Potentiometric and conductimetric studies of chemical equilibria for pyridoxine hydrochloride in aqueous solutions: Simple experimental determination of pKa values and analytical applications to pharmaceutical analysis*. Ecl. Qum., Sao Paulo, 35 – 4; 81 – 86.

Saidi, B. y Warthesen, J. (1983). *Influences of pH and light on the kinetics of vitamin B6 degradation*, J. Agric. Food Chem., 31, 876, 1983.

Shephard, G., y Labadarios, D. (1986). *Degradation of vitamin B6 standard solutions*, Clin. Chim. Acta, 160, 307.

Srividya, K., Balasubramanian N. (1997). *Spectrophotometric determination of pyridoxine hydrochloride pharmaceutical preparations and foods*, J AOAC Int.; 80(6):1368-73.

The encyclopedia of vitamins, minerals, and supplements (2004), Tova Navarra, B.A., R.N.

Mirceski V., Komorsky-Lovric S. y Lovric M. (2007). *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba.

Warnick, E., Kirk, A., Slater, S., Butron B., Lanata, C., Huffman, S. (2004). *Social Marketing Improved the Use of Multivitamin and Mineral Supplements among Resource-Poor Women in Bolivia*. Journal of Nutrition Education and Behavior. 36, 6, 290-297.

Wu, Y., Song, F. (2008). *Voltammetric investigation of vitamin B6 at a glassy carbon electrode and its application in determination*, *Bukk. Korean Chem. Soc.*, Vol. 29, No. 1.

Zhang, Y., Wang, Y. (2011), *Voltammetric Determination of Vitamin B₆ at Glassy Carbon Electrode Modified with Gold Nanoparticles and Multi-Walled Carbon Nanotubes*, *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 194 - 199.