

48
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RADIOLISIS DE VITAMINA B12

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
XOCHILT JUANCHI GOMEZ



MEXICO, D. F.



1997

INSTITUTO NACIONAL
DE ESTADISTICA Y CENSAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Vélez Pratt Guadalupe
Vocal	Prof. Albarrán Sánchez María Guadalupe
Secretario	Prof. Navas Pérez Aída
1er. Suplente	Prof. Cárdenas Gutiérrez José Manuel
2do. Suplente	Prof. García Olivares Francisco

Sitio donde se desarrolló el tema
Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM, Depto. Química de
Radiaciones y Radioquímica.

Nombre completo y firma del asesor del tema
María Guadalupe Albarrán Sánchez

Espe. Albarrán Sánchez

Nombre completo y firma del supervisor técnico
Alicia Negrón Mendoza

Alicia Negrón Mendoza

Nombre completo y firma del sustentante
Xóchilt Juanchi Gómez

Xóchilt Juanchi Gómez

Agradecimientos:

Agradezco de forma especial la ayuda, colaboración y apoyo que me brindó la Dra. Guadalupe Albarrán Sánchez en la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Alicia Negrón Mendoza por su apoyo técnico y atención.

A Carmen Leticia Peza por su paciencia y amabilidad recibidos en el trabajo de laboratorio.

A la Dra. Estrella Cervantes de Facultad de Medicina por su ayuda para realizar mis experimentos en esa Institución.

A Dios, mis papas y demás familiares por su amor y cariño continuo.

A Ruy Sánchez Juanchi por su alegría, jovialidad y afecto.

**A DIOS,
A MIS PADRES**

A MI FAMILIA

YATL.

ÍNDICE

	Páginas
Introducción	1
Objetivos	7
<i>Capítulo 1</i>	
Generalidades	
1.1 Definiciones básicas	8
1.2 Radiólisis del agua	12
<i>Capítulo 2</i>	
Antecedentes de la irradiación gamma sobre la vitamina B₁₂	
2.1 Efectos de la radiación ionizante sobre la vitamina B ₁₂	14
2.2 Efectos del pH en soluciones acuosas sobre la vitamina B ₁₂	17
2.3 Irradiación de soluciones acuosas de vitamina B ₁₂ conteniendo diferentes solutos	18

	Páginas
2.3.1 Vitamina B ₁₂ en presencia de formato de sodio desgasificado con Argón	19
2.3.2 Vitamina B ₁₂ saturada con N ₂ O	19
2.3.3 Vitamina B ₁₂ en presencia de formato de sodio saturada con N ₂ O ó CO ₂	19
2.4 El papel del H ₂ O ₂ en la radiólisis de la vitamina B ₁₂	20
2.5 Constantes de velocidad de productos radiolíticos del agua y la vitamina B ₁₂	21

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 Reactivos	23
3.2 Preparación de las muestras	23
3.3 Irradiación	25
3.3.1 Fuente de irradiación	25
3.3.2 Dosimetría de la fuente de irradiación	26

	Páginas
3.4 Análisis de las muestras irradiadas	27
3.4.1 Espectrofotometría ultravioleta	27
3.4.2 Cromatografía de líquidos de alta presión	27
3.5 <i>Serratia marcescens</i>	29
3.5.1 Estudio del efecto de la radiación ionizante sobre <i>Serratia marcescens</i>	29
3.6 Prueba de esterilidad	29
3.6.1 Materias primas	30
3.6.2 Equipo	30
3.6.3 Procedimiento	30
<i>Capítulo 4</i>	
Resultados y Discusión	32
<i>Capítulo 5</i>	
Conclusiones	47
Bibliografía	49

Lista de tablas y figuras

	Páginas
Figura 1. Poder de penetración de rayos alfa, beta y gamma	10
Figura 2. Espectros UV de la vitamina B ₁₂ a diferentes dosis de irradiación	33
Figura 3. Curva patrón de vitamina B ₁₂ en solución acuosa	35
Figura 4. Cromatogramas de la vitamina B ₁₂ en solución acuosa	37
Figura 5. Porcentaje de descomposición de vitamina B ₁₂ en solución acuosa 1×10^{-5} mol l ⁻¹	38
Figura 6. Porcentaje de descomposición de vitamina B ₁₂ en solución acuosa 1×10^{-2} mol l ⁻¹	39
Figura 7. Porcentaje de descomposición de vitamina B ₁₂ en estado sólido	40
Figura 8. Valor G ^o de vitamina B ₁₂ en solución acuosa 1×10^{-5} mol l ⁻¹	42
Figura 9. Valor G ^o de vitamina B ₁₂ en estado sólido	43
Tabla 1. Efecto de la dosis sobre soluciones acuosas de vitamina B ₁₂	14
Tabla 2. Resultados obtenidos para leche cruda entera	15
Tabla 3. Solución acuosa de vitamina B ₁₂ irradiada	16
Tabla 4. Efecto del H ₂ O ₂ en solución acuosa de vitamina B ₁₂	21
Tabla 5. Valores G obtenidos para la vitamina B ₁₂ en solución acuosa	22
Tabla 6. Irradiación de <i>Serratia marcescens</i>	31
Tabla 7. Porcentaje de descomposición de la vitamina B ₁₂ en solución acuosa a diferentes concentraciones	41
Tabla 8. Resultados de pruebas de esterilidad en caldo de soya	45
Tabla 9. Resultados de pruebas de esterilidad en caldo tioglicolato	45

RADIÓLISIS DE VITAMINA B₁₂

INTRODUCCIÓN

La vitamina B₁₂ (cianocobalamina) es esencial para la dieta humana. La deficiencia de esta vitamina produce una síntesis defectuosa del ADN en cualquier célula que intenta la replicación cromosómica y la división.

Clínicamente la carencia de esta vitamina se reconoce por su efecto sobre los sistemas hematopoyético y nervioso.

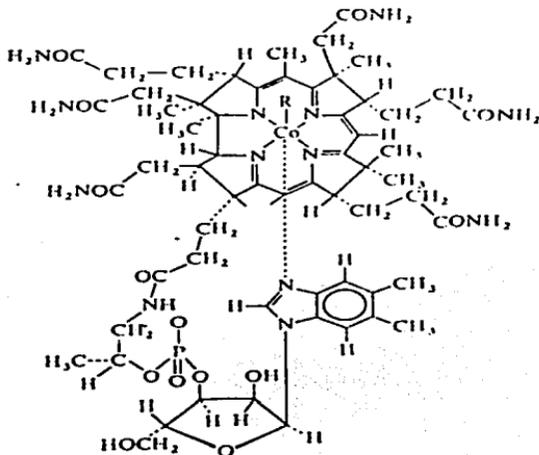
En la naturaleza, la única fuente original se encuentra en ciertos microorganismos que crecen en el suelo, por lo que los productos vegetales están libres de vitamina B₁₂; a menos que estén contaminados con estos microorganismos, de modo que los animales dependen de la síntesis en su propio tracto alimentario. En el hombre, la vitamina B₁₂ sintetizada en el intestino grueso no está disponible para la absorción, y el requerimiento nutricional diario que es de 3 a 5 microgramos, debe obtenerse de subproductos animales en la dieta. La vitamina B₁₂ se obtiene de preparados de estómago de cerdo u otros animales domésticos. Las principales fuentes son el hígado, riñón y corazón de cerdo.

La vitamina B₁₂ en presencia del ácido gástrico se libera de las proteínas a las que está ligada y vuelve a unirse al factor intrínseco, que es una glucoproteína, que liga y transporta a la cianocobalamina. Una vez formado este complejo llega entonces al íleon, donde interactúa con un receptor específico sobre las células de la mucosa ileal. Los preparados purificados de factor intrínseco se estandarizan según su capacidad para promover la absorción de vitamina B₁₂.

Fórmula condensada:



Su fórmula estructural:



Nomenclatura:

Vitamina B₁₂(Cianocobalamina).
 5,6-dimetilbenzimidazol cianocobamida. 2
 R = CN

Propiedades físicas: 1

La vitamina B₁₂ purificada es un polvo higroscópico

Rojo oscuro

Poco soluble en agua

Es muy estable a la temperatura ambiente

Puede ser autoclaveado durante 15 minutos a 121 °C

Es sensible a la luz

Solubilidad: 1.25g/100 ml en agua, soluble en alcohol e insoluble en acetona, éter y cloroformo

Propiedades químicas: 2

La vitamina B₁₂ se encuentra en 3 diferentes estados de oxidación para el átomo de cobalto, los cuales son Co(I), Co(II) y Co(III), siendo el más estable en la forma de Co(III)

Presenta 3 máximos de absorción: 278, 361 y 550 nm en la región visible-ultravioleta

Las tres formas son altamente coloridas y tienen un espectro de absorción en luz visible y ultravioleta

La vitamina B₁₂ es más estable en soluciones ligeramente ácidas, entre pH 4.5 - 5

En soluciones acuosas la vitamina B₁₂ se deteriora en presencia de agentes oxidantes (KMnO₄, H₂O₂, etc.)

Radioesterilización de medicamentos

Por un largo tiempo se ha considerado que la energía ionizante ejerce efectos letales sobre las bacterias, principalmente a través de acciones directas. Con el progreso en investigaciones radiobiológicas, llegó a ser obvio que la acción directa no es el único mecanismo en la destrucción de bacterias con energía ionizante, ya que los radicales libres formados indirectamente por la reacción de la radiación con el medio podrían también contribuir mucho en la destrucción de microorganismos. Por tanto, es importante considerar los factores que pueden influenciar los efectos indirectos de la radiación ionizante sobre los microorganismos, como son:

1. El tipo de ambiente presente en el producto a esterilizar.
2. Temperatura.
3. El grado de hidratación.

Otros factores importantes a considerar, de acuerdo con los demás métodos de esterilización, considerando la eficiencia de la esterilización por radiación depende de:

1. El número y tipo de microorganismos contaminantes presentes en el proceso.
2. Las condiciones ambientales en que ocurre el proceso.

La dosis adecuada de radiación esta determinada por la carga microbiana del producto, así como la naturaleza del medicamento, para evitar daños en la estructura de tal producto.

Éste es un punto crucial de interés, ya que se debe buscar la dosis mínima de radiación para la inactivación microbiana. La dosis de inactivación estará dada, no sólo por la cantidad de microorganismos presentes, sino por el tipo de microorganismos que se encuentren.

Se han hecho estudios que demuestran que la radiación ionizante inicialmente produce una degradación a nivel de ADN, la cual genera la muerte celular.⁷ En general los investigadores han encontrado que las bacterias son más resistentes a las radiaciones cuando están secas que cuando están en presencia de humedad.

Efecto de la radiación gamma sobre diferentes especies bacterianas

Se han realizado estudios comparativos acerca del efecto que ejerce la radiación ionizante sobre varias especies bacterianas. Al igual que otros agentes antibacterianos (fenol, óxido de etileno, calor), se observó que los microorganismos esporulados, como por ejemplo *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, entre otros, presentan una mayor resistencia hacia la radiación gamma que los microorganismos vegetativos.⁴

Estudios recientes indican que una dosis de 10.0 kGy de radiación gamma es suficiente para eliminar los actinomicetos de alimentos y productos alimenticios de origen animal.⁹ Por otra parte, también se encontró que la dosis letal de radiación gamma para algunas enterobacterias como *Salmonella typhi* en presencia de aire y polietilén glicol, es de 0.2 a 1.0 kGy¹⁰, así como para una concentración de 4 x 10⁴ esporas/g la dosis de esterilización es de 2.5 a 4 kGy.⁴

La elección de la dosis para la esterilización depende de la concentración de microorganismos presentes en la muestra, así como de las condiciones del medio (temperatura, presencia o ausencia de oxígeno, grado de hidratación).

La dosis letal empleada dependerá de las condiciones del medio en que se encuentre el microorganismo, por lo que debe estudiarse el efecto que causa la radiación gamma individualmente para cada grupo de microorganismos.

Serratia marcescens

Uno de los objetivos de este proyecto es el encontrar la dosis adecuada para la eliminación de este microorganismo, suponiendo que se encuentra contaminando la vitamina B₁₂ en solución acuosa y en estado sólido. Para comprobar que la vitamina B₁₂ realmente ha sido esterilizada (ausencia de microorganismos viables), se efectuarán las pruebas de esterilidad correspondientes.

Este microorganismo fue seleccionado para hacer las pruebas de esterilidad, ya que se trata de una cepa intrahospitalaria del biogrupo A-5/8 biotipo A8b.

Es una bacteria patógena, altamente agresiva que puede desarrollarse en cualquier medio inhóspito, es decir, en ausencia de nutrientes necesarios para su crecimiento, es muy resistente a agentes desinfectantes tales como cloruro de benzalconio, ácido sórbico, clorhexidina, etc. también resiste a la acción de los antimicrobianos ya sea por la presencia de enzimas modificadoras o destructoras de los antibióticos.

Este microorganismo resiste a procesos utilizados para la esterilización, como es el uso de óxido de etileno.¹⁰

Son bacilos Gram (-), de 0.5 a 0.8 μm de diámetro, que pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae*, son anaeróbicos facultativos, sus colonias por lo general son opacas y pueden desarrollarse casi en todos los medios de cultivo.

Pueden crecer a temperaturas entre 10°C y 37 °C a pH de 5 a 9.¹⁰

La aplicación de la radiación ionizante en la industria, cada día es más amplia, en la actualidad es utilizada para la esterilización de medicamentos, conservación de productos alimenticios, cosméticos etc. de ahí la gran importancia de la Química de radiaciones en este campo. Es de interés el buscar nuevas técnicas para la esterilización de medicamentos y la radiación ionizante es otra de las opciones. La vitamina B₁₂ en solución inyectable es esterilizada por microfiltración en la Industria Farmacéutica según CFR, pero como todos los procesos de esterilización ofrecen ventajas y desventajas, por lo que la irradiación podría ser una de las técnicas por su facilidad de manejo utilizada durante el proceso de esterilización.

OBJETIVOS

1. Estudiar el grado de descomposición de la vitamina B₁₂ en solución acuosa y en estado sólido.
2. Estudiar el efecto de la concentración en soluciones acuosas de vitamina B₁₂ a dosis fijas de radiación.
3. Calcular el % en pérdida de la vitamina B₁₂ a diferentes dosis de irradiación en soluciones acuosas y en estado sólido.
4. Cálculo del valor G^o de descomposición de la vitamina B₁₂ en estado sólido y solución acuosa.
5. Si suponemos que una muestra de vitamina B₁₂ se encuentra contaminada con *Serratia marcescens*. Encontrar la dosis adecuada para su esterilización tanto en solución acuosa como en el estado sólido.

1.1 Definiciones básicas

Para tener un mayor conocimiento sobre la descomposición de la vitamina B₁₂ inducida por la radiación ionizante es necesario definir los siguientes conceptos.

Química de radiaciones: Es el estudio de las transformaciones químicas inducidas por la radiación ionizante en la materia.

Radiación ionizante: Es la radiación que tiene la energía suficiente para ionizar o excitar a los átomos con que interacciona, en ésta se incluyen la radiación proveniente de núcleos radiactivos (rayos γ y partículas α y β), partículas de alta energía cargadas (electrones, protones, deuterones) y la radiación electromagnética de longitud de onda corta (rayos x con una longitud de onda menor a 250 nm y energía mayor a 50 eV).

Radiólisis: La descomposición de una sustancia causada o inducida por radiación ionizante.

Rendimiento radiolítico: Es el número de moléculas formadas o destruidas por cada 100 eV de energía absorbidos. Se denomina valor G.¹

$$G = \frac{\text{Número de moléculas transformadas}}{\text{Dosis}} \times 100$$

Para calcular el valor G, la dosis deberá expresarse en electronvolts por gramo (eV g⁻¹), o electronvolts por mililitro (eV ml⁻¹).

Valor G^0 o valor G inicial: es el rendimiento radiolítico obtenido cuando la dosis absorbida tiende a cero. Se determina por la extrapolación a dosis 0 de la gráfica valor G vs dosis absorbida.

Unidades

La dosis de radiación absorbida por un material que ha sido irradiado se expresa en términos de la cantidad de energía que este absorbe por unidad de masa. La unidad de dosis absorbida es el joule por kilogramo ($J\ kg^{-1}$), la cual ha sido denominada como Greys (Gy), de tal manera que la dosis absorbida por un material se expresa en greys o en alguno de sus múltiplos: $kGy = 10^3\ Gy$, $MGy = 10^6\ Gy$.

La unidad antigua de dosis de radiación es el rad el cual fue definido como $erg\ g^{-1}$ o $10^{-2}\ Jkg^{-1}$, por lo que 1 Gy es igual a 100 rad y su equivalencia en $eV\ g^{-1}$ es $1Gy = 6.24 \times 10^{15}\ eV\ g^{-1}$.⁴

La dosis emitida por unidad de tiempo se denomina intensidad de dosis absorbida (o también razón de dosis absorbida) y las unidades son $Gy\ s^{-1}$, expresada normalmente $Gy\ min^{-1}$.

Radiación gamma: Los rayos gamma son un tipo de radiación electromagnética de origen nuclear con longitud de onda en la región de $3 \times 10^{-11}\ m$ a $3 \times 10^{-13}\ m$. Es más común expresar la radiación en términos de energía que en términos de longitud de onda, por lo que la relación entre longitud de onda y energía es:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

Donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, y λ es la longitud de onda. Al sustituir las constantes³

$$E = \frac{1.24 \times 10^{-6}}{\lambda}$$

Es necesario conocer el poder de penetración de la radiación por los propósitos de su aplicación por ejemplo para la radioesterilización de productos médicos, material quirúrgico, etc.

En un medio dado, el alcance de la radiación depende de su tipo y energía. Entre los tipos de radiación ionizante, los rayos gamma son los que presentan un mayor poder de penetración (Fig. 1). Estos pueden atravesar grandes distancias aun en un medio denso, por ejemplo se requiere un espesor de plomo de 15 centímetros para reducir la intensidad de una fuente γ por un factor de 5000.⁵

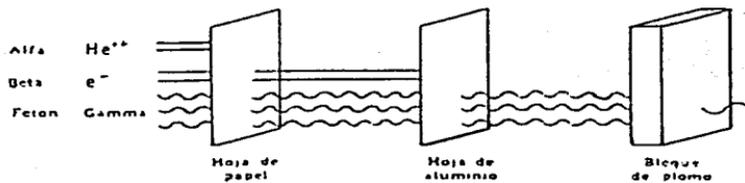


Fig. 1. Poder de penetración relativo de radiaciones alfa, beta y gamma.

Cuando la radiación gamma pasa a través de la materia sufre absorción por interacción con los átomos del material absorbente.

El resultado es un decremento en la intensidad de la radiación que está en función de la distancia recorrida a través del material absorbente y de la naturaleza del mismo. La ecuación del decremento en la energía del haz incidente de radiación es exponencial y se expresa:

$$I = I_0 e^{-\mu x}$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\mu x$$

donde:

I_0 = la intensidad del haz incidente de radiación

I = la intensidad después de atravesar una distancia x a través del material

μ = coeficiente de atenuación lineal del material

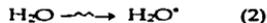
El coeficiente de atenuación lineal del material, μ es un valor que depende además de la naturaleza del material absorbente, de la energía de la radiación y sus unidades son cm^{-1} . Para una radiación de 1 MeV el valor de μ para plomo, agua y aire, expresado en cm^{-1} es de 0.797, 0.0706 y de 7.6×10^{-5} respectivamente. ³

1.2 Radiólisis del agua

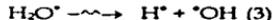
Debido a la importancia del agua y de soluciones acuosas en procesos químicos y biológicos, la descomposición del agua por la radiación ha sido estudiada extensivamente.⁶

Cuando el agua sufre un proceso de radiólisis, se presentan tres etapas principalmente.

En su primera etapa se producen iones y moléculas excitadas según las siguientes ecuaciones:



En la segunda etapa de la radiólisis del agua, la molécula excitada H_2O^* se descompone rápidamente dando origen a los radicales libres:



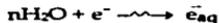
El radical libre $\cdot\text{OH}$ se le denomina radical hidróxilo y al radical H^+ radical hidrógeno.

El ión producido en el proceso (1) sufre una reacción con una molécula de agua.

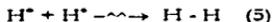


La especie H_3O^+ se le denomina ión hidrónico.

En tanto el electrón expulsado en la reacción (1) es rodeado de moléculas de agua formándose el electrón hidratado e_{aq}^-



Como tercera y última etapa ocurren reacciones subsecuentes del tipo radical-radical que dan origen a la formación de:



Se les denomina productos moleculares.

En forma global la descomposición radiolítica del agua se representa por la ecuación:



Los eventos químicos que ocurren en las soluciones acuosas irradiadas son estimados con los productos radioquímicos (G = número de radicales, átomos o moléculas formados por cada 100 eV) son:

$$G(e_{aq}^{-}) = 2.6, G(\bullet OH) = 2.6, G(H_2) = 0.45, G(H_2O_2) = 0.75 \text{ y } G(H^{\bullet}) = 0.55.$$

Si además del agua está presente algún otro compuesto, la energía de la radiación es depositada principalmente en el agua. Los productos de la descomposición de ésta, a través de efectos secundarios, reaccionan con el compuesto y origina nuevos intermediarios que producen los productos químicos finales observados."

ANTECEDENTES DE LA IRRADIACIÓN GAMMA DE LA VITAMINA B₁₂

2.1 Efectos de la radiación ionizante sobre la vitamina B₁₂

Proctor y Goldblith¹³ realizaron estudios sobre el efecto de la radiación ionizante sobre vitamina B₁₂ en soluciones acuosas de vitamina B₁₂ y en leche cruda entera. Sus resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Efecto de la dosis sobre soluciones acuosas de vitamina B₁₂

Dosis (Gy)	(% Remanente de B ₁₂)	
	10 µg/ml	15 µg/ml
25	68	77
45	52	67
81	35	52
146	21	32

Observaron una mayor descomposición de la vitamina B₁₂ a mayor dosis de irradiación, así como una mayor descomposición de la vitamina cuando se encuentra en una solución acuosa más diluida, concluyendo de esta manera que la vitamina B₁₂ en solución acuosa es relativamente radiosensible, es decir, los efectos de la radiación son indirectos.

Para la leche cruda entera observaron que la descomposición de la vitamina B₁₂ fue más baja al disminuir la concentración de la vitamina y las dosis empleadas de radiación fueron más altas que las utilizadas para las soluciones acuosas de vitamina, por lo que esto puede ser un indicativo de que algunos de los componentes de la leche protegen a la vitamina de su descomposición.

Tabla 2. Resultados obtenidos para leche cruda entera irradiada

Dosis (Gy)	(%) Remanente 0.0049 μ g/ml
500	100
1000	75
2500	67
5000	69

Proctor y Goldblith informaron que para la leche cruda entera la dosis de pasteurización es 1000 Gy y para su esterilización es de 5000 Gy.¹³

Estudios realizados en 1972 por Blackburn y colaboradores¹⁴ sobre la acción que ejerce la radiación ionizante sobre la vitamina B₁₂ en solución acuosa, muestran que la cianocobalamina es atacada por las especies producidas por la radiólisis del agua.

El e_{aq} que es un poderoso agente reductor actúa reduciendo el átomo central de cobalto (III) de la vitamina B₁₂ a Co(II) (vitamina B_{12R}), ó hasta Co (I) (vitamina B_{12S}). Este cambio puede revertirse con la presencia de oxígeno. Por tanto el oxígeno puede proteger a la vitamina B₁₂ de un permanente daño como se indica en la tabla 3.

Otro de los productos de la radiólisis del agua son los radicales *OH, los cuales al reaccionar con la vitamina B₁₂ producen una permanente degradación, obteniéndose un compuesto organocobáltico café, no caracterizado. En la tabla 3 se presentan sus resultados.

Tabla 3. Cambios en la densidad óptica a 351-361 nm en soluciones acuosas de vitamina B₁₂ irradiadas (dosis = 3.2×10^{17} eV ml⁻¹).¹⁴

Solución	pH	antes de oxidación	después de oxidación	*G(B _{12r})
Sin O ₂	6.0	0.29	0.22	0.7
	10.0	0.27	0.16	1.0
Sin O ₂ + HCOO ⁻	7.4	0.26	0.06	1.95
Sat. N ₂ O	6.0	0.25	0.25	0.00
	10.0	0.24	0.22	0.20
O ₂	6.0	-	0.17	0.00
	10.0	-	0.13	0.00

*G (B_{12r}): calculada de los cambios en molaridad, cuando las soluciones irradiadas fueron oxidadas.

Blackburn y colaboradores publicaron que en soluciones de cianocobalamina saturadas con N₂O, éste actúa atrapando al e_{aq} que es un fuerte agente reductor, que como puede verse en la tabla 3, no hay una producción de (B_{12r}) a pH 6, mientras que a pH 10 el valor de G(B_{12r}) = 0.2, por lo que se ve una dependencia del pH para la producción de diferentes especies en la descomposición radiolítica de soluciones acuosas de la vitamina B₁₂. Cuando tenemos O₂ en la solución ocurre algo similar que con el N₂O, por lo que no hay producción de (B_{12r}). En soluciones desgasificadas, los e_{aq} quedan libres, reduciendo la vitamina B₁₂ a B_{12r}, esto puede observarse por los valores G obtenidos en la tabla 3. (ver página 19. Efecto de otros solutos).

Los productos reducidos pueden ser fácilmente reoxidados por el oxígeno, los cuales absorben en 351-361nm, indicando que sean probablemente la vitamina B_{12r} o vitamina B_{12s} (Co I).

Los mismos autores proponen un mecanismo de reacción de los e_{aq}^- sobre la vitamina B₁₂. Sugieren que esta especie puede reducir con una interacción directa el átomo de cobalto de Co(III) a Co(II), o indirectamente con el anillo corrinóide. Similarmente los radicales hidrógeno pueden reducir el átomo de cobalto con una simple reacción de transferencia de carga.



Por lo tanto la cianocobalamina reacciona con las especies producidas por la radiólisis del agua, la degradación es atribuible a los radicales $^{\bullet}\text{OH}$ y a los e_{aq}^- . Los radicales hidróxilo atacan produciendo un compuesto café no identificado, el cual es considerado como un producto exclusivo de la cianocobalamina cuando sufre un cambio químico permanente. Los radicales hidrógeno y el H_2O_2 tienen una mínima contribución.

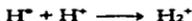
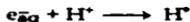
Por otro lado, la cianocobalamina en estado sólido es más resistente a la radiación con una $G(-\text{cianocobalamina}) = 0.6$.

2.2 Efecto del pH en soluciones acuosas sobre la vitamina B₁₂

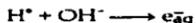
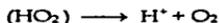
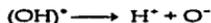
La concentración de productos radiolíticos del agua depende del pH de la solución.

Los tipos de equilibrio que son pH dependientes pueden representarse de la siguiente manera:

Soluciones ácidas



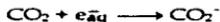
Soluciones alcalinas



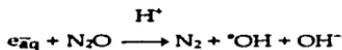
De acuerdo a las especies producidas dependiendo del pH de la solución, y con la estabilidad de la cianocobalamina, es conveniente trabajar a un pH ligeramente ácido.¹⁵

2.3 Irradiación de soluciones acuosas de vitamina B₁₂ conteniendo diferentes solutos

Faraggi y Leopold¹⁶ realizaron estudios sobre los efectos de la radiación ionizante sobre soluciones acuosas de vitamina B₁₂ conteniendo CO₂ y ter-butanol, para atrapar al e_{aq}⁻ convirtiéndolo a CO₂⁻ según la siguiente reacción:



Por otro lado Blackburn y colaboradores¹⁷ observaron que al saturar soluciones acuosas de cianocobalamina con N₂O, los e_{aq}⁻ son atrapados por el N₂O, pero al reaccionar éstos se producen radicales [•]OH de acuerdo con la siguiente reacción:



Los radicales $\cdot\text{OH}$ formados reaccionan según los trabajos de Blackburn y colaboradores y de Faraggi y colaboradores (1973), con el ter-butanol formándose una especie no reactiva hacia la vitamina B_{12} , por lo que se protege a la vitamina del daño permanente.

2.3.1 Vitamina B_{12} en presencia de formato de sodio desgasificado con Argón

En esta solución todos los electrones acuosos reaccionan con la cianocobalamina, mientras que los radicales $\cdot\text{OH}$ y los átomos de hidrógeno reaccionan con el formato dando los radicales carboxilo $\text{CO}_2\cdot$ (17).

2.3.2 Vitamina B_{12} saturada con N_2O

En esta solución los electrones acuosos reaccionan con el N_2O , dando radicales hidróxilo, los cuales junto con los átomos de hidrógeno producidos directamente por la radiación atacan la cianocobalamina. Los cambios en la absorción redondean en los 310 nm, indicando la ausencia de apreciables cantidades de B_{12r} , aunque las trazas pueden haber sido formadas por la acción de los átomos de H. El decremento en la densidad óptica a 360 nm y los otros cambios son atribuibles al ataque de radicales $\cdot\text{OH}$ sobre cianocobalamina dando el no caracterizado compuesto amarillo-café. (17)

2.3.3 Vitamina B_{12} en presencia de formato de sodio saturada con N_2O ó CO_2

En ambas soluciones los electrones acuosos, radicales hidróxilo y átomos de hidrógeno son convertidos a radicales $\text{CO}_2\cdot$. Se produjeron cambios no significativos en la densidad óptica, dando una más amplia confirmación de que $\text{CO}_2\cdot$ no reduce la cianocobalamina a B_{12r} . Los pequeños cambios a 313 nm confirman que el $\text{CO}_2\cdot$ no la reduce,

mientras los cambios a 360 nm indican algún otro ataque sobre la molécula bajo esas condiciones.

La adición de uno o más solutos a los diferentes medios nos da una idea de como podemos proteger los compuestos de cobalto(III), antes mencionados, evitando así un daño permanente al grupo de vitaminas B₁₂ buscando de este modo la forma más eficiente de esterilización de soluciones acuosas por medio de la radiación ionizante.¹⁷

2.4 El papel del H₂O₂ en la radiólisis de la vitamina B₁₂

En 1982 Kishore y colaboradores¹⁸ estudiaron los efectos del H₂O₂ sobre la vitamina B₁₂ en soluciones acuosas neutras, observando que las principales diferencias en utilizar O₂ ó N₂O reside en la producción de H₂O₂ proveniente de la radiólisis del agua.

Para ello, las soluciones de vitamina B₁₂ irradiadas se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

- (1) Soluciones saturadas de N₂O.
- (2) Soluciones saturadas de N₂O, adicionando inicialmente H₂O₂. (La concentración de H₂O₂ adicionado 4 µM, fue escogido de tal modo que la cantidad de H₂O₂ adicionado no compitiera con las especies primarias de la radiólisis del agua).
- (3) Soluciones saturadas con O₂.

En los tres sistemas anteriores las moléculas de la vitamina pueden reaccionar con los radicales [•]OH, y también con los átomos de H en soluciones saturadas de N₂O, sin embargo, el e_{aq} no reacciona, ya que es atrapado por el O₂ o el N₂O. Sus resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Efecto de H_2O_2 sobre la descomposición de la vitamina B_{12} en soluciones acuosas irradiadas

Vit.	Solución saturada con N_2O		Solución saturada de N_2O conteniendo H_2O_2		Solución saturada con O_2	
	G(-Vit)	G(H_2O_2)	G(-Vit)	G(H_2O_2)	G(-Vit)	G(H_2O_2)
B_{12}	3.0	-	3.7	-	1.8	-

Como puede verse de los resultados de la tabla 4 el valor G(-Vit B_{12}) es más alto cuando se adiciona H_2O_2 al sistema. Estos valores sugieren que ocurre una reacción entre la vitamina B_{12} y el H_2O_2 formado durante la radiólisis. El éxito de esta reacción fue directamente confirmado en soluciones saturadas de N_2O conteniendo H_2O_2 , ya que en este caso hay un incremento en la descomposición de la vitamina y un paralelo consumo del H_2O_2 .

2.5 Constantes de velocidad de productos radiolíticos del agua y la vitamina B_{12}

En 1974 Blackburn y colaboradores ¹⁷ indicaron que los electrones acuosos reaccionan con el átomo central de cobalto de la cianocobalamina, dando como producto la vitamina $B_{12}r$ (Co II), con una constante de velocidad de $k = 3.8 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Los radicales hidróxilo reaccionan con la cianocobalamina con una constante de velocidad de $k = 6.5 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, produciendo el compuesto no caracterizado café-amarillo.

De estos resultados se determina que el e_{aq}^- reacciona principalmente con la vitamina B_{12} .

Tabla 5. Valores G obtenidos por diferentes investigadores para la vitamina B₁₂ en solución acuosa

Análisis	Condiciones (solución acuosa)	G(- Vit B ₁₂)	Ref.
UV	$3.7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	2.6	14
UV	$3.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	2.12	15
UV	Sat. con N ₂ O	3.0	18
UV	Sat. con O ₂	1.8	18
UV	Sat. N ₂ O y H ₂ O ₂	3.7	18

Según los estudios anteriores los diferentes investigadores coinciden en que la cianocobalamina en solución acuosa es fuertemente atacada por los productos de la radiólisis agua, por lo que hay un menor daño cuando es irradiada en estado sólido, este tipo de consideración debe emplearse para estudios posteriores.

El uso de otros solutos en soluciones acuosas de vitamina B₁₂, permitirían que la vitamina B₁₂ sea efectivamente esterilizada en solución acuosa por radiación ionizante, sin que sea acompañada por cambios químicos importantes.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos:

Vitamina B₁₂, obtenida de los Laboratorios Sigma Chemical C.O.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de la más alta pureza, disponibles en el mercado.

Se preparó agua triplemente destilada según la técnica usada por Draganic.⁶

3.2 Preparación de las muestras

En Química de Radiaciones se requieren de cuidados especiales como la pureza del agua, la limpieza de los contenedores para irradiación y preparación de las soluciones, ya que se involucran especies reactivas presentes en muy bajas concentraciones, y cualquier impureza presente, compite con las especies reactivas y así repercutir en los resultados obtenidos. Por consiguiente, todo el material de vidrio y contenedores para irradiación utilizados son lavados con detergente y agua corriente, posteriormente sumergidos en una mezcla de ácido nítrico-ácido sulfúrico durante una hora. Después son enjuagados con agua corriente, agua destilada y finalmente con agua tridestilada. Se secan a temperatura ambiente y se llevan a una mufla a una temperatura de 300-350°C por 30 minutos como mínimo.

Los contenedores para irradiación utilizados son ampollas de vidrio de 1.2 cm de diámetro y 4 cm de largo.

El degasado de las soluciones y el llenado simultáneo de las ampollas para irradiación se hizo por medio de un dispositivo de vidrio conectado a través de una trampa, a una bomba de vacío. El aire es eliminado por la agitación y el vacío, en un tiempo aproximado de 30

minutos. Cuando se ha eliminado el aire, se procede a llenar las respectivas ampolletas y taparlas.

Las soluciones de cianocobalamina fueron preparadas con agua triplemente destilada. Las soluciones empleadas eran de diferentes concentraciones ($1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ a $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). Todas las soluciones acuosas irradiadas fueron previamente desgasificadas. El pH de las soluciones fue de 4.5 y 7.9 respectivamente. Dado que la vitamina B₁₂ es sensible a la luz, las soluciones se protegieron de la luz.

Después de ser preparadas las muestras fueron irradiadas y analizadas inmediatamente por cromatografía de líquidos de alta presión.

Para las muestras de vitamina B₁₂ sólida, se pesaron aproximadamente 0.01 g.

Se irradiaron en el intervalo de dosis estudiado y se hicieron las respectivas diluciones hasta llegar a una concentración de $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ para un análisis posterior por cromatografía líquida de alta presión.

3.3 Irradiación

3.3.1 Fuente de irradiación

La fuente radiactiva empleada fue un irradiador de rayos γ del radionúclido Cobalto-60 llamado Gammacell 200, que consiste básicamente en una fuente de forma anular, un blindaje de plomo alrededor de la fuente y una cavidad cilíndrica (émbolo) que se mueve verticalmente a través del centro de las fuentes con una cámara de irradiación de 13.9 cm de largo por 8.9 cm de diámetro, donde se coloca la muestra a irradiar desde fuera.

La actividad nominal de la fuente fue de 1.3505×10^{14} Bq (3650 Ci). En el momento de este estudio la intensidad de la dosis fue de 1.6 Gy/min, determinado mediante el dosímetro de Fricke.⁴

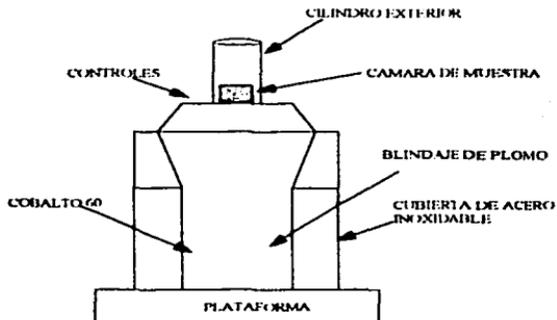


Diagrama de "Gamacell 200" Fuente radioactiva de cobalto 60

3.3.2 Dosimetría de la fuente de irradiación

Se determinó la dosis de radiación absorbida por medio del Dosímetro de Fricke, el cual consiste en una solución acuosa de sulfato ferroso 10^{-3} mol l^{-1} , ácido sulfúrico 0.4 mol l^{-1} y cloruro de sodio 10^{-1} mol l^{-1} . La radiación induce la oxidación del ion ferroso a ion férrico en pH bajo y en presencia de oxígeno. El empleo de cloruro de sodio es con el propósito de reducir el efecto de posibles impurezas.⁴

El rendimiento radiolítico $G_{(Fe^{III})}$ y el coeficiente molar de absorción ϵ de los iones férrico son conocidos para diferentes condiciones de irradiación y de análisis. El incremento en la densidad óptica (absorbancia A) es determinada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 304 nm y es debido al incremento en la concentración de los iones férrico. El incremento es proporcional a la dosis absorbida hasta aproximadamente 200 Gy.

La dosis absorbida D_a es determinada a una temperatura dada a partir de los incrementos en la absorbancia y de los valores conocidos $G_{(Fe^{III})}$ y ϵ :

$$D_a = \frac{\Delta A}{G_{(Fe^{III})} \epsilon l \rho}$$

donde:

ΔA = incremento en la absorbancia de la solución

$G_{(Fe^{III})}$ = rendimiento radiolítico del ion férrico, (1.62×10^{-6} mol J^{-1}) para soluciones con presencia de oxígeno y a $25^\circ C$

ϵ = coeficiente molar de absorción del ion férrico (216.4 m² mol⁻¹ a 304 nm y $25^\circ C$)

l = longitud del paso de la luz en la solución (1cm)

ρ = densidad de la solución (1.024 kg dm^{-3})

3.4 Análisis de las muestras irradiadas

Se analizaron las muestras irradiadas para determinar el grado de descomposición de la cianocobalamina en solución acuosa y en la cianocobalamina en estado sólido

3.4.1 Espectrofotometría Ultravioleta

Aparato

La obtención de los espectros ultravioletas de la vitamina B₁₂ en solución acuosa, expuestas a diferentes dosis de irradiación, se realizaron mediante el empleo de un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer, modelo 553.

Procedimiento

Se prepararon soluciones acuosas de vitamina B₁₂ (1×10^{-3} mol L⁻¹), las cuales fueron irradiadas a diferentes dosis, obteniéndose los espectros ultravioleta respectivos (278, 361 y 550 nm). Se hizo un barrido de 600 nm a 200 nm para cada solución irradiada, para buscar la posible aparición de diferentes máximos de absorción.

3.4.2 Cromatografía de líquidos de alta presión

Aparato

Se hicieron las determinaciones en un cromatógrafo de líquidos de alta presión, marca Varian, modelo 9010 equipado con un detector espectrofotométrico visible-ultravioleta, marca Varian, modelo 9050. Como fase estacionaria se empleó una columna de acero inoxidable Hypersil ODS C-18, de tamaño de partícula de 3 μ m, la columna usada

fue de 15 cm de largo x 4.6 mm de diámetro interno, y un registrador marca Hewlett-Packard. La fase móvil fue una solución acuosa de metanol 25%, ácido acético 1% y sal sódica del ácido hexanilsulfónico 5×10^{-3} mol L⁻¹. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Razón de flujo de la fase móvil: 0.5 ml/min.

Presión: 130-136 atm.

Longitud de onda del detector variable con el tiempo: 0-25 min. 361 nm.

Volumen de inyección: 10 µl.

Velocidad del papel registrador: 0.5 cm/min.

Sensibilidad de detección: 0.1 a.u.f.s.

Procedimiento

Se elaboró una curva patrón de cianocobalamina para lo cual se prepararon soluciones acuosas de cianocobalamina de concentraciones de 1×10^{-6} a 1×10^{-3} mol l⁻¹, se inyectaron cada una de las soluciones por triplicado. Para cada muestra se registró el área bajo la curva de la señal obtenida y se obtuvo su regresión. Se trazó una gráfica de concentración de cianocobalamina contra área bajo la curva dando la ecuación de la recta.

Posteriormente, se prepararon soluciones acuosas de vitamina B₁₂ de concentración 1×10^{-5} mol l⁻¹ y 1×10^{-2} mol l⁻¹.

Se irradiaron a diferentes dosis, para la obtención del valor G⁰ y para el cálculo del % en pérdida de la vitamina. Se trazó una gráfica de valor G contra dosis de irradiación, expresado en Gy y se trazó otra gráfica del % en descomposición contra dosis de irradiación expresado en Gy para cada concentración utilizada.

Para la vitamina B₁₂ sólida, la dosis de irradiación a la que fueron expuestas fue del orden de 2 a 25 kGy. Se obtuvo el valor G⁰ y se trazó una gráfica del % en descomposición de la vitamina contra dosis de irradiación.

3.5 *Serratia marcescens*

3.5.1 Estudio del efecto de la radiación ionizante sobre *Serratia marcescens*.

Se utilizó en el experimento una cepa de *Serratia marcescens* con temperatura de crecimiento de 30 °C y a los 37 °C, ya que se ha observado que al sembrar este microorganismo e incubar a las 2 temperaturas (30 °C y 37 °C) presentan un diferente comportamiento y resistencia hacia los agentes desinfectantes y antimicrobianos, por lo que se optó por utilizar la *Serratia marcescens* con crecimiento a las dos temperaturas.¹⁰

Según los resultados obtenidos, la vitamina B₁₂ en solución acuosa es muy sensible a la radiación gamma, y su descomposición es muy alta a bajas dosis de irradiación por lo que no puede ser esterilizada en esas condiciones, mientras que para la vitamina B₁₂ en estado sólido muestra una alta resistencia a los efectos de la radiación a altas dosis, como se verá más adelante, por lo que se esterilizará vitamina B₁₂ sólida como materia prima.

3.6 Prueba de esterilidad

Se fundamenta en la detección de formas viables de microorganismos, en medios de cultivo adecuados para crecimiento de bacterias, hongos y levaduras, que se encuentran como contaminantes en productos estériles.

Para realizar las pruebas de esterilidad es necesario tener la responsabilidad y adiestramiento necesario para que se vigile, ejecute y controle cada paso de las mismas como son: limpieza y sanitización del cuarto limpio y de los equipos del área, verificación de la esterilidad de la vestimenta, guantes, material de trabajo.¹⁹

3.6.1 Materias primas

Medios de cultivo. Deben tener los nutrientes adecuadas para el desarrollo microbiano.

Se utilizaron medio fluido de tioglicolato y caldo de soya tripticaseína (19).

3.6.2 Equipo

Incubadoras. Deben estar calificadas en su instalación y funcionamiento, las temperaturas de incubación seleccionadas no deben variar más de ± 0.5 °C.

Se utilizaron dos incubadoras, a 35 °C y 25 °C.

3.6.3 Procedimiento

Para efectuar las pruebas de esterilidad, se hicieron de acuerdo con las pruebas especificadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, para esto primero deben certificarse las propiedades nutritivas de los medios de cultivo. (4)

Las pruebas de esterilidad se realizaron por el método directo. Para esto se utilizó un mililitro de una suspensión de microorganismos de *Serratia marcescens* que contiene 10^6 microorganismos/ml, los cuales fueron inoculados en tubos de vidrio estériles de 1 x 5 cm y se irradiaron a dosis de 1 a 6 kGy.

La experimentación se llevó a cabo como se indica en la tabla 6

Una vez que se irradiaron a la suspensión de microorganismos, estos se extrajeron en condiciones asepticas con una jeringa estéril, lo cual fué realizado para cada una de las muestras. Se colocaron 0.5 ml del microorganismo en tubos que contenían 15 ml de medio fluido de tioglicolato estéril y 0.5 ml en caldo de soya tripticaseína para todas las muestras, dejando un blanco del medio para comprobar la esterilidad del medio.

Los tubos con medio de tioglicolato incluyendo al blanco y al testigo del medio fueron incubados a 35°C durante 7 días, para los tubos conteniendo caldo de soya tripticaseína, se incubaron a 25°C durante 14 días.¹⁹

Los tubos fueron revisados diariamente para observar si había presencia de turbidez.

Para la *Serratia marcescens* con crecimiento a 30°C se siguió con el procedimiento anteriormente citado.

Tabla 6. Irradiación de la *Serratia marcescens*

Muestra	<i>Serratia marcescens</i> con crecimiento a los 37 °C	Dosis de irradiación (kGy)
1	1 ml	1
2	1 ml	2
3	1 ml	3
4	1 ml	4
5	1 ml	5
6	1 ml	6
Blanco	1 ml	0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectrofotometría ultravioleta

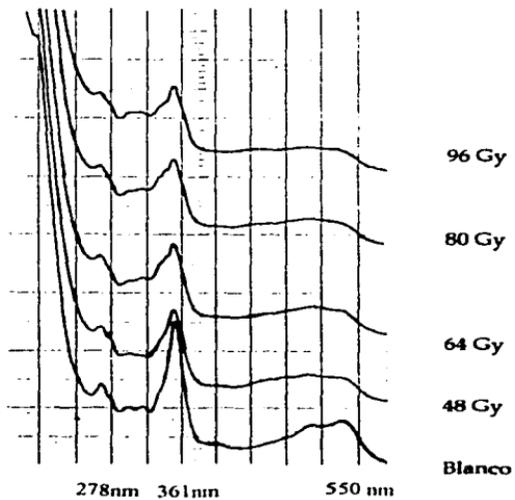
En la figura 2 se muestran los diferentes espectros ultravioleta para la vitamina B₁₂ en solución acuosa 1×10^{-5} mol l⁻¹, después de haber sido irradiadas con las dosis indicadas.

Pueden observarse 3 máximos de absorción, 278, 361 y 550 nm. Se observa una disminución en el pico de absorción a 361 nm, a medida en que se aumenta la dosis de radiación. Sin embargo, no se observa la aparición de nuevos picos de absorción.

Al irradiar soluciones acuosas de vitamina B₁₂ en ausencia de oxígeno, como ha sido mencionado en la literatura, la radiación actúa principalmente en el agua, siendo los eaq uno de los productos de la radiólisis del agua, éstos son agentes fuertemente reductores que actúan sobre el átomo central de cobalto de la vitamina reduciéndola a sus formas de Co (II) vitamina B_{12r} con un máximo de absorción a los 310 nm hasta Co (I) vitamina B_{12s} con su máximo de absorción a los 380 nm. Estas dos formas son altamente inestables y por la acción del oxígeno atmosférico óxida al átomo de cobalto pasando a su estado inicial de Co (III), por lo que la longitud de onda a la cual se hicieron las determinaciones de la B₁₂ irradiada fue a 361 nm. A esta longitud de onda se presenta el máximo de absorción para la molécula de vitamina B₁₂ Co (III).

Para prevenir la rápida oxidación, el análisis se llevó a cabo inmediatamente después de la irradiación.

Figura 2. Espectros de ultravioleta de vitamina B₁₂ a diferentes dosis de irradiación.



Cromatografía de líquidos de alta presión

En este proyecto el método de análisis utilizado para la determinación de la vitamina B₁₂ irradiada fue por Cromatografía de líquidos de alta presión, ya que es un método para separar una mezcla de varios componentes en sus componentes individuales.

Esta técnica es de alta precisión y reproducibilidad en sus resultados.

El cromatógrafo utilizado está equipado con el espectrofotómetro más selectivo que es el detector de UV y trabaja midiendo la absorción de Luz Visible o de Ultra Violeta que absorbe la muestra efluente de la columna. Se usó la absorción en UV, porque es la región en la que absorbe la vitamina B₁₂.

Cálculo del porcentaje de descomposición de la vitamina B₁₂

Se cuantificó el porcentaje de descomposición de la vitamina B₁₂ irradiada tanto en solución acuosa como en estado sólido por cromatografía de líquidos de alta presión.

En la figura 3 se muestran los resultados de la curva patrón obtenida de la vitamina B₁₂ que se utilizó para determinar el % en descomposición de la B₁₂ en las muestras irradiadas. De la regresión obtenida se tiene la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 1.086 \times 10^{11} (x) + 1.68 \times 10^4$$

x = concentración ($\mu\text{mol l}^{-1}$).

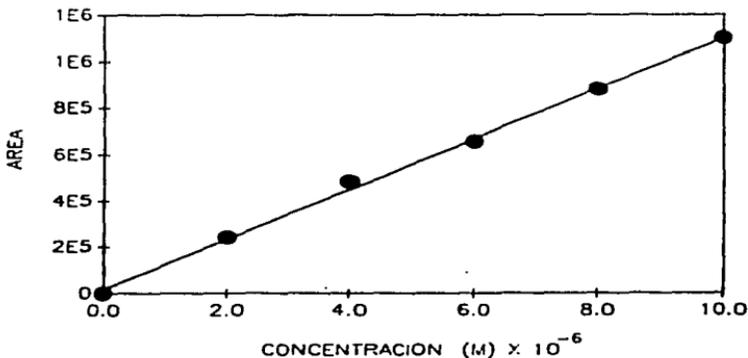


Figura 3. Curva patrón de vitamina B₁₂ en solución acuosa.

Efecto de la radiación gamma sobre la vitamina B₁₂

La vitamina B₁₂ fue irradiada en soluciones acuosas de 1×10^{-5} mol l⁻¹, 1×10^{-2} mol l⁻¹ y en estado sólido. Cromatogramas típicos del análisis de la vitamina B₁₂ se presenta en la figura 4.

En las figuras 5 y 6 se muestra el efecto de la dosis de radiación en la vitamina B₁₂ en solución acuosa a diferentes concentraciones. Como puede observarse hay una mayor descomposición de la vitamina B₁₂ a medida que la concentración baja a las mismas dosis de radiación. Debido a que el medio de reacción para ambas soluciones es acuoso y que el soluto (vitamina B₁₂) en comparación con el agua, se encuentra en concentraciones muy pequeñas, puede decirse que la interacción de la radiación en el sistema será en primer lugar con las moléculas del agua. Como ya se ha mencionado, los productos radiolíticos del agua son los que reaccionan con la vitamina B₁₂, provocando su descomposición.

Para la vitamina B₁₂ en estado sólido, la descomposición es mínima a altas dosis de irradiación como se muestra en la figura 7.

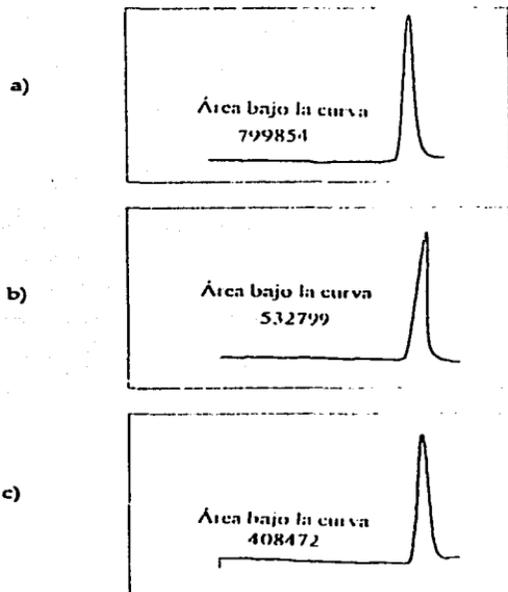


Figura 4. Cromatogramas obtenidos de la vitamina B₁₂ en solución acuosa de concentración 1×10^{-5} mol l⁻¹ cuando es expuesta a las dosis de radiación gamma de a) 8 Gy b) 16 Gy y c) 24 Gy.

Como se observa en la figura 4, se obtienen diferentes áreas bajo la curva del mismo pico con tiempo de retención de 20.5 min. Además, puede observarse que no se obtienen otros productos radiolíticos diferentes a la vitamina B₁₂ reducida.

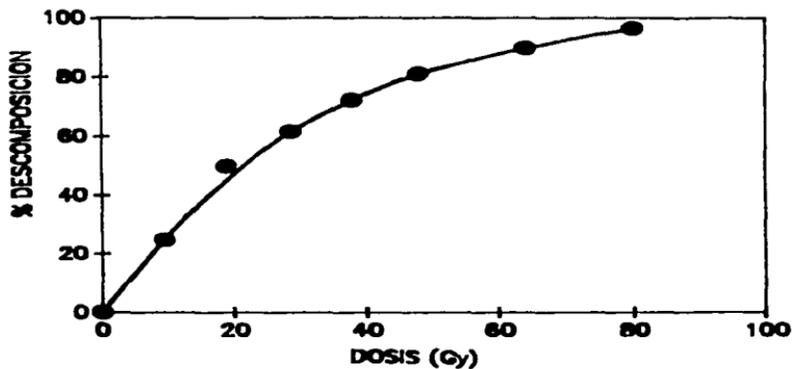


Figura 5. Porcentaje de descomposición de la vitamina B₁₂ en solución acuosa de concentración $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ expuesta a diferentes dosis de radiación.

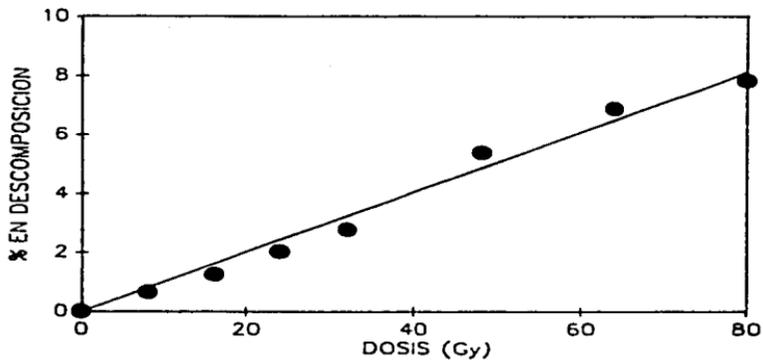


Figura 6. Porcentaje de descomposición de la vitamina B₁₂ en solución acuosa de concentración $1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ expuesta a diferentes dosis de radiación.

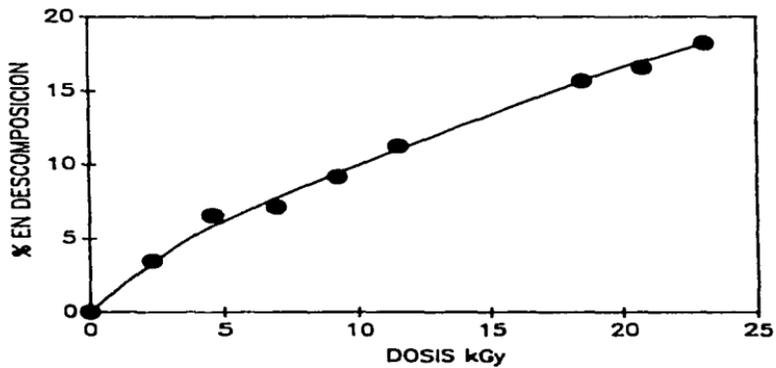


Figura 7. Porcentaje de descomposición de la vitamina B₁₂ en estado sólido expuesta a diferentes dosis de radiación.

Efecto de la concentración de vitamina B₁₂

Los datos que se obtuvieron del porcentaje de descomposición de la vitamina B₁₂ a diferentes concentraciones se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de descomposición de la vitamina B₁₂ a diferentes concentraciones en solución acuosa.

Dosis (Gy)	Conc ₁ (1×10^{-5} mol l ⁻¹)	Conc ₂ (1×10^{-2} mol l ⁻¹)
8	24.7 %	0.65 %
16	49.8 %	1.25 %
24	61.5 %	2.03 %
32	72.3 %	2.78 %
48	81.0 %	4.38 %
64	89.8 %	5.39 %
80	96.6 %	6.89 %

Se observa que la concentración de vitamina ejerce un papel muy importante en la descomposición radiolítica de la vitamina B₁₂. A mayor concentración la descomposición de la B₁₂ es menor.

Se obtuvieron los diferentes valores G de la vitamina B₁₂ en solución acuosa en el intervalo de dosis estudiado. Al hacer la gráfica el valor G vs Dosis de irradiación (eV ml⁻¹) se obtiene la siguiente curva para la vitamina B₁₂ en solución acuosa 1×10^{-3} mol l⁻¹.

Al interpolar la curva al eje de las ordenadas se determina el valor G^o (rendimiento radiolítico inicial) de 3.25.

De manera similar se obtuvo un valor de G^o = 0.088 en la solución de vitamina B₁₂ de concentración 1×10^{-2} mol l⁻¹.

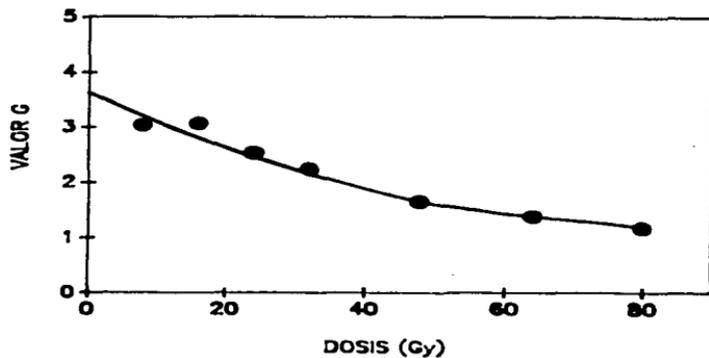


Figura 8. Determinación del valor G° de descomposición de la vitamina B₁₂ en solución acuosa a una concentración de $1 \times 10^5 \text{ mol l}^{-1}$.

En la figura 9 se muestra la gráfica del valor G de descomposición de vitamina B₁₂ en estado sólido. Al interpolar la curva, se obtiene el valor $G^{\circ} = 2.1 \times 10^{-3}$.

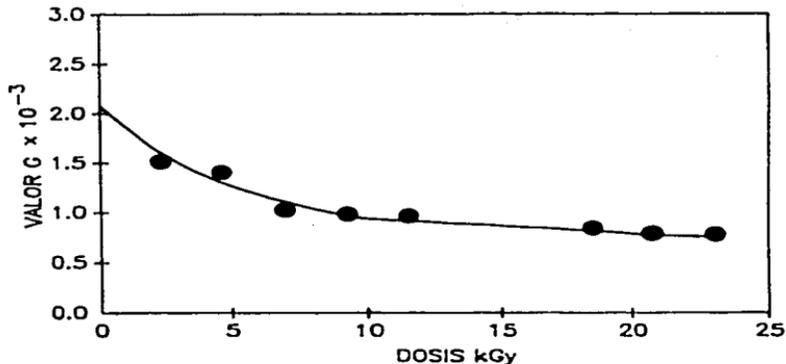


Figura 9. Determinación del valor G° de descomposición de la vitamina B₁₂ en estado sólido.

Valor G° de descomposición para la vitamina B_{12} en solución acuosa y en estado sólido

Se encontró por este método de análisis (Cromatografía de líquidos de alta presión) los siguientes valores G° de descomposición para la vitamina B_{12} en solución acuosa y en estado sólido:

Para la vitamina B_{12} en solución acuosa de concentración $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ su $G^{\circ} = 3.25$, que comparado con lo publicado anteriormente por los diferentes investigadores [$G = 2.6^{14}$, $G = 2.12^{15}$], los cuales hicieron sus determinaciones por Espectroscopía Ultra Violeta, es más alto.

Esta diferencia puede ser por el método de análisis empleado, puesto que ellos realizaron sus determinaciones por espectroscopía Ultra Violeta, en este método la lectura de absorbancia incluye a la vitamina B_{12} y a otros productos radiolíticos que pueden absorber a la misma longitud de onda y en el caso de la cromatografía de líquidos de alta presión hay una real separación de los componentes de la muestra irradiada y su determinación será individual.

El valor G° de descomposición para la B_{12} de concentración $1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ es de 0.088. A esta concentración no se encontró ningún valor G° publicado.

Para la B_{12} en estado sólido el valor $G^{\circ} = 2.1 \times 10^{-3}$ que no puede ser comparado con otros valores encontrados anteriormente, ya que el único valor G publicado fue por Blackburn y colaboradores¹⁴ que es de 0.6, y no se hace referencia de las dosis empleadas para la irradiación de la vitamina B_{12} en estado sólido.

Resultados de las pruebas de esterilidad:

Tabla 8. Medio fluido de tioglicolato. Incubación 7 días. Temperatura de incubación 35 °C. Inóculo 10⁶ microorganismos ml⁻¹

Muestra	Dosis (kGy)	<i>S. marcescens</i> 37 °C	<i>S. marcescens</i> 30 °C
Blanco	0	+++	+++
1	1	+++	+++
2	2	+++	++
3	3	+++	++
4	4	++	+
5	5	++	+
6	6	+	+
Testigo medio	0	-	-

(+++) Máximo crecimiento, (++) crecimiento medio, (+) crecimiento mínimo y (-) ausencia de microorganismos viables.

Tabla 9. Caldo de soya tripticaseína. Incubación 14 días. Temperatura de incubación 25 °C. Inóculo 10⁶ microorganismos ml⁻¹.

Muestra	Dosis (kGy)	<i>S. marcescens</i> 37 °C	<i>S. marcescens</i> 30 °C
Blanco	0	+++	+++
1	1	+++	++
2	2	+++	++
3	3	+++	++
4	4	++	+
5	5	+	+
6	6	+	+
Testigo medio	0	-	-

(+++) Máximo crecimiento, (++) crecimiento medio, (+) crecimiento mínimo y (-) ausencia de microorganismos viables.

Según los resultados obtenidos se observa que la *Serratia marcescens* es muy resistente a la radiación gamma. A la dosis de 5 y 6 kGy el crecimiento es mínimo en ambos caldos, pero no se llega a la esterilidad, por lo que no pasan la prueba en el intervalo de dosis de radiación aplicado.

Estos resultados nos indican que se requiere de una dosis mayor aplicada a estos microorganismos para su eliminación.

Como uno de los objetivos de este proyecto fue esterilizar la vitamina B₁₂ en estado sólido, y el estudio realizado anteriormente del % en descomposición de la B₁₂ sólida a ~6 kGy, el % de descomposición fue del 7%, por lo que aún se tiene un gran margen para utilizar mayor cantidad de radiación ionizante en la eliminación de estas bacterias.

La vitamina B₁₂ en soluciones acuosas diluidas (1×10^{-5} mol l⁻¹) a pH de 4.5 y en ausencia de O₂ son altamente radiolizables a bajas dosis de radiación, por lo que no pueden ser esterilizadas por el método de radioesterilización, ya que las dosis utilizadas en el proceso de esterilización por radiación gamma son del orden de 10 kGy.⁹

CONCLUSIONES

1. La vitamina B₁₂ en solución acuosa mostró ser muy sensible a la radiación ionizante.

La descomposición de la vitamina B₁₂ está en función de la concentración, está ejerce un papel muy importante en la descomposición radiolítica de la vitamina B₁₂. Al aumentar la concentración de la B₁₂ hasta llegar al estado sólido su descomposición disminuye.

2. Al incrementar la dosis de radiación, la descomposición radiolítica de la vitamina B₁₂ en soluciones acuosas aumenta.

En el caso de la vitamina B₁₂ en estado sólido, se tiene el mismo comportamiento, aunque las dosis utilizadas sean del orden de kGy.

3. Al calcular el porcentaje de descomposición de las soluciones acuosas irradiadas de vitamina B₁₂ se obtuvo para la concentración de 1×10^{-5} mol l⁻¹ a la dosis de 80 Gy, una descomposición del 96.6 % , mientras que para la solución acuosa de B₁₂ de concentración 1×10^{-2} mol l⁻¹ a la misma dosis, la descomposición fue solamente del 6.9 %. Para la vitamina B₁₂ en estado sólido las dosis de radiación aplicadas fueron del orden de kGy y la descomposición que se obtuvo fue de 0.65 % a una dosis de 2.3 kGy.

4. Los valores G° de descomposición obtenidos para la vitamina B₁₂ son los siguientes:

Solución acuosa $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ $G^\circ = 3.25$

Solución acuosa $1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ $G^\circ = 0.088$

En estado sólido $G^\circ = 2.1 \times 10^{-3}$

5. Las dosis aplicadas de radiación ionizante al microorganismo *Serratia marcescens* permitió conocer que se requiere de dosis del orden de kGy para poder ser eliminada en su totalidad.

6. A una dosis de 6 kGy en la cual la vitamina B₁₂ en estado sólido se descompone en forma despreciable, la *Serratia marcescens* ya presenta un mínimo de crecimiento.

REFERENCIAS

1. Goodman S., Goodman A., Gilman A. (1982). **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.**, 6^{ta} ed. Editorial Médica Panamericana, Herschel 153 México 5, D.F., págs. 1301-1304.
2. Garrett, R. H., Grishman, C. M. (1995). **Biochemistry**, Saunders College Publishing., Orlando, págs. 485-489.
3. Spinks J. W. T., and Woods R. J. (1990). **An Introduction to Radiation Chemistry.** 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 480.
4. Laughlin, W. L., Boyd, A. W., Chadwick, K. H., Donald, J. C., and Miller A. (1989). **Dosimetry for Radiation Processing.** Taylor and Francis., London, págs. 53-54 y 143-145.
5. Draganic I. G., Draganic, Z. and Adloff, J. P. (1990). **Radiation and Radioactivity on Earth and Beyond.** CRC Press Inc., Boca Ratón Florida, págs 74-82.
6. Draganic I. G., and Draganic, Z. (1971). **The Radiation Chemistry of Water.** Academic Press., New York, págs. 203-206.
7. Proctor, B. E. and Golblith, S. A. (1971). **Effects of Ionizing Radiation on Food Nutrients in: Nutritional Evaluation of Food Processing.** Harris and Loesecke, V. eds Avi Publishing Company., Westport Conn, págs. 133-144.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

8. Farkas, J. (1983) Radurization and acididatation of spices. In **Preservation of Food by Ionizing Radiation**. Vol III., Edited by E. S. Josephson and M. S. Peterson, págs. 109-128.
9. Azis, N. H., El. Fouly, M. z., Abu. Shady, M. R. and Moussa, L. A. A. (1997). **Effect of Gamma Radiation on the Survival of Fungal and Actinomycetal Florae Contaminng Medicinal Plants**. Appl. Radiat. Isot. 48, 71-76.
10. Bergey, D. H. 1974. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**, eds. Williams & Wilkins., Baltimore, págs. 477-483.
11. Shubert, J. (1974). **Irradiation of Food and Food Constituents, in Proceedings of a Panel on Improvement of Food Quality by Irradiation.**, Vienna., IAEA, 18-22. June 1973. IAEA-PL-561/1, págs. 1-38.
12. Tobback, P. P. Elias, P.S. y Cohen, A.J. (1977). **Radiation Chemistry of Vitamina, in: Radiation Chemistry of Major Food Components**, Elsevier Scientific Publishing Company., Amsterdam, págs. 187-211.
13. Markakis, P. C. Golblith, S. A. and Proctor, B. E. (1951). **Effect of Ionizing Radiations on Vitamin B₁₂**. Nucleonics, 9, 71-72.
14. Blackburn, R., Cox, D. L. and Phillips G. O. (1972). **Effect Gamma Radiation on Vitamin B₁₂ Systems**, J. Chem. Soc. Faraday I, 68, 1687-1696.
15. Urbain, W. M. (1986). **Food Irradiation**. Academic Press., New York.

16. Faraggi, M., and Leopold, J. G. (1973). **The Reduction of Cobalamin A Pulse Radiolysis Study**; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**, 413-420.
17. Blackburn, R., Erkol, A. Y. Phillips, G. O. and Swallow, A. J. (1974). **One Electron Reactions in some Cobalamins**. *J. Chem. Soc. Trans. Faraday I*, **70**, 1673-1701.
18. Kishore, K. Moorthy, P. N. and Rao, K. N. (1980). **Role of H_2O_2 in the Radiolysis of B-Group Vitamins in Neutral Aqueous Solutions. Part Y. Reactions with Vitamin Radicals Produced by OH Radical Reaction**. *Rad. Effects Let.* **67**, 153-159.
19. Secretaría de Salud. 1994. **Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos**. 6^a de., págs. 155-160.