

00528
61



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"DESARROLLO DE UN SISTEMA AUTOMATIZADO PARA DETERMINAR VITAMINA B₁₂."

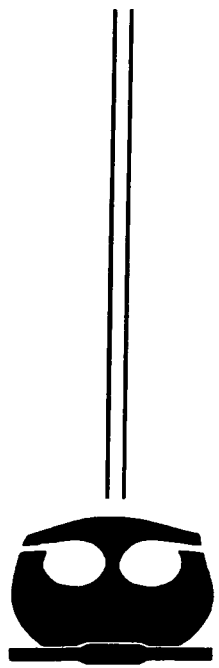
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GUSTAVO MEDINA ALONSO



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D.F.

2003



A



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.

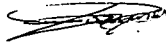
JURADO ASIGNADO

Presidente	M en C. Francisca Iturbe Chiñas
Vocal	M en C. Francisco Rojo Callejas
Secretario	Dra. María del Pilar Cañizares Macías
1 ^{er} Suplente	M en C. Lucía Cornejo Barrera
2 ^o Suplente	Prof. Luz Sandra Sánchez del Ángel

El presente trabajo se desarrolló en:

Laboratorio 105, Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado.
Edificio B, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR del TEMA:



Dra. María del Pilar Cañizares Macías

SUSTENTANTE:



Gustavo Medina Alonso

DEDICADA

A MIS PADRES

A ustedes que me han visto crecer y que junto conmigo han vivido cada una de las etapas de mi vida.

Gracias al gran esfuerzo, sacrificio, impulso y apoyo a lo largo de toda mi vida, en la cual cada uno de mis logros y triunfos también son de ustedes y para ustedes.

Por el ejemplo que me proporcionaron de sacrificio, lucha y trabajo que me marco el camino y lo ha dirigido para lograr una de las metas más difíciles de mi vida y que solo me abre las puertas de pruebas aun más difíciles de superar, pero que gracias a ustedes cuento con las herramientas necesarias para afrontarlas.

GRACIAS por darme la herencia más preciada que pudieron brindarme.

C

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Pilar. Por brindarme el apoyo y la confianza para la realización de este proyecto además de la enorme paciencia.
- A mis compañeros del laboratorio. Minerva, Noemí, Fernando, Araceli y Arturo, por su apoyo, accesoria, amistad, el intercambio de conocimientos y comentarios que me ayudaron a mejorar.
- A la banda de la facultad por hacer de mi estancia en la UNAM una de las mejores etapas de mi vida.
- A mis hermanos, Elena, Armando, Herbie por apoyarme cuando los necesite, en las buenas y en las malas.
- A las personas que no se encuentran presentes pero que de alguna forma influyeron en el logro de este objetivo.

POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU

D

DEDICATORIAS ESPECIALES

INDICE

Capítulo I

Resumen	1
Objetivos	4

Capítulo II

Antecedentes	5
2.1 Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	5
2.1.1 Elementos esenciales para FIA	8
2.1.2 Diagrama	10
2.1.3 Parámetros generales de un método FIA	11
2.2 Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	13
2.2.1 Descripción general de la Vitamina B ₁₂	14
2.2.2 Metabolismo	16
2.2.3 Funciones	17
2.2.4 Producción	18
2.2.5 Métodos de análisis	20
2.2.6 Métodos de extracción de Vitamina B ₁₂	22

Capítulo III

Metodología

3.1 Reactivos	26
3.2 Diluciones y muestras	27
3.3 Equipo y material	30
3.4 Determinación de condiciones óptimas de trabajo para la determinación de vitamina B ₁₂ por FIA	31
3.5 Elaboración de la curva patrón para la Vitamina B ₁₂	32
3.6 Determinación del límite de detección y cuantificación	33
3.7 Preparación de muestras	36
3.7.1 Preparación del extracto de leche (extracción de la Vitamina)	36
3.8 Purificación de la Vitamina B ₁₂	37
3.8.1 Purificación utilizando resinas de intercambio iónico	37
3.8.2 Sistema de purificación utilizando una cámara de diálisis	40
3.8.2.1 Purificación de la vitamina B ₁₂ usando la cámara de diálisis acoplada a una configuración de flujo continuo	41

f

Capítulo IV

Resultados	44
4.1 Determinación experimental de los espectros de los máximos de absorción	44
4.2 Curva de calibración de la Vitamina B ₁₂	46
4.2.1 Cálculo del límite de detección	48
4.2.2 Cálculo del límite de cuantificación	51
4.3 Tratamiento de muestras	52
4.3.1 Extracción de la Vitamina B ₁₂ de la leche utilizando ácido Tricloroacético	52
4.3.2 Fortificación de muestras de leche con Vitamina B ₁₂	53
4.3.3 Estudio de la eliminación de interferencias	55
4.3.3.1 Uso de resinas de intercambio	55
4.3.3.2 Análisis del flujo de alimentación de la muestra con el portador	58
4.4 Extracción de la vitamina B ₁₂ utilizando una cámara de diálisis acoplada a una configuración de flujo continuo	61
4.4.1 Estudio de la cámara de diálisis utilizando un circuito cerrado en una configuración de flujo continuo	63
4.5 Curva de calibración para las muestras dializadas	66
4.5.1 Curva de calibración para el extracto de leche	69
4.5.2 Curva de calibración para la leche fortificada y sin tratamiento de precipitación ácida	71

Capítulo V

Conclusiones	75
--------------	----

Capítulo VI

Bibliografía	77
--------------	----

Capítulo I

Resumen

La vitamina B₁₂ se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos de origen animal pero en concentraciones muy pequeñas que hace difícil su cuantificación por métodos fisicoquímicos. Esta cuantificación es importante en algunos sectores de la industria alimentaria donde es indispensable su determinación. La mayoría de las metodologías para su determinación están enfocadas a complementos multivitamínicos y soluciones inyectables, las cuales no poseen una gran complejidad de sus componentes como es el caso de los alimentos.

El método oficial de análisis de vitamina B₁₂ también está dirigido a muestras simples como las mencionadas anteriormente, haciendo uso de metodologías que consumen mucho tiempo de análisis y son menos precisos, como el caso de los métodos microbiológicos, además, de que presentan diferencias en la especificidad en el análisis.

La técnica que más se está utilizando debido a sus características de selectividad es la cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC), la cual disminuye los tiempos de análisis y los costos en comparación con los métodos microbiológicos; pero mantiene el inconveniente de que solo se tratan muestras de naturaleza simple o es necesario llevar a cabo un tratamiento largo de manipulación de las muestras para su purificación.

En base a lo expuesto con anterioridad, en este trabajo se propone un método más sencillo y rápido para extraer en continuo vitamina B₁₂ en leche utilizando una cámara de diálisis acoplada a una configuración de flujo continuo con el objetivo de

obtener un sistema sensor donde la extracción y la detección tienen lugar secuencialmente en el espacio y en el tiempo.

La cuantificación de la vitamina en leche se basa en la capacidad de la misma de absorber energía de UV a una longitud de onda máxima de 361 nm que la distingue del resto de las vitaminas del complejo B.

En primer lugar se extrajo la vitamina B₁₂ existente en la leche haciendo uso del ácido tricloroacético el cual produce la precipitación de las proteínas, lográndose que la vitamina se quede en la fase acuosa, después de la centrifugación.

El extracto que se obtuvo presentó interferencias probablemente producidas por proteínas hidrosolubles de la muestra. Para garantizar que la vitamina se extraía de la leche se fortificaron las muestras antes de ser sometidas al proceso de extracción y se registró la señal. Se observó que se incrementaba la señal con respecto a la concentración adicionada de vitamina, lo que garantizó que la vitamina se extraía de la muestra de leche, pero aun así la señal continuaba teniendo interferencias.

Para separar a la vitamina B₁₂ de las interferencias se trabajó con resinas de intercambio iónico determinándose el tipo de resina y las condiciones de trabajo.

En este caso se usaron resinas de intercambio de naturaleza catiónica que se empacaron en una columna que se acopló a la configuración FIA. El pH óptimo fue de 4.0, proporcionado por una disolución amortiguadora de acetatos que se utilizó como portador y agua destilada como medio de elusión de la vitamina B₁₂ retenida en la resina. El desempeño de la misma fue bajo ya que se logró una preconcentración de vitamina de tan solo 1.2 veces con respecto a la concentración inicial de vitamina que se hizo pasar a través de la resina además de que el tiempo

de análisis era demasiado largo. Es por esto que se utilizó otro método para purificar a la vitamina B₁₂.

Con este fin, se utilizó una cámara de diálisis acoplada al sistema FIA para la eliminación de las interferencias. La cámara de diálisis ocasionó que se hiciera una modificación de la configuración de flujo continuo, donde se utilizaron dos válvulas de inyección que formaban un circuito cerrado para mantener en forma continua el paso de la vitamina a través de la membrana incrementándose su concentración en el líquido receptor. Se logró eliminar interferencias en la señal analítica y se incrementó la señal de la vitamina disminuyendo el factor de dilución. Con esta técnica es posible manejar muestras con naturalezas muy distintas que pueden ir de una disolución de vitamina pura a una matriz compleja como la leche obteniéndose resultados confiables.

Objetivos

a) Objetivo General

Desarrollar un sistema automatizado para determinar vitamina B₁₂ en leche acoplado la extracción, purificación y la detección a una configuración de análisis por inyección en flujo utilizando un espectrofotómetro de UV como detector.

b) Objetivos Particulares

- Optimizar las condiciones de trabajo para la cuantificación de la vitamina B₁₂ mediante el Análisis por Inyección en Flujo (FIA).
- Cuantificar la vitamina B₁₂ mediante la espectrofotometría de UV.
- Realizar la extracción de vitamina B₁₂ en leche.
- Realizar la purificación de vitamina B₁₂ en leche
- Comparar la purificación de la vitamina B₁₂ en muestras de leche utilizando diferentes tratamientos (químicos y/o mecánicos).

Capítulo II

Antecedentes

La necesidad de mejorar o ampliar los métodos analíticos adaptándonos a las demandas crecientes de la sociedad, ha impulsado el crecimiento y nacimiento de muchos aspectos de la Química Analítica. Uno de ellos es el desarrollo de los Métodos Automáticos de Análisis que se caracterizan por un fundamento simple, un manejo sencillo y cómodo y una gran capacidad para lograr resultados que son sorprendentes dadas sus características de rapidez, precisión y exactitud. El uso de los Métodos Automáticos de Análisis va ligado al concepto de sustitución de una operación o medida estática realizada manualmente por una operación o medida continua o secuencial. Esta concepción fue introducida por Skeegs en 1957 al describir el primer sistema de análisis segmentado en flujo continuo, y que constituye el primer paso en el desarrollo de los métodos automáticos, que pueden adaptarse a todo tipo de necesidades sin cambios técnicamente complejos, por otra parte hay que resaltar lo fácil que es para el investigador intervenir directamente en su funcionamiento, lográndose una optimización del propio sistema (1).

2.1 Análisis por inyección en flujo (FIA)

El Análisis por Inyección en Flujo (FIA, por sus siglas en inglés, Flow Injection Analysis) es una modalidad del Análisis en Flujo Continuo (CFA). El CFA puede presentar también un flujo segmentado que lo hace definirse como SFA, cuya característica principal es la insertar sucesivamente en el flujo burbujas de aire para evitar la contaminación mutua de las muestras, dividiendo el flujo en trozos separados (segmentados).

El diseño básico de un sistema SFA consta de cinco partes esenciales:

1. Sistema de toma de muestras. Su función consiste en aspirar un volumen dado de muestra contenida en un posillo de un muestreador. Entre muestra y muestra la pipeta aspiradora toma una porción de aire.
2. Sistema de propulsión. Formado por una bomba peristáltica.
3. Sistemas intermedios. Que puede estar formado de acuerdo a los requerimientos del análisis por columnas de intercambio, reactores, etc.
4. Sistema de eliminación de burbujas de aire. Se encuentra dentro de la misma configuración en la cual el flujo llega a un punto de confluencia en el que se divide en dos flujos, uno compuesto por burbujas y algo de líquido y que se encuentra orientado hacia arriba por donde son eliminadas y otro que va al detector (muestra).
5. Sistemas de detección. Los cuales estarán en función del tipo de determinación que se este realizando, dentro de los cuales se pueden encontrar espectrofotómetros de UV, fluorescencia y detectores electroquímicos, entre otros.

La presencia de burbujas de aire en SFA origina una serie de inconvenientes:

- El sistema se complica técnicamente, impidiendo su miniaturización.
- Deben incorporarse mecanismos de introducción y de eliminación de burbujas perfectamente reproducibles.
- Se introduce electricidad estática en el sistema, que altera la respuesta en los detectores electroquímicos.

- El control del caudal es más difícil en presencia de aire, por la diferente interacción del aire con materiales diversos con los que se encuentra en un montaje.

Por todo ello, la ausencia de burbujas de aire en el sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) presenta indudables ventajas que lo potencian como una importante alternativa en Química Analítica, ya que se trata de un apartado de los métodos automáticos de análisis, pero que presenta una diferencia importante en relación con el conjunto de los mismos. Esta consiste en su diseño para el análisis de muestras inyectadas, por lo que los rasgos esenciales del FIA son los siguientes:

- El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de CFA.
- La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada en el mismo.
- Se realiza un transporte del "trozo" inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte.
- La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada.
- En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa).
- El tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

De todo lo expuesto cabe resaltar cuatro aspectos clave de la metodología

FIA:

- Flujo no segmentado
- Inyección directa
- Dispersión parcial controlada
- Tiempo de operación reducido

2.1.1 Elementos esenciales para FIA

1.- Unidad de propulsión

Establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución (o de varias) que lleva disuelto un reactivo o hace de simple portador. Puede ser una bomba peristáltica, un sistema de presión gaseosa, o bien la simple fuerza de la gravedad.

2.- Sistema de inyección

Permite insertar o introducir en el flujo un volumen exactamente medido de la muestra con gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el mismo.

3.- Zona de tubo

Llamada comúnmente "reactor", y es donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional. Puede ser un tubo recto, en forma de serpentín, relleno o no de bolitas inertes, o bien tener una cámara de mezcla, un tubo relleno de material inerte o activo químicamente (redox, cambio iónico, etc).

4.- Celda de flujo

Incorporada a un instrumento de medida (colorímetro, fotómetro, fluorímetro, potenciómetro, etc.) que transduce la señal en forma continua a un registrador y/o un microprocesador.

En la figura 1 se muestra un esquema en que se muestran los componentes más representativos de una configuración FIA.

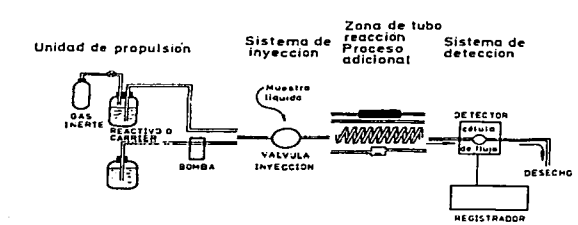


Figura 1. Componentes principales en una configuración FIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.2 Diagrama

Un diagrama es la representación gráfica de la señal analítica (absorbancia, intensidad de fluorescencia, potencial, etc.) en función del tiempo, cuyas características principales son (figura 2):

- Altura de pico (h).- Se relaciona con la concentración del componente de la muestra inyectada que se determina.
- Tiempo de residencia (T).- Es el tiempo transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza la máxima señal.
- Tiempo de retorno (T').- Es el tiempo comprendido entre el momento en que se alcanza la máxima señal y el instante en que la señal vuelve a la línea de base.
- Tiempo durante el cual aparece la señal (Δt).- Período en el cual la señal sale y vuelve de nuevo a la línea de base, y que es una manera de definir la dispersión o dilución del analito.

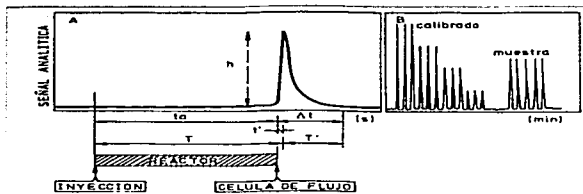


Figura 2. Representación gráfica de una señal analítica obtenida en un sistema FIA. A: corresponde a las características de una señal analítica para cada inyección de muestra al sistema. B: Diagrama obtenido de una serie de inyecciones del analito al sistema.

2.1.3 Parámetros generales de un método FIA

La metodología de análisis de inyección de flujo continuo presenta parámetros que lo distinguen de otras metodologías de análisis semejantes como el análisis en flujo continuo ya que se trata de un apartado de los métodos automáticos de análisis, pero que presenta diferencias importantes que le proporcionan su propia identidad. En la tabla 1 se muestran los parámetros más representativos de un método FIA y su comparación con SFA.

	FIA	SFA
Introducción de la muestra	Inyección	Aspiración
Volumen de la muestra	10 -100 μ L	0.2 a 2.0 mL
Tiempo de respuesta	3 a 60 s	2 a 30min
Diámetro 1. Tubo	0.5 a 0.7 mm	0.5 a 0.7 mm
Detección realizada	Con dispersión controlada	Régimen de equilibrio
Capacidad	Hasta 300 muestras /h	Hasta 80 muestras /h
Precisión	1-2 %	1-2 %
Gasto de reactivos	Bajo	Bajo
Ciclo de lavado	no esencial	no esencial
Análisis cinético continuo	stopped-flow	No es posible
Valoraciones	SI	SI
Datos suministrados	Altura-pico, área-pico, ancho-pico, distancia entre pico-pico	Altura de pico

Tabla 1. Parámetros más representativos que caracterizan a un método FIA con respecto a uno de SFA.

El Análisis por Inyección en Flujo (FIA) presenta una gran versatilidad que lo hace una herramienta poderosa para el análisis de muestras con una gran variedad de naturalezas (sólidos, líquidos, matrices complejas como alimentos, mezclas de analitos, etc). Por ejemplo se puede realizar la determinación de glutamato en muestras alimenticias haciendo uso de un reactor enzimático acoplado a la configuración FIA (2). Otro ejemplo de una muestra con una naturaleza totalmente diferente es la determinación fluorimétrica de fluoruros en muestras de agua, en la

cual se eliminan las interferencias haciendo uso de una extracción en fase sólida acoplada a una configuración FIA (3).

Otra aportación a la versatilidad de esta técnica de análisis se debe a la gran facilidad con la que se pueden modificar las configuraciones, acoplándose a las necesidades del análisis. Por ejemplo, se pueden manejar de manera individual o simultánea múltiples detectores en línea (UV, IR, $^1\text{H-NMR}$ y MS) que proporcionan la información requerida para obtener los resultados más confiables (4).

2.2 Vitamina B₁₂ (cianocobalamina)

El análisis de la vitamina B₁₂ por métodos físico-químicos es muy difícil debido a la concentración excepcionalmente baja, comparada con la de las otras vitaminas del complejo B, en que esta vitamina se encuentra en la naturaleza. En consecuencia, este tipo de análisis puede aplicarse únicamente a disoluciones relativamente concentradas de vitamina B₁₂, preparaciones farmacéuticas y, en algunos casos, extractos de hígado y concentrados de piensos ricos en esta vitamina, productos lácteos como leche, queso, yogurt, etc., siempre que sea posible separar la vitamina B₁₂ de las impurezas interferentes (5).

Los métodos microbiológicos pueden emplearse para el análisis de vitamina B₁₂ en alimentos y otros productos naturales, aunque se consideran más específicos, consumen mucho tiempo en su ejecución y son menos precisos. Se han empleado los siguientes métodos para la determinación microbiológica de la vitamina B₁₂:

- Prueba con *Ochromonas malhamensis*.
- Prueba con *Euglenia gracilis*.
- Prueba con *Lactobacillus leichmannii*.

En los cuales es necesario manipular la muestra que contiene a la vitamina B₁₂ hasta obtener una solución relativamente pura que es agregada al medio de cultivo que contiene al microorganismo, seguido de la incubación a 37°C por 24 horas y se cuantifica la densidad óptica de las disoluciones con un fotómetro a 436 nm, utilizando como referencia una curva de calibración elaborada previamente.

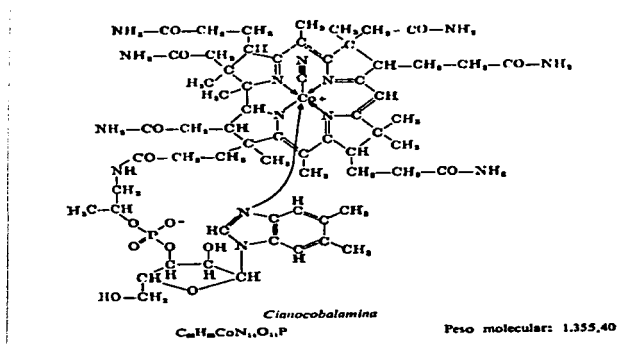
Existen diferencias en la especificidad de los diversos métodos microbiológicos aplicables al análisis de la vitamina B₁₂ de acuerdo al microorganismo que se emplee, por lo cual se prefieren los análisis que no involucren un largo periodo de tiempo y que los resultados que se obtengan estén en función del tipo de microorganismo que se emplee (5,6).

Los métodos físico-químicos más importantes para la determinación de la vitamina B₁₂ se basan en la absorción de luz de la propia vitamina en disolución acuosa, o bien en la determinación fotométrica del grupo cianuro de la cianocobalamina (5, 7, 8).

2.2.1 Descripción general de la Vitamina B₁₂

La cianocobalamina es un compuesto cristalino de color rojo (debido al complejo de cobalto porfirínico) o polvo cristalino soluble en agua (1:8), alcohol y fenol; insoluble en acetona, cloroformo y éter. En forma anhidra es muy higroscópico y expuesto al aire absorbe hasta 12% de humedad (9).

La figura 3. Muestra la molécula de la vitamina B₁₂, en la cual se observa su complejidad y el grupo ciano por medio del cual muchos métodos determinan la concentración de ésta (5).

Figura 3. Molécula Vitamina B₁₂.

Los compuestos con actividad de vitamina B₁₂ tienen unido a su anillo un átomo de cobalto y la vitamina es referenciada como cianocobalamina, presentándose como metil, adenosil, hidroxil y acuacobalaminas. Adenosil e hidroxicobalaminas son las formas más comunes en alimentos, aunque metilcobalaminas son encontradas en huevo y quesos. Casi todos los productos animales contienen vitamina B₁₂ y esta puede también ser sintetizada por ciertas algas y bacterias (6, 7).

Las principales fuentes de vitamina B₁₂ son:

- Mohos y bacterias
- Tallos y raíces de algunas plantas producen hasta 0.01 µg de Vitamina B₁₂.
- Espinaca, soya, productos fermentados entre otras.
- Productos lácteos como quesos, leche, yoghurt.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Huevo, pollo, sardinas (6, 10)

La vitamina B₁₂ o cianocobalamina tiene funciones vitales en el sistema nervioso y en la división o reproducción celular. Ha sido muy utilizada médicamente como un "tónico y regenerador". Se sabe que la vitamina B₁₂ puede curar la anemia perniciosa, pero algunos médicos han reportado que sus pacientes mejoran considerablemente de síntomas tales como apetito, estado anímico, vigor general y que se recuperan más rápidamente de cirugías aún sin tener deficiencias aparentes de esta vitamina. Aunque no se sabe de estudios bien realizados que documenten estas observaciones clínicas, recientes hallazgos muestran que los beneficios que los médicos han reportado clínicamente, pueden tener buen fundamento científico (10).

2.2.2 Metabolismo

Bajo condiciones fisiológicas hay tres tipos de proteínas que se unen a la vitamina B₁₂ para su absorción:

- La haptocorrina
- El factor intrínseco
- La transcobalamina

La vitamina es liberada de los alimentos por la acción de los ácidos y la pepsina del estómago, aquí se une con la haptocorrina secretada en la saliva con una afinidad que persiste al pH ácido del jugo gástrico (6).

En el duodeno la haptocorrina se hidroliza por las enzimas pancreáticas y la cobalamina se une al factor intrínseco secretado del estómago, que presumiblemente la envuelve protegiéndola de las enzimas proteolíticas. Este complejo es absorbido por un receptor específico en el íleon.

La unión al receptor capacita al complejo factor intrínseco- B_{12} para entrar en las células entéricas; dentro de la célula el factor intrínseco se degrada y la cobalamina es liberada, uniéndose a la transcobalamina II la cual la transporta a la circulación portal.

Esta vitamina funciona como cofactor en el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos. Se asimila en el intestino delgado en presencia del factor intrínseco que se secreta en el estómago. Cuando éste llega a faltar, no se asimila la B_{12} y puede producirse la anemia perniciosa (6,10).

Aunque esta vitamina es hidrosoluble, al igual que las demás del complejo B, el cuerpo tiene cierta capacidad para reciclarla. Los síntomas de deficiencia pueden tardar en aparecer hasta más de un año después de una baja ingestión de la vitamina.

El cuerpo usa la vitamina B_{12} para fabricar sangre y para producir células de otros tejidos, así como el recubrimiento de los nervios (mielina) (7).

2.2.3 Funciones de la Vitamina B_{12} (11)

- Previene y cura la anemia perniciosa.
- Protege de daños precancerosos en células pulmonares de fumadores.
- Desarrollo y maduración de glóbulos rojos.
- Esencial en el aprovechamiento de carbohidratos, proteínas y grasas.
- Colabora en la fabricación de la vaina de mielina en los nervios.
- Fabricación de ADN.
- Transporte y almacenamiento de folato en las células.

- Las recomendaciones diarias de consumo de vitamina B₁₂ varían de 0.3 µg para infantes y de 0.4 µg en mujeres embarazadas.

La deficiencia de vitamina B₁₂ produce:

- Fatiga o cansancio
- Falta de apetito y náusea
- Nerviosismo
- Adormecimiento y hormigueo en las extremidades
- Depresión
- Cambios en la conducta
- Paranoia
- Hiperactividad de los reflejos
- Fiebre de origen desconocido
- Frecuentes infecciones de las vías respiratorias
- Impotencia
- Problemas de la memoria
- Infertilidad

2.2.4 Producción de Vitamina B₁₂

El reino vegetal no produce suficiente cantidad de vitamina B₁₂ para poder hacer frente a la demanda del cuerpo humano. Las bacterias en el tracto intestinal pueden fabricar la vitamina B₁₂ (tanto en animales como en seres humanos). En los seres humanos la mayoría de estas bacterias se encuentran en el intestino grueso, el problema de la producción humana es que ésta se realiza en el colon donde no se absorbe la B₁₂, por lo tanto la mayoría de lo producido se pierde en las heces fecales

(un poco de esta producción entra en la circulación entero hepática para luego ser absorbida) (10). Para cubrir las necesidades fisiológicas de los seres humanos es necesario ingerir productos de origen animal como la leche, productos y derivados lácteos, huevo, pollo, sardinas, entre otros. Pero muchas de las veces es insuficiente la concentración de vitamina B₁₂ que se encuentra de forma natural para cubrir estas necesidades, por lo que se hace indispensable una fortificación de algunos de estos alimentos con vitamina de origen industrial.

De esta forma la producción industrial de la vitamina B₁₂ se realiza casi exclusivamente por métodos microbiológicos. Generalmente se obtiene por fermentación primaria, pero en algunos casos de caldos cultivo usados principalmente para la producción de antibióticos.

Otras fuentes de obtención son las aguas negras ya que se ha patentado un proceso para la extracción de esta vitamina y se han obtenido concentrados hasta de 86 mg / Kg (12).

Los microorganismos que se han reportado en la producción comercial son: *Streptomyces griseus*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces aureofaciens*, entre otros. Las fermentaciones para producir vitamina B₁₂ se llevan a cabo generalmente por un cultivo sumergido en un medio aireado y agitado. El tiempo de fermentación es regularmente de 3 a 5 días (12).

2.2.5 Métodos de análisis de vitamina B₁₂.

En la literatura muchos de los métodos de análisis incluyen a los ensayos microbiológicos; incluso son considerados como el método oficial de análisis para la determinación de vitamina B₁₂ en preparados vitamínicos según la AOAC (13).

Este tipo de métodos son tediosos y consumen mucho tiempo ya que requieren medios de cultivo y su preservación.

La cuantificación de la vitamina B₁₂ en soluciones inyectables se puede realizar en continuo utilizando un sensor de quimioluminiscencia acoplado a un sistema FIA. La determinación se basa en la cuantificación del átomo de cobalto presente en la molécula de vitamina, el cual es liberado por medio de una acidificación. En la detección quimioluminiscente, el cobalto al ser liberado produce un efecto catalítico entre el luminol, que se encuentra inmovilizado electrostáticamente en una columna de intercambio aniónico que forma al sensor y el peróxido de hidrógeno generado electroquímicamente, produciéndose una señal luminosa que se cuantifica por medio de un espectrofotómetro de UV (15).

Existen otros métodos experimentales para la determinación de vitamina B₁₂, en donde se hace uso de la electroforesis capilar inducida, acoplada a un espectrómetro de masas. En este método se cuantifica a la cianocobalamina en suplementos vitamínicos, basándose nuevamente en la separación del cobalto presente en la molécula de vitamina. Se ha utilizado como una metodología alterna para la separación y cuantificación de las cobalaminas; los límites de detección se encuentran en el intervalo de 30 a 70 ng/mL (16). También se puede acoplar la electroforesis capilar con la detección por espectrofotometría de UV y de fluorescencia (15).

El método que más se está utilizando actualmente, debido a sus características de disponibilidad del equipo y selectividad, es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Esta metodología presenta gran versatilidad para llevar a cabo la determinación y cuantificación de vitamina B₁₂ en una gran variedad de muestras. Por ejemplo, se puede determinar el contenido de vitamina en tabletas multivitamínicas con un detector de fluorescencia acoplado al HPLC (17).

La determinación de vitamina B₁₂ en leches infantiles también puede llevarse a cabo por HPLC usando un detector de UV con un tratamiento previo de la muestra (tratamiento ácido y centrifugación)(18); incluso se pueden optimizar métodos simultáneos para la determinación de vitamina B₁, B₆, B₁₂ en tabletas multivitamínicas con una preparación de las muestras simple y sin interferencias en las señales (19). Otra metodología para la determinación de vitamina B₁₂ se basa en la cuantificación del átomo de cobalto que se encuentra en la molécula de la vitamina y que es liberado por hidrólisis ácida (mezcla de ácido nítrico y sulfúrico 10:1), se realiza una preconcentración en línea del cobalto en una micro columna de 2 – nitroso 1 – naftol inmovilizado en alúmina sulfatada. El cobalto es eluido de la micro columna con etanol (250 µL) y determinado por espectrometría de absorción atómica acoplada a una configuración de inyección de flujo (FIA). La determinación se aplica a muestras como: agua, ampollas de vitamina B₁₂ y ampollas de complejo B, obteniéndose límites de detección de 0.02 ng/mL con una precisión de 2.8 % (20).

En todos los métodos mencionados anteriormente es necesario un tratamiento previo de la muestra de extracción y purificación fuera de línea antes de introducirla al sistema de detección.

2.2.6 Métodos de extracción de vitamina B₁₂.

Los procesos usados comercialmente para la extracción de la vitamina B₁₂ no han sido descritos en detalle y la mayor parte de la información se encuentra en patentes, además de ser largos y tediosos.

Sin embargo, una de las primeras etapas del proceso de extracción consiste en tratar al caldo filtrado, obtenido de la fermentación bacteriana con diferentes microorganismos (*Streptomyces griseus*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces aureofaciens*) con cianuro, el cual convierte a las cobalaminas en cianocobalaminas. Posteriormente la cianocobalamina se absorbe de la disolución; Varias sustancias pueden ser usadas con este fin (carbón, tierra de batán, bentonita y resinas de intercambio iónico). La elusión del absorbente va generalmente acompañada por el uso de una disolución acuosa de sustancias que van desde sales orgánicas hasta ácido clorhídrico.

Otra etapa de purificación aplicable a concentrados acuosos consiste en la disolución de una sal de zinc en una disolución ligeramente ácida y elevando el pH para precipitar el Zn(OH)₂, el cual extrae muchas impurezas. La cromatografía sobre alúmina y la cristalización metanol – acetona o acetona – agua, generalmente completan el proceso (12).

La extracción de la vitamina B₁₂ a partir de concentrados de piensos se realiza de forma similar. Se disgrega con agua una cantidad del concentrado, la suspensión acuosa se traslada a un vaso de precipitados, se añaden 2.0 mL de una disolución de cianuro de potasio y la mezcla se calienta sobre baño de vapor por treinta minutos. Este tratamiento no solo convierte a la vitamina B₁₂ existente a la forma ciano, sino que libera a la vitamina de sus formas combinadas con proteínas. Una vez enfriada la mezcla, se ajusta a pH 4 – 6 con disolución de ácido cítrico y se

deja permanecer en la campana durante veinte minutos. Acto seguido, se centrifuga para permitir una separación completa. La disolución sobrenadante se vierte sobre la columna de resina ya preparada y el residuo se lava con agua destilada. Los líquidos de lavado se centrifugan y los sobrenadantes se adicionan, asimismo, a la columna.

Tan pronto como la disolución que contiene vitamina B₁₂ ha percolado a través de la columna y su nivel se halla entre 1 – 2 mm por encima de la superficie de la resina, se añaden porciones de 10.0 mL de ácido clorhídrico 0.1 N hasta que los líquidos efluentes emerjan prácticamente desprovistos de coloración. Entonces la columna se lava con 50 – 100 mL de acetona al 65 % y finalmente con otra porción de ácido clorhídrico 0.1 N. Cuando el lavado de la columna ha finalizado y el ácido clorhídrico empleado en el último lavado se halla únicamente a 1 – 2 mm por encima de la superficie de la resina, se adiciona sobre la misma 20 mL dioxano - ácido clorhídrico o un volumen similar de tetrahidrofurano – ácido clorhídrico para la elusión de la vitamina B₁₂ (7).

Existen metodologías experimentales en las cuales se trabajan con diferentes mecanismos de extracción de la vitamina B₁₂ de caldos de fermentación evitando el uso de compuestos tóxicos como el cianuro, el dioxano o el tetrahidrofurano. Una de ellas es la cromatografía de inmunoafinidad cuyo fundamento se basa en el uso de la alta selectividad de algunas biomoléculas (anticuerpos, receptores, proteínas específicas) que se inmovilizan en una fase sólida como un ligante y que son capaces de atrapar o unirse selectivamente a la molécula de interés, separándola, preconcentrándola y purificándola selectivamente. Esta técnica ofrece la cualidad de aislar compuestos de muestras complejas.

En el caso de la vitamina B₁₂ que se separa del caldo de fermentación se utiliza como ligante a la anti-cianocobalamina e inmovilizada en Rifles HY alumina

activada. La vitamina es eluida de la columna de cromatografía con una mezcla de metanol – agua al 30 % v/v presentando linealidad del método manejando muestras con una concentración máxima de 10.0 mg/L con una desviación estándar menor al 4 % en seis inyecciones repetitivas de 50.0 µL y usando un detector de UV – VIS a una longitud de onda de 361 nm (21).

2.2.6.1 Extracción y purificación por diálisis

La diálisis es una metodología alternativa para la separación de macromoléculas de acuerdo a su tamaño basándose en el uso de membranas semipermeables que puede ser de celofán (acetato de celulosa), nitrocelulosa, entre otros. Que contienen poros de diferentes dimensiones que permiten el paso de las moléculas o macromoléculas, estas deben encontrarse en disolución. El proceso de diálisis se lleva a cabo cuando las moléculas pasan a través de la membrana hacia el disolvente puro usándose como medio de separación de moléculas. Una variación de esta técnica es la ultra filtración la cual se basa en forzar el paso de una disolución que contenga a la macromolécula a través de la membrana. El disolvente y pequeños solutos pasan a través de la membrana lográndose una mayor concentración de la macromolécula en la disolución (22).

La diálisis se ha estado manejando experimentalmente en diversas áreas y de muy distintas maneras como mecanismo de separación evaluándose el transporte de masa del soluto y el flujo osmótico a través de la membrana (23).

Las cámaras de diálisis se pueden acoplar en línea a sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA), lográndose una gran versatilidad de análisis de una gran variedad de analitos que van desde moléculas de tamaño pequeño como

peroxinitrito determinado por quimioluminiscencia al reaccionar con luminol en muestras biológicas (24) hasta macromoléculas tan grandes como proteínas (25).

Friedner y colaboradores proponen un método para determinar vitamina B₁₂ en suero, que se basa en la liberación de la vitamina de las proteínas por calentamiento a pH 4.9 en presencia de cianuro, sometiendo a la disolución a un proceso de ultra filtración a través de una membrana diálisis, el contenido de vitamina en la muestra es calculado por radiactividad comparando la respuesta obtenida contra una curva de calibración (26).

En base a lo expuesto con anterioridad, en este trabajo se propone un método más sencillo y rápido para extraer en continuo vitamina B₁₂ en leche utilizando una cámara de diálisis acoplada a una configuración de flujo continuo con el objetivo de obtener un sistema sensor donde la extracción y la detección tienen lugar secuencialmente en el espacio y en el tiempo.

Capítulo III**Metodología****3.1 Reactivos**

- Vitamina B₁₂ (cianocobalamina). SIGMA, No. Lote: 30k0698. R.A. 99% pureza.
- Resina Aniónica (Diethyl [2- hidroxipropil] aminoetil sephadex). QAE SEPHADEX A - 25. SIGMA, No. Lote: 97H1461.
- Resina Catiónica (carboximetil sephadex). CM SEPHADEX C - 25. SIGMA. No. Lote: 68H0757.

Todos los reactivos usados en este trabajo, fueron de grado analítico. A continuación se mencionan los datos de cada uno de ellos.

- Ácido Tricloroacético cristal (Cl₃CCOOH). J. T. Baker. No. Lote: T25594. R.A. 99.9% pureza.
- Ácido Clorhídrico (HCl). J. T. Baker. No. Lote: V10C22. R.A. 36.5 - 38% pureza.
- Hidróxido de Sodio (NaOH). J. T. Baker. No. Lote: 39798. R.A. 100% pureza.
- Acetato de Sodio (CH₃COONa). Química Dinámica. S.A. C.V. No. Lote G286-5. R.A. 99% pureza.
- Ácido Acético (CH₃COOH). J. T. Baker. No. Lote: V02C69. R.A. 99.9% pureza.

3.2 Disoluciones

3.2.1 Disolución de ácido tricloroacético (Cl_3CCOOH) 4%. (TCA 4%).

Se pesó aproximadamente 4.00 g de Cl_3CCOOH en un vaso de precipitados de 250 ml y se disolvió con la cantidad de agua destilada necesaria. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó con agua destilada. Se guardó en un frasco de plástico a temperatura ambiente.

3.2.2 Disolución amortiguadora (CH_3COOH / CH_3COONa pH 4.0).

Se pesaron aproximadamente 0.1260 g de CH_3COONa en un vaso de precipitados de 250 ml, por separado se midió con una micro pipeta 0.50 mL de CH_3COOH . Ambos reactivos se mezclaron y disolvieron en aproximadamente 75 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 4.0 con HCl 2.0 N. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada. Se guardó el buffer en un frasco de plástico a temperatura ambiente. El reactivo dura en estas condiciones aproximadamente tres semanas.

3.2.3. Disolución madre de vitamina B_{12} .

Se pesaron aproximadamente y con precisión 0.1574 g de vitamina B_{12} que se disolvió y se aforó a 100 mL con agua destilada. La disolución se guardó en un frasco de vidrio color ámbar y se cubrió con papel aluminio para protegerla de la luz, almacenándola en refrigeración.

3.2.3.1. Disoluciones estándar de vitamina B₁₂.

De la disolución madre se tomaron las alícuotas correspondientes para la elaboración de los estándares de la curva patrón (con un mínimo de ocho puntos) (28). En la tabla 2 se muestran las concentraciones para cada uno de los estándares.

Disolución estándar	Concentración mol / L
1	9.97x E-8
2	4.985 x E-7
3	9.97 x E-7
4	1.994 x E-6
5	3.982 x E-6
6	5.982 x E-6
7	7.976 x E-6
8	9.97 x E-6
9	1.496 x E-5
10	1.994 x E-5
11	2.493 x E-5

Tabla 2. Valores de concentración para cada una de las disoluciones estándar para la elaboración de la curva de calibración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.4 Disolución de ácido clorhídrico 2.0 N

Se tomaron 16 mL de ácido clorhídrico y se vertieron en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregó lentamente agua destilada y se agitó suavemente. Se completó el volumen hasta el aforo con agua destilada y se guardó en un recipiente de plástico.

3.2.5 Disolución de hidróxido de sodio 1.0 N

Se pesaron aproximadamente 4.0 g de sosa en lentejas en un vaso de precipitados, se disolvieron con agua destilada y se transfirió la disolución a un matraz aforado de 100 mL en donde se completó el volumen hasta el aforo con agua destilada, se guardó en recipientes de plástico.

3.3 Equipo y material.

- * Espectrofotómetro: Cary 1 UV- Visible, Varian.
- * Celda de cuarzo con un volumen interno de 18.0 μ L de volumen interno, Hellman
- * Bomba peristáltica: Miniplus 3 de 4 vías o canales, Marca Gilson.
- * Válvula de inyección, Rheodyne.
- * Válvula de inyección, INC. V- 450 6 puertas, Upchurch Scientific.
- * Tubos de bomba de Tygon.
- * Membranas de Diálisis de celulosa, 100/box, Cience Ware. No Cat 402990000.
- * Cámara de Diálisis de Metacrilato, hecha en el laboratorio.
- * Centrífuga: CL. Mod. No. 0101 con cabezal para tubos de 50.0 mL, DINAC.
- * Tubos de centrífuga de 50 mL con graduación.
- * Balanza Analítica con precisión ± 0.1 mg., Marca Ohaus.

3.4 Determinación de condiciones óptimas de trabajo para la determinación de vitamina B₁₂ por FIA.

Para optimizar los parámetros en un sistema de análisis por inyección flujo es primordial determinar las condiciones ideales para el tipo de análisis que se lleve a cabo, como son:

- El caudal del portador encargado de acarrear a la muestra inyectada, determinándose de acuerdo a la capacidad de la celda empleada (18 μ L de volumen interno) y el sistema de detección (espectrofotómetro de UV).
- El volumen de muestra que será incorporado al caudal del sistema mediante una válvula de inyección.
- Longitud del reactor (si es necesario).

Estos parámetros se determinaron de acuerdo a las condiciones de trabajo; es decir, la señal analítica que presentó la altura de pico más alto (1).

Las disoluciones acuosas de cianocobalamina presentan los siguientes máximos de absorción $\lambda = 278$ nm, 361 nm, 548 nm (5, 6, 8), los cuales se verificaron por medio de la obtención del espectro de absorción experimental. El espectro de absorción de la vitamina se determinó en una disolución acuosa.

Se partió de una disolución de vitamina B₁₂ con una concentración de 9.97×10^{-4} M, depositándola en la celda de cuarzo y se hizo un barrido desde 200 nm hasta 700 nm. Se realizó una dilución 10 veces menor, la cual permitió obtener un espectro de absorción que registra claramente los picos en donde se encuentran los máximos de absorción de la vitamina B₁₂ reportados en la literatura.

3.5 Elaboración de la curva patrón para la vitamina B₁₂

Se preparó la curva de calibración a partir de los estándares de vitamina B₁₂ cuyas concentraciones van desde 0.157 a 39.38 mg/L con un total de 11 puntos para la curva.

Se hicieron pasar por el sistema FIA mediante el uso de la bomba peristáltica, un volumen de inyección de 100 μ L de muestra con un caudal del portador de 1mL/min, que en este caso fue agua destilada. El portador lleva hacia el detector de UV – VIS el bolo de muestra, donde se registra la señal a 361 nm. La figura 4 muestra la configuración utilizada.

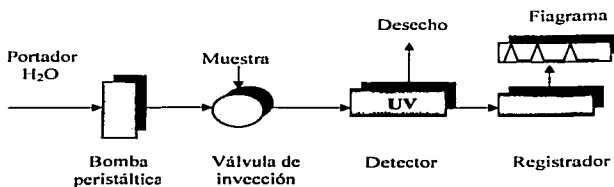


Figura 4. Configuración FIA utilizada para la determinación de vitamina B₁₂ en disolución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.6 Determinación del límite de detección y de cuantificación.

Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, por sus siglas en inglés), el límite de detección expresado como una concentración C_L (o cantidad Q_L) se deriva de la derivación más pequeña, X_L , que pueda ser detectada con un razonable nivel de confianza, para un procedimiento analítico.

Otra definición en química analítica es que el límite de detección es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, Y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, S_B :

$$Y = Y_B + 3S_B$$

Donde : S_B Desviación estándar del blanco.

Y_B Concentración del blanco

El límite de detección se determinó mediante la inyección de disoluciones estándar de vitamina B_{12} al sistema FIA cuyas concentraciones se encontraban dentro de los límites inferiores de la curva. Se fue disminuyendo la concentración de la vitamina B_{12} hasta aquella en donde era igual al blanco, tomando como blanco al fluido portador que en nuestro caso era agua destilada. Una vez determinada está concentración se inyectó siete veces la última concentración que presentó señal diferente al blanco verificando que el conjunto de señales mantuvieran una tendencia similar. A partir de ésta (0.0157 mg/L), se calculó la concentración del límite de detección instrumental (27, 28).

También se realizó la inyección de 7 volúmenes de agua destilada como blanco para comparar las señales.

Se registraron los valores de las absorbancias, las cuales corresponden a un valor en mg/mL de la curva patrón calculada con las cinco primeras concentraciones a partir de la concentración inyectada siete veces. Haciendo uso de la ecuación de la

recta de esta curva de calibración ponderada (95 % de confianza) se obtuvo la concentración para cada uno de los volúmenes inyectados y se calculó la media aritmética para la concentración de 0.157 mg/mL de vitamina B₁₂. El límite de detección se calculó como: $Y_B + 3 s$, donde: s = desviación estándar.

$$Y_B = \text{Concentración del blanco} = 0.0 \text{ mg/L}$$

Como mecanismo de comparación con el método algebraico se aplicó el método gráfico utilizando como herramienta al programa de computadora Origin 4.0. Éste consistió en utilizar el gráfico obtenido de la curva de calibración ponderada con límites de confianza al 95 % y extrapolando el punto de la ordenada al origen del intervalo de confianza máximo hasta la línea de la curva de calibración, se leyó en el eje de las X la concentración que corresponde al límite de detección (figura 5). Entre los dos métodos, gráfico y algebraico, no debe haber grandes desviaciones. (1, 29)

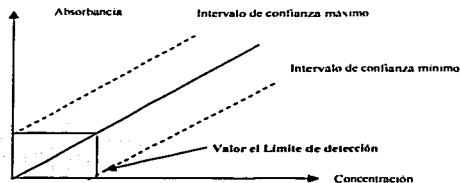


Figura 5. Determinación del Límite de detección por método gráfico. En donde los intervalos se encuentran a 95 % de confianza.

El límite de cuantificación esta definido como el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas, en oposición a la detección cualitativa.

El valor que se ha propuesto es: $Y = Y_B + 10S_B$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el límite de cuantificación se aprovecharon los valores de absorbancia obtenidos para el cálculo del límite de detección utilizando los valores de las absorbancias que corresponden a un valor en mg/mL de la curva patrón. Utilizando la ecuación de la recta de la curva de calibración se calcula la concentración para cada uno de los volúmenes inyectados y se obtiene la media aritmética para la concentración de 0.157 mg/mL de vitamina B₁₂. El límite de cuantificación se calculó como: $Y_B + 10 s$, donde: s = desviación estándar

$$Y_B = \text{concentración del blanco} = 0.0 \text{ mg/L}$$

Utilizando nuevamente el programa Origin 4.0 se obtuvo el límite de cuantificación por el método gráfico. Se obtuvo la curva de calibración ponderada con límites de confianza al 99 % y extrapolando el punto de la ordenada al origen del intervalo de confianza máximo hasta la línea de la curva de calibración, se leyó en el eje de las X la concentración que corresponde al límite de cuantificación (figura 6).

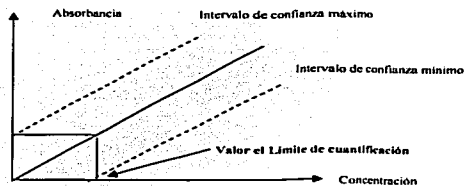


Figura 6. Determinación del límite de cuantificación por método gráfico. En donde los intervalos se encuentran a 99 % de confianza.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.7 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

PROPUESTA.

• Fundamento

La vitamina B₁₂ pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles por lo que se realizó una precipitación de las proteínas de la leche (caseínas) mediante la acidificación del medio con ácido tricloroacético hasta alcanzar un pH 4.6, en el cual se encuentra su punto isoeléctrico, produciéndose la coagulación de las mismas y reteniéndose dentro de la matriz (cuajada) a la grasa. En el agua (lacto suero) se liberan las vitaminas hidrosolubles (incluida la vitamina B₁₂) acompañadas de lactosa, minerales y proteínas hidrosolubles (29), estas interferencias son las que se estudiaron.

3.7.1 Preparación del extracto de leche (extracción de la vitamina).

Para la extracción de la vitamina de la leche se siguieron los pasos propuestos por Soledad Albalá y Teresa Veciana (18).

Se pesaron aproximadamente y con precisión 10.5 g de leche (alpura 2000 entera ultra pasteurizada) y por separado se pesó aproximadamente y con precisión 1.0 g de ácido tricloroacético. Se transfirieron y se mezclaron en un tubo de centrifuga de 50 mL. Se sometió a agitación magnética por 10 minutos, transcurrido este tiempo se centrifugó por otros 10 minutos, separando el sobrenadante y guardándolo en un matraz volumétrico de 10 mL. Al sólido se le agregó 3.0 mL de la disolución de TCA 4% seguido de agitación magnética por 10 minutos y del proceso de centrifugado por el mismo periodo de tiempo. Nuevamente se separaron las fases, conservando la fase líquida que se mezcló con el líquido separado en la primera etapa de centrifugación. La mezcla se transfirió a un matraz volumétrico de

10 mL y se aforó con la disolución de TCA 4%. Se filtró y se almacenó en refrigeración en envases de vidrio protegidos de la luz hasta su inyección en el sistema FIA.

3.8 PURIFICACIÓN DE LA VITAMINA B₁₂

3.8.1 Purificación utilizando resinas de intercambio iónico.

Las resinas cambiadoras de iones del tipo de "Amberlite" se emplean en el aislamiento de la vitamina B₁₂ y para la separación de los productos de descomposición de la misma a partir del extracto (5, 8, 30).

Puesto que la vitamina B₁₂ es una sustancia neutra, no es absorbida por cambiadores de aniones ni cationes, mientras que ciertos productos procedentes de la descomposición de la cianocobalamina y otros compuestos activos hidrosolubles presentes pueden tener propiedades básicas o ácidas, por lo que son retenidos por las resinas. En la columna se empaca una resina de intercambio iónico, en la cual la vitamina B₁₂ (ciano y acuocobalamina) se absorbe en la parte superior de la columna y se eluye cuando se adiciona una mezcla de dioxano-ácido clorhídrico o de tetrahidrofurano-ácido clorhídrico (5, 30, 31).

En base a esto se utilizaron resinas de intercambio tanto catiónico como aniónico (Sephdex) empacadas en una columna (figura 7), buscándose de igual manera intentar incrementar la concentración de la vitamina en la muestra por medio de la retención de la misma en la resina y buscándose con esto un incremento en la señal analítica obtenida. La columna se acopló a la configuración FIA para intentar retener en continuo a la vitamina B₁₂.

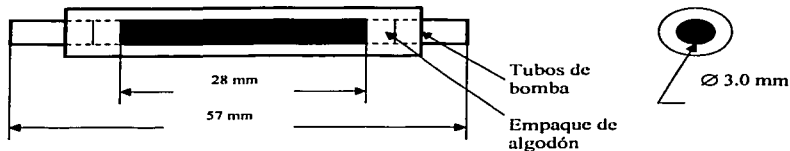


Figura 7. Columna de teflón empacada con resina de intercambio iónico.

Una vez que se estableció cual era la resina que proporciona los mejores resultados en cuanto a retención se acoplo la columna a la configuración que se muestra en la figura 8. La columna se colocó entre la bomba peristáltica y la válvula de inyección con la finalidad de lograr la extracción de la vitamina en continuo eliminando así las interferencias para que esta manera al inyectar la muestra al sistema, se obtenga una señal definida.

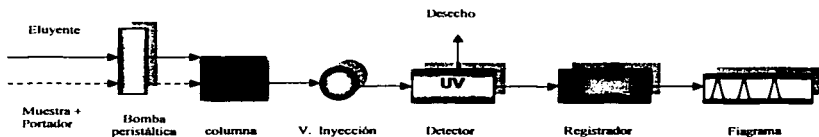


Figura 8. Configuración FIA utilizada para extraer en continuo vitamina B₁₂ utilizando una columna empacada con la resina catiónica (CM SEPHADEX C - 25). En la cual primeramente se hace pasar a la muestra con el portador a través de la columna y posteriormente el eluyente para llevarla su cuantificación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.8.1.1 Activación de la resina de intercambio iónico

Para la activación de la resina de intercambio aniónico y catiónico se realizaron los pasos, propuestos por Hashmi y Benites (5, 31) y en (32, 33).

Resina de intercambio aniónico.

Se pesó aproximadamente 1.0 g de resina aniónica (Diethyl [2- hidroxipropil] aminoetil sephadex) QAE SEPHADEX A – 25 y se dejó toda la noche reposando sumergida en agua destilada. Pasando este periodo de tiempo se decantó el líquido, se lavó con agua destilada y se agitó dejándola en reposo por 10 minutos. Posteriormente se realizaron lavados hasta alcanzar un valor de pH neutro. Se decantó el líquido, se agregó HCl 2N y se mantuvo en reposo por 30 minutos, eliminándose el ácido y lavando con agua destilada hasta alcanzar nuevamente un valor de pH neutro. Se eliminó el líquido y se sumergió a la resina en una disolución buffer de acetatos pH 6.0 manteniendo el volumen del buffer por lo menos a 2 mm sobre el nivel de la resina.

Resina de intercambio catiónico

Se pesó aproximadamente 1.0 g de resina catiónica (carboximetil sephadex) CM SEPHADEX C – 25 y se dejó toda la noche reposando sumergida en agua destilada. Pasando este periodo de tiempo se decantó el líquido, se lavó con agua y se agitó dejándola en reposo por 10 minutos. Posteriormente se realizaron lavados hasta alcanzar un valor de pH neutro. Se decantó el líquido y se agregó NaOH 1N, se mantuvo en reposo por 30 minutos eliminándose el ácido y lavando con agua destilada hasta alcanzar nuevamente un valor de pH neutro. Se eliminó el líquido y se sumergió a la resina en una disolución buffer de acetatos pH 6.0 manteniendo el volumen del buffer por lo menos a 2 mm sobre el nivel de la resina.

3.8.2 Sistema de purificación utilizando una cámara de diálisis.

Otro sistema de purificación que se utilizó fue un sistema de microdiálisis acoplado al sistema FIA. Se propone el uso de una cámara de diálisis elaborada en el laboratorio a base de metacrilato en donde se soporta una membrana de diálisis como se muestra en la figura 9 y 10.

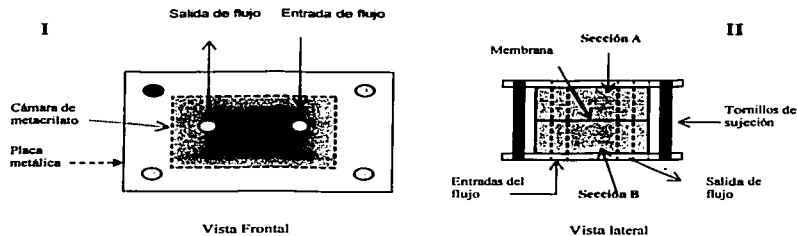


Figura 9. Celda de diálisis utilizada para la purificación de la vitamina B₁₂.
 I Vista frontal de la cámara de diálisis en la que se aprecia la cámara de metacrilato en color oscuro.

II Vista lateral de la cámara de diálisis en la que se pueden apreciar todas sus partes y la forma de ensamblaje.

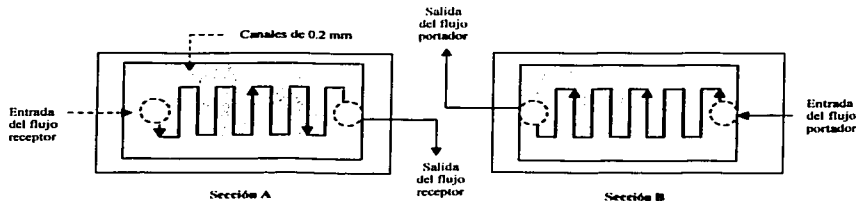


Figura 10. Cámara de metacrilato en la que se muestra la dirección del flujo del portador y del receptor.

Sección A: parte por donde circula el receptor.
 Sección B: parte por donde circula el portador.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

3.8.2.1 Purificación de la vitamina B₁₂ usando la cámara de diálisis acoplada a una configuración de flujo continuo.

Con la finalidad de lograr la purificación en continuo de la vitamina B₁₂ presente en la muestra de leche se utilizó una configuración de flujo continuo en la cual se acopla una cámara de diálisis como se muestra en la figura 11. La configuración permite mantener el flujo en un sistema de circuito cerrado por un lapso de tiempo determinado lográndose la separación de la vitamina del resto de los componentes de la matriz alimentaria:

Se utilizaron dos válvulas de inyección (a y b) y mediante el uso de mangueras de flujo se conectaron de tal forma que se encontraban funcionando de forma simultánea. Ambas válvulas poseen 6 compuertas que dependiendo de la posición (llenado o inyección) es la dirección que seguirá el flujo. Para llenar el sistema, ambas válvulas se encuentran en posición de inyección (figura 11A): en la válvula (a) el flujo receptor (agua destilada) entra por la compuerta 2(a) en dirección 1(a) que es una salida hacia la parte superior de la cámara de diálisis (sección A de la figura 9) y de ahí pasa al detector. Se utiliza como sistema de propulsión la bomba peristáltica para mantener el flujo en dirección a la válvula (b), en la cual la entrada del flujo se realiza por la compuerta 2(b) en dirección a la 1(b) que corresponde nuevamente a una salida que se conecta con la compuerta 6(a) en dirección a la 5(a) que va al desecho.

Para cerrar el circuito (figura 11 B), la válvula (b) se mantiene en la posición de inyección, y la válvula (a) se cambia a posición de llenado, modificando la dirección del flujo receptor que sigue entrando por la compuerta 2(a) pero ahora se dirige a la compuerta 3(b) y al desecho. El flujo que llega a la compuerta 6(a), en lugar de dirigirse a la compuerta 5(a), se dirige a la 1(a) que va hacia la cámara de

diálisis y hacia el detector midiendo continuamente la vitamina dializada. El circuito se mantiene cerrado por el tiempo que se requiera.

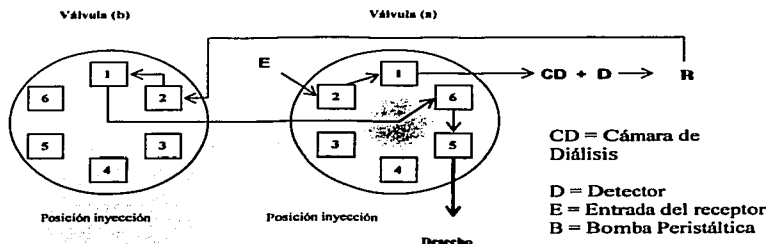


Figura 11 (A) Configuración de llenado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

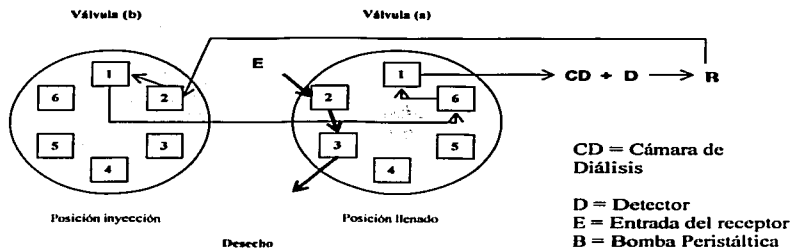


Figura 11 (B). Configuración circuito cerrado

Durante el proceso de diálisis, el líquido portador (disolución estándar de vitamina, extracto de leche fortificada y leche sin tratamiento) pasa continuamente

por la sección B de la cámara de diálisis. Ambas secciones se encuentran separadas por una membrana de diálisis de celulosa y los dos flujos van en direcciones opuestas para favorecer el intercambio de las moléculas de vitamina del portador hacia el receptor y evitar la sobre presión en la cámara ya que la membrana se podría romper.

Conforme las moléculas migran hacia el líquido receptor, la variación de la concentración es registrada de forma continua en el detector (espectrofotómetro UV-VIS) a una longitud de onda de 361 nm siguiendo la secuencia de la figura 11 (b).

Capítulo IV

RESULTADOS

4.1 Determinación experimental de los espectros de los máximos de absorción

Se realizó un barrido del espectro de absorción de la vitamina B₁₂ desde 250.00 hasta 800.00 nm. Se utilizó una disolución de vitamina B₁₂ 9.97×10^{-4} M.

El espectro experimental de absorción máxima de UV-Visible de la vitamina se muestra en la figura 12.

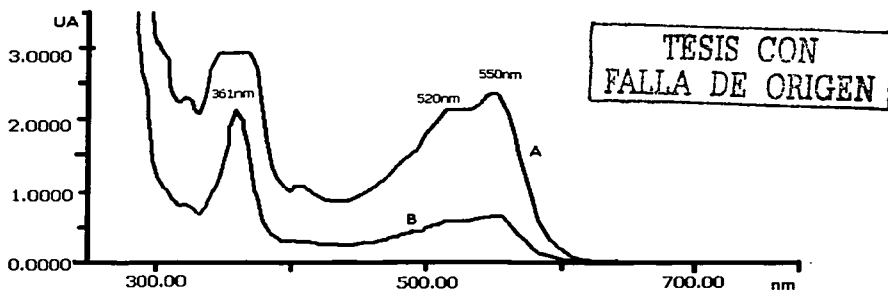


Figura 12. Espectro de absorción de la vitamina B₁₂. **A** (9.97×10^{-4} M): Espectro que permite visualizar dos de los máximos de absorción vitamina B₁₂ y que corresponden a 520 nm y 550 nm; se observa una saturación en la región de los 361nm en forma de una meseta. **B** (9.97×10^{-5} M): Espectro en el que se aprecia claramente el máximo de absorción a 361nm para vitamina B₁₂.

Se registraron tres máximos de absorción que corresponden a 361, 520 y 550 nm. En el espectro A a 361 nm se observa la saturación de la señal por lo que se diluyó la muestra 10 veces (9.97×10^{-5} M) y se volvió a realizar el espectro. Se eligió el pico de 361 nm como óptimo tomando como parámetros para su elección las características de ser un pico bien definido y ser la señal más alta de absorción, ya

que a 520 y 550 nm se tiene la menor absorptividad molar (Espectro B de absorción), además de ser característico de la vitamina B₁₂.

Para optimizar los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA se probaron diferentes velocidades de la bomba peristáltica (desde 5 hasta 20 rpm), en base a las características de diámetro interno de los tubos de bomba y utilizando un bucle de inyección de 100 μ L se eligió como óptimo un caudal de 1 mL/min y un volumen de inyección de 100 μ L, ya que de esta forma se obtenía una señal con características bien definidas. Figura 13.

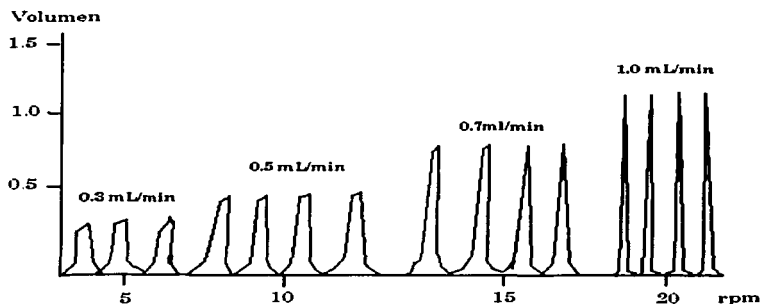


Figura 13. Evaluación de los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA, donde se probaron diferentes velocidades de la bomba peristáltica hasta encontrar una señal con características bien definidas (volumen de 1 mL/min).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2 Curva de calibración de la vitamina B₁₂

Partiendo de una disolución madre de vitamina B₁₂ cuya concentración fue de 1574.86 ppm (9.97×10^{-4} M), se prepararon diferentes disoluciones estándares que se inyectaron al sistema FIA en una serie de cuatro inyecciones para cada concentración, con una precisión de 0.2 %.

La figura 14 muestra el fiagrama obtenido para concentraciones que van de 4.97×10^{-7} a 2.497×10^{-5} mol/L.

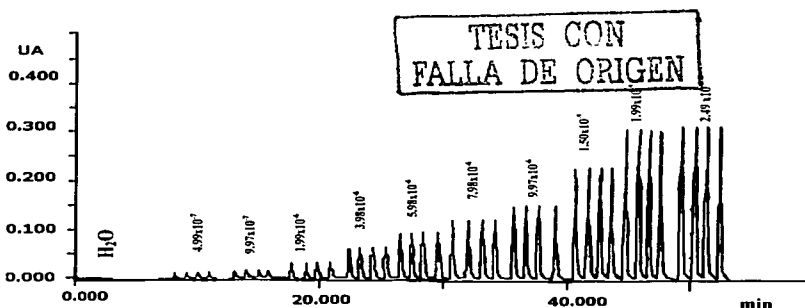


Figura 14. Fiagrama obtenido para la curva de calibración de 10 estándares de vitamina B₁₂ cuyas concentraciones se encuentran entre 4.99×10^{-7} y 2.49×10^{-5} mol/L, inyectadas por cuatuplicado.

Los valores expresados en unidades de concentración (mol/L) fueron convertidos a mg/L (ppm), ya que la cantidad de vitamina presente en las muestras se reporta en estas unidades. Sometiendo a los resultados obtenidos a un análisis estadístico (regresión lineal) se obtiene el gráfico de la figura 15.

El intervalo lineal obtenido fue: 7.87×10^{-1} a 39.40 mg/L con un coeficiente de correlación de 0.9992.

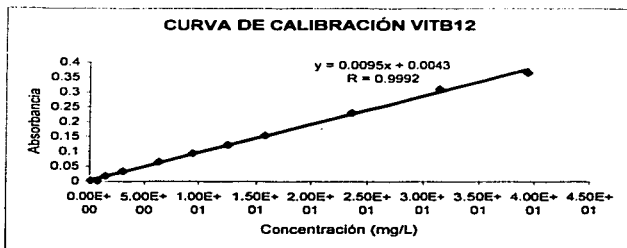


Figura 15. Curva de calibración para la vitamina B₁₂ en unidades mg/L. Con un intervalo lineal que va de 7.87×10^{-1} a 39.40 mg/L.

mol/L	mg/L	UA
4.99E-07	7.87E-01	0.000957
9.97E-07	1.58E+00	0.0179
1.99E-06	3.15E+00	0.03485
3.98E-06	6.29E+00	0.065
5.98E-06	9.45E+00	0.0944
7.98E-06	1.26E+01	0.123
9.97E-06	1.58E+01	0.154
1.50E-05	2.36E+01	0.2308
1.99E-05	3.15E+01	0.3111
2.49E-05	3.94E+01	0.3655

Tabla 3. Valores de absorbancia y de concentración en molaridad y en partes por millón para cada uno de los puntos de la curva de calibración de vitamina B₁₂.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

4.2.1 Cálculo del Límite de Detección.

En la figura 16 se muestran las inyecciones realizadas del blanco (agua) y de una disolución con una concentración de 9.97×10^{-8} mol/L (0.157 mg/L) de vitamina B₁₂.

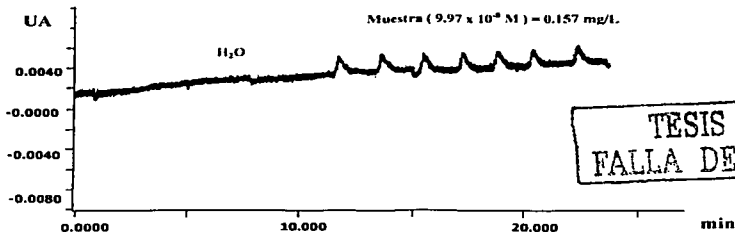


Figura16. Diagrama obtenido de la inyección de 7 volúmenes de blanco, precedidos de la inyección de 7 volúmenes de una disolución de vitamina B₁₂ con una concentración de 9.97×10^{-8} mol/L para el cálculo del límite de detección.

Como el blanco no presentó señal, el límite de detección se calculó a partir de la concentración de 9.97×10^{-8} mol/L de vitamina B₁₂ de acuerdo a lo establecido en la metodología.

A) Método Algebraico.

Para calcular el límite de detección por el método algebraico se utilizó la ecuación de la recta $y = 0.0109x + 0.00061$ obtenida a partir de los primeros cinco puntos de concentraciones bajas haciendo uso de las líneas ponderadas y se sustituyeron los valores de absorbancia de las inyecciones realizadas de la muestra de vitamina B₁₂ 0.157 mg/L (datos de la tabla 4) y se calculó el promedio de la concentración.

Absorbancia	mg/L
0.00522	0.3529
0.00549	0.3794
0.00571	0.4000
0.00575	0.4049
0.00598	0.4274
0.00698	0.4666
0.00606	0.4352
Promedio = 0.00579	Promedio = 0.4094

Tabla 4. Valores de absorbancia y concentración para el cálculo del límite de detección y cuantificación del diagrama de la figura 16.

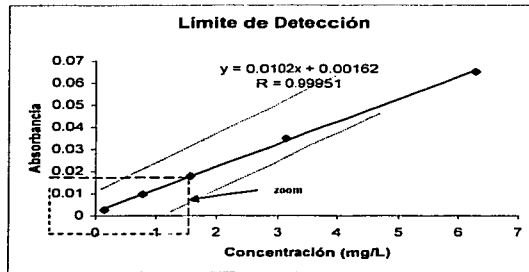


Figura16a. Gráfico de líneas ponderadas en la cual se indica la zona que se amplió para una mejor apreciación del límite de detección. Zoom = región ampliada de la gráfica que se observa en la figura 16b

El límite de detección se calculó por el método algebraico con la ecuación:

Límite de Detección = 3s(desviación estándar)

Y cuyo valor obtenido es:

3 (0.03751) = 0.1130 mg/L

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Método Gráfico.

El límite de detección se calculó por el método gráfico utilizando la gráfica de la figura 16a estableciendo los límites de confianza al 95 %. Para poder calcular mejor el límite de detección se amplió la zona de medición como se muestra en la gráfica de la figura 16b.

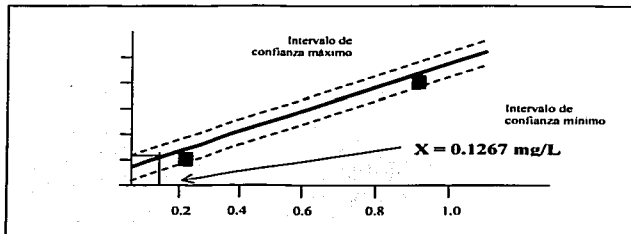


Figura 16b. Ampliación de la zona marcada en la gráfica de la figura 16. La intersección con el eje de las x corresponde al valor del límite de detección.

El valor de la concentración en el punto de intersección en el eje de las x corresponde al límite de detección el cual fue de 0.4736 mg/L con una r.s.d. de 0.2%.

Cabe destacar que los valores obtenidos por estos dos métodos (0.1130 y 0.1267 mg/L) no presentan gran dispersión entre ambos, por lo que el límite de detección se puede calcular con cualquiera de los dos métodos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2.2 Cálculo del Límite de cuantificación.

A) Método Algebraico.

El valor del límite de cuantificación se calculó utilizando la siguiente ecuación:

Límite Cuantificación = 10s (desviación estándar), a partir del valor promedio de las concentraciones obtenidas de la curva de calibración ponderada: $y = 0.0109x + 0.00061$.

Límite de Cuantificación = 10(0.03751)

LC = 0.3751 mg/L

B) Método Gráfico.

También se calculó por el método gráfico en donde se establecen los límites de confianza al 99%. Figura 17 muestra el valor obtenido por el método gráfico.

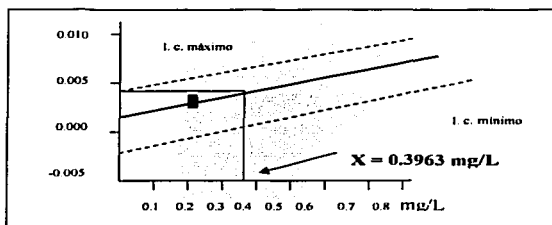


Figura 17. Ampliación de la región cercana al origen en donde se aprecia la intersección con el eje de las x que corresponde al valor del límite de cuantificación para la vitamina B₁₂.

Se destaca que no existe una diferencia notable en los valores obtenidos para el límite de cuantificación calculado por ambos métodos 0.3751 mg/L para el algebraico y 0.3963 mg/L por el gráfico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3 Tratamiento de muestras

4.3.1 Extracción de la vitamina B₁₂ de leche utilizando ácido Tricloroacético

Una vez realizada la curva de calibración de vitamina B₁₂ se hizo el tratamiento previo a la muestra de leche para ser inyectada dentro del sistema FIA y cuantificar la concentración de vitamina B₁₂ de acuerdo a la curva de calibración.

Muestra utilizada: Leche alpura 2000, Ultrapasteurizada presentación de 1 Litro.

Se pesaron aproximadamente y con precisión 10.50 gramos de leche para obtener el extracto (fase acuosa) resultado de la precipitación de las proteínas y separación de la grasa debido al tratamiento con ácido tricloroacético. Éste se inyectó al sistema en volúmenes de 100 µL por muestra, utilizando la configuración que se muestra en la figura 4, registrándose la señal analítica por el detector. La figura 18 muestra el fiagrama obtenido a partir de inyectar 8 veces el extracto obtenido del tratamiento realizado previamente a la leche.

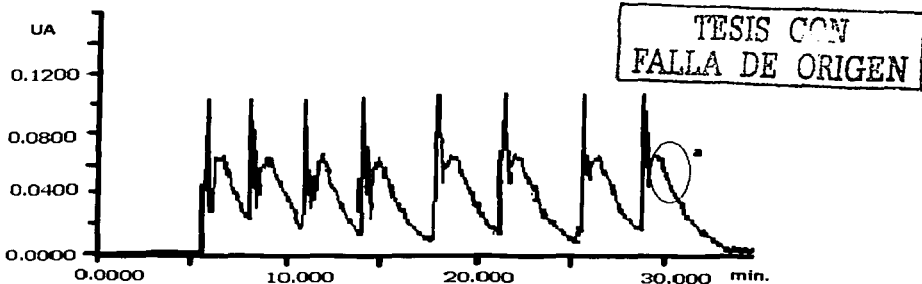


Figura 18. Fiagrama obtenido del extracto de leche. Las interferencias en la señal para cada una de las muestras se encuentra señalada con la circunferencia (a).

Se observa en la señal analítica que no se obtiene una señal con una buena resolución, aparecen interferencias producidas por las impurezas que se encuentran en la fase acuosa que pueden ser proteínas hidrosolubles de la leche y/o restos de la grasa de la misma (29).

4.3.2 Fortificación de muestras de leche con vitamina B₁₂

Para comprobar que la señal se obtuvo era debida a la vitamina se adicionó al extracto una cantidad de vitamina B₁₂ igual a 0.1 mL de disolución de una concentración 9.97×10^{-4} M, llevando a un volumen final de 10.0 ml al extracto, llegando a una concentración final de 9.97×10^{-6} M. Se sacó el espectro de absorción del extracto adicionado. Se comparó contra el obtenido del extracto sin adicionar y con una disolución estándar de vitamina B₁₂ con la misma concentración.

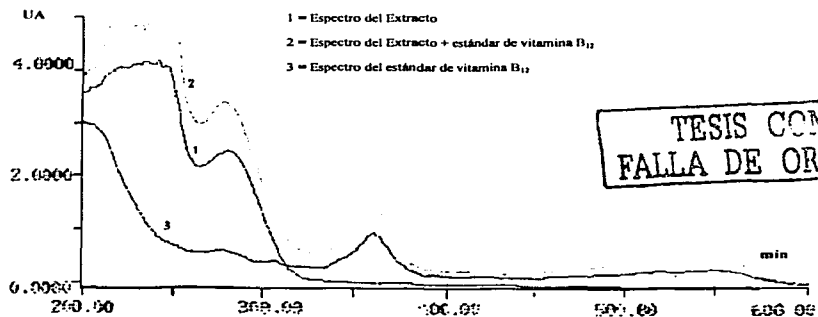


Figura 19. Espectro de absorción para diferentes muestras en el que se aprecia una diferencia clara en la región de absorción para la vitamina B₁₂ a 361nm.

En la figura 19 se observa que existen diferencias entre las señales obtenidas. Las señales pertenecientes a los extractos presentan un pico de absorción a 290 nm, algo que en el estándar de vitamina no se observa. Con respecto a la región de interés 361nm el extracto sin adición de vitamina no se observa la señal característica que se aprecia en las otras muestras; debido a que la concentración de vitamina existente en el extracto de leche es demasiado pequeña.

Esto se confirma en la gráfica al comparar las señales de la disolución de vitamina y la del extracto adicionado, se puede observar claramente que existe una diferencia en las alturas de los picos a 361nm que es proporcional al incremento en la concentración de vitamina para el extracto adicionado (vitamina existente + vitamina adicionada).

Para comprobar la eficiencia de la extracción con TCA de la vitamina B₁₂ de la matriz se fortificó a la leche con diferentes concentraciones de vitamina B₁₂, antes de realizar el proceso ácido de extracción. Las señales obtenidas con las concentraciones añadidas se ilustran en la Figura 20.

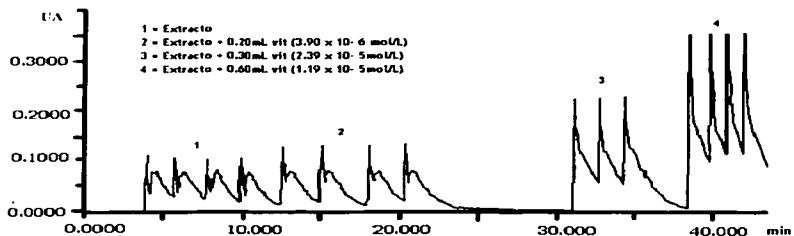


Figura 20. Diagrama con la fortificación de la leche con diferentes concentraciones de vitamina B₁₂.

La señal registrada confirma que realmente al someter a la muestra (leche) al tratamiento propuesto (precipitación ácida) se extrae la vitamina B₁₂ de la matriz, pero acompañada de impurezas de otra naturaleza, las cuales es necesario eliminar.

4.3.3 Estudio de la eliminación de interferencias

4.3.3.1 Uso de resinas de intercambio

Para obtener una señal clara de las muestras era necesario eliminar las impurezas existentes. En primer lugar se utilizaron resinas de intercambio tanto aniónico (QAE SEPHADEX A – 25) como catiónico (CM SEPHADEX C – 25) con el fin de purificar el extracto. La finalidad de este estudio fue la de establecer una configuración FIA apropiada para que en continuo se pudiera extraer la vitamina del extracto y/o de la leche y obtener una señal libre de impurezas. Se hicieron varias pruebas utilizando diferentes disoluciones amortiguadoras con distintos valores de pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0) para evaluar la retención y la elusión de la vitamina.

La primera prueba fue un tratamiento que se realizó en "bach", empacando en columnas a las resinas suspendidas en disoluciones buffer con pH de 4.0, 5.0, 6.0 para la catiónica y 6.0, 7.0, 8.0 para la aniónica, hasta una altura de 10.0 cm. Se agregó a cada una 1.50 mL de disolución de vitamina B₁₂ de una concentración de 1.99×10^{-5} M manteniéndola en la resina por 5.0 minutos. Se realizaron lavados con el buffer a diferentes pH's para evaluar el efecto de éste en la retención.

Los resultados revelaron que solo la columna con resina catiónica empacada con buffer pH 4.0 retiene a la vitamina después de dos lavados con esta disolución, lo que significa que no es capaz de eluirla, pero al lavar la columna con agua destilada la vitamina es eluida de la resina.

De acuerdo con estos resultados se decide evaluar el efecto del agua destilada sobre las resinas, agregando la misma cantidad de disolución de vitamina (1.5 mL) a diferentes columnas, pero en esta ocasión solo se realizó el lavado con agua destilada. Se confirmó el efecto del agua como agente de elusión de la vitamina.

Con estos resultados se eligió la columna con resina catiónica, identificándola como CAT4 por el valor de pH al que trabaja, y se adaptó a la configuración FIA que se muestra en la figura.7 para realizar la extracción de la vitamina B₁₂ en continuo.

Optimización de la columna de intercambio catiónica en la configuración FIA

Siguiendo la configuración descrita en la metodología (figura 8) y utilizando la columna adaptada para esta configuración (figura 7), se hizo pasar a través de ella durante un minuto y a un caudal de 1.0 mL/min una disolución de vitamina B₁₂ preparada en disoluciones buffer con distintos valores de pH y con una concentración aproximada de 3.994×10^{-6} M. Al término de éste se realizó la elusión de la vitamina con agua destilada con el mismo caudal por 2.0 min, tiempo en el cual ya no se aprecia coloración en la columna. Se llenó el bucle de la válvula y se inyectaron 100 µL dentro del portador. La figura 21 muestra el diagrama obtenido utilizando diferentes disoluciones buffer con valores de pH de 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 como medio portador de la disolución de vitamina para evaluar la capacidad de retención de la resina al variar el pH del líquido portador.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

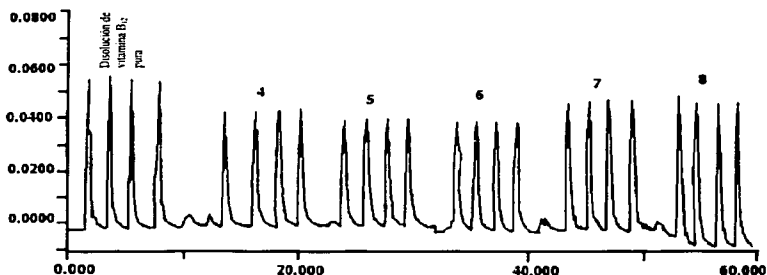


Figura 21. Diagrama retención de la vitamina con diferentes soluciones buffer como portador.

Los números indican el valor de pH para las disoluciones buffer utilizadas. Se hicieron 4 inyecciones para cada una de ellas, incluyendo 4 para una disolución de vitamina en agua destilada utilizada como referencia.

Aparentemente los resultados indican que a valores de pH alcalinos existe una mayor retención de la vitamina en la resina por presentar valores de absorbancia mayores pero no muy diferentes a los obtenidos a otros pH's. Estos valores se tomaron como referencia para evaluar el comportamiento de la resina y compararlos con los resultados obtenidos en "bach". Se decide trabajar con la misma resina que en "bach" (cat4 a un valor de pH = 4.0 para la disolución buffer de acetatos) ya que en ambos casos este valor de pH favorece la retención de la vitamina en la resina y es el valor de pH más cercano al del extracto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3.3.2 Análisis del flujo de alimentación de la muestra con el portador

Conociendo el comportamiento de la resina bajo distintos valores de pH y utilizando el que favorece a la retención de la vitamina se realizó el análisis del flujo de alimentación del portador para evaluar la capacidad de retención de la resina. Se utilizaron los siguientes caudales 0.10, 0.20, 0.25, 0.50 mL/min, para una disolución de vitamina 1.99×10^{-5} M, hasta alcanzar un volumen total de muestra de 1 mL. Obteniendo como resultado que el caudal con el que se obtiene una señal mayor es el de 0.10 mL/min; debido probablemente a un prolongado tiempo de interacción (10 min) entre la vitamina y la resina.

La elusión de la vitamina se realizó con agua destilada a un caudal de 0.37 mL/min por un periodo de tiempo de 2.50 minutos haciendo pasar un volumen final de 2.0 mL, volumen al cual no se distingue coloración característica de la vitamina en la resina. También se evaluó la influencia del volumen total de disolución de vitamina que se hace pasar a través de la columna utilizando un caudal de 0.10 mL/min. Se compararon tres volúmenes que van de 1.0 a 3.0 mililitros manteniendo todos los otros parámetros constantes: caudal del portador, volumen de lavado con buffer = 0.05 mL y caudal de agua como medio de elusión.

Se esperaba que al incrementar el volumen final que se hace pasar a través de la columna aumentaría la magnitud de la señal ya que una mayor cantidad de vitamina sería retenida por la resina. Los resultados revelaron que no se manifiesta esta proporcionalidad, ya que la magnitud de la señal para un volumen total de 3.0 mL fue 0.3019 UA y es muy similar a la de 1.0 mL (0.3028 UA) e inferior a la de 2.0 mL (0.3506).

Este comportamiento se atribuye a una posible saturación de la resina al trabajar con una concentración un tanto elevada de vitamina (1.99×10^{-5} M).

Para evaluar este comportamiento se hizo uso de una disolución con una concentración de $7.97 \times 10^{-7}M$, manteniendo todas las condiciones constantes y registrando las señales analíticas para los volúmenes totales de 1.0 y de 2.0 mL que son los que presentaban diferencias significativas en las señales obtenidas anteriormente (figura 22).

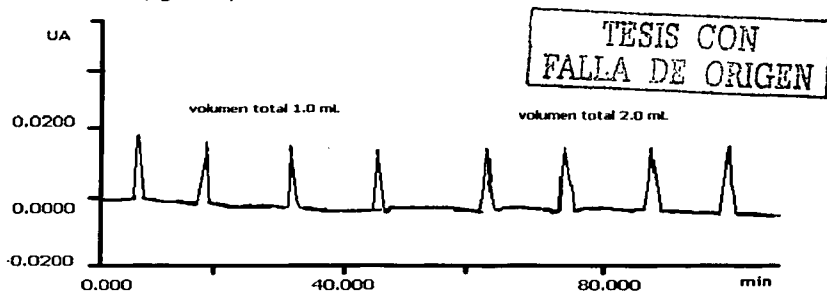


Figura 22. Diagrama de la evaluación de saturación con disolución vitamina $7.97 \times 10^{-7}M$. Se pasaron volúmenes de 1 y 2 mL haciendo 4 inyecciones para cada uno de ellos, manteniendo todas las condiciones constantes

Los valores de absorbancia promedio para cada uno de los volúmenes finales fueron: 1.0 mL (0.0162 UA) y para 2.0 mL (0.0165 UA). Como se puede observar no presentan diferencia significativa, esto significa que existe un límite para la retención de la vitamina por parte de la resina y que no se puede incrementar la retención haciendo pasar por ésta un volumen mayor a 1.0 mL, sin embargo representa una inversión mayor en cantidad de muestra y en tiempo de análisis.

Se realizó el cálculo de preconcentración de la vitamina B_{12} utilizando la resina CAT 4 y se tomó el valor promedio de las absorbancias para un volumen final de 2.0 mL, por ser el volumen que presenta el máximo valor de absorbancia cuando

se utiliza una concentración de vitamina de $1.99 \times 10^{-5} \text{M}$. Haciendo uso de la ecuación de la recta de la curva de calibración de vitamina B_{12} se calculó la concentración de vitamina después de haber sido retenida y eluida posteriormente de la resina.

El valor para la preconcentración es de 1.2 veces, el cual es muy bajo por lo que no presenta un incremento significativo en la señal analítica producida por la vitamina. Debido a que el tiempo de análisis es largo, además de que los resultados revelan que probablemente los sitios de la resina donde se retiene a la vitamina se saturan y a que solo se retiene en la parte superior de la columna, y a pesar de que al incrementar la concentración de vitamina en el flujo, no se mejora la retención, se probó otro sistema para la eliminación de las interferencias de la matriz alimentaria

4.4 Extracción de la vitamina B₁₂ utilizando una cámara de diálisis acoplada a una configuración de flujo continuo.

En primer lugar como mecanismo para eliminar las interferencias en el extracto se utilizó una cámara de diálisis acoplada a la configuración FIA colocándola entre la válvula de inyección y el detector como se muestra en la figura 23.

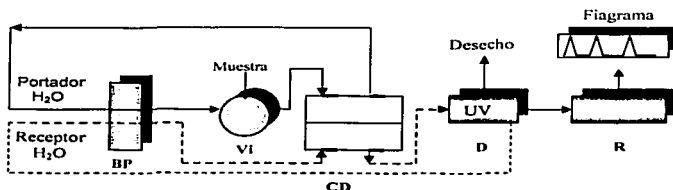


Figura 23. Configuración FIA con cámara de diálisis acoplada utilizada para la eliminación de interferencias en el extracto. Donde: BP bomba peristáltica, VI válvula de inyección, CD cámara de diálisis, D detector, R registrador.

La muestra se hizo pasar a través de la cámara de diálisis por un periodo de 20 min, después del cual se detuvo el flujo para obtener el espectro de absorción, realizando un barrido desde 250 nm hasta 700 nm.

Como se muestra en la figura 24 para comparar el espectro obtenido (extracto dializado 4 y 5), se obtuvo el espectro de diferentes muestras sin tratamiento de diálisis: Disolución de vitamina (1), disolución de vitamina con ácido tricloroacético (2) y extracto de leche (adicionado con vitamina antes del proceso de extracción) (3).

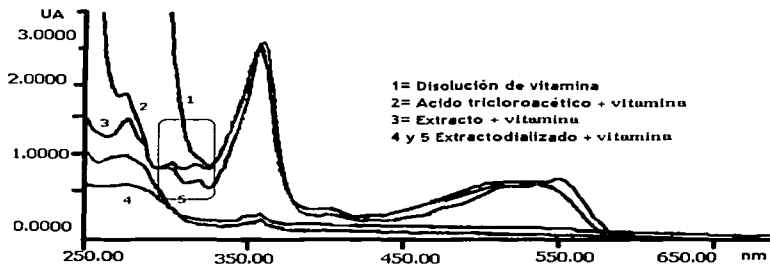


Figura 24. Espectros de absorción para diferentes muestras con vitamina B₁₂. Se aprecia la eliminación de interferencias mediante el proceso continuo de diálisis (zona enmarcada).

La señal a 361 nm del extracto sometido al proceso de diálisis aparece claramente disminuida en magnitud con respecto a las señales de las otras muestras, esto debido a la dilución a la que es sometida al difundirse la vitamina hacia el líquido receptor donde evidentemente las interferencias disminuyen como se muestra en la zona delimitada por la circunferencia. Para evaluar que la disminución en las interferencias no se debía al efecto de la dilución, se sometieron a las muestras a distintos tratamientos como se describe posteriormente.

Durante el proceso de extracción de la vitamina de la leche con TCA, se centrifugó de manera adicional al extracto, para de esta forma intentar eliminar las interferencias. Se realizó un estudio para comparar la capacidad de la membrana de diálisis para eliminar estas mismas interferencias, sometiendo a las distintas muestras (disolución de vitamina (1), extracto centrifugado (2) y extracto sin centrifugar (3)) todas con una concentración de vitamina de 3.98×10^{-7} M a un proceso de diálisis por 20.0 min disminuyendo la longitud de la tubería de 80.0 hasta aproximadamente 40.0 cm de longitud (equivalente a 3.0 mL) para de esta manera

disminuir el efecto de dilución y por lo tanto incrementar la señal obtenida como se muestra en la figura 25.

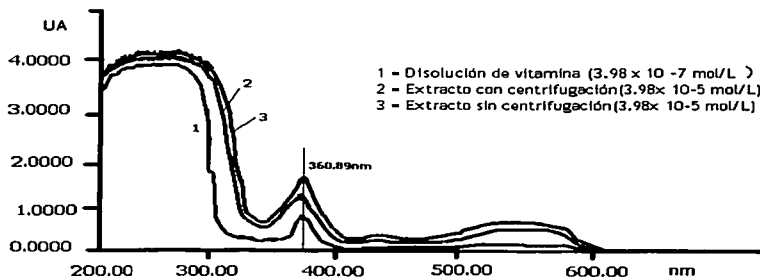


Figura 25. Espectro de absorción de 3 muestras con diferentes características para la evaluación de la necesidad de centrifugar para obtener el extracto antes del proceso de diálisis.

En la figura anterior se observa que las señales analíticas de los extractos son muy semejantes entre sí y presentan características muy similares a las registradas para la disolución de vitamina pura, por lo que se comprueba que las interferencias se eliminan con el proceso de diálisis y no es necesario centrifugar después de realizar la extracción reduciéndose el tiempo de preparación de las muestras.

4.4.1 Estudio de la cámara de diálisis utilizando un circuito cerrado en una configuración de flujo continuo

Tomando en cuenta los resultados anteriores se preparó una curva de calibración usando disoluciones de vitamina pura y utilizando la configuración en línea que se describe en la metodología (figura 8 a y b). La señal obtenida se

incrementa en función del tiempo y corresponde a la cantidad de vitamina que pasa a través de la membrana de diálisis que se registra en forma continua (figura 26).

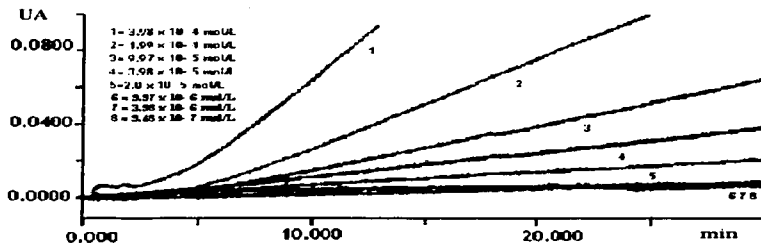
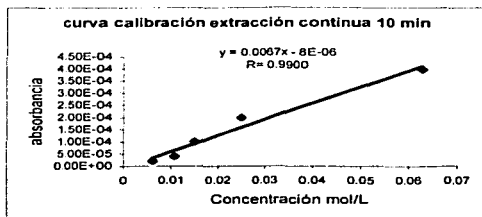


Figura 26. Señales obtenidas en continuo utilizando una cámara de diálisis para diferentes concentraciones de vitamina B₁₂.

Como se aprecia en la figura 26, es posible extraer a la vitamina en forma continua donde se observa el incremento en la concentración de vitamina en el líquido receptor. La concentración más baja que se puede medir con esta configuración se encuentra alrededor de 2.0×10^{-5} mol/L ya que por debajo de este valor, como lo indica la gráfica, no se observan diferencia entre las señales obtenidas.

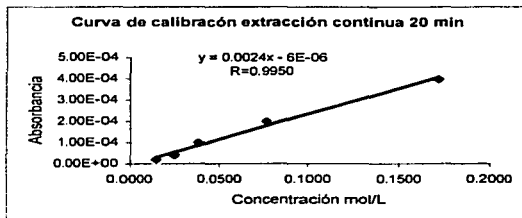
Para evaluar la tendencia de la extracción en continuo se tomaron los valores de absorbancia para cada una de las concentraciones a un tiempo de 10 y 20 minutos en los cuales ya se aprecia una diferencia significativa en la concentración de la vitamina en el líquido receptor. Se realizó una curva de calibración para cada uno de éstos tiempos, figura 27 y 28.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UA	concentración mol/L
0.0062	2.00E-05
0.0108	3.98E-05
0.0150	9.97E-05
0.0250	1.99E-04
0.0630	3.98E-04

Figura 27. Curva de calibración para la diálisis en continuo de vitamina B₁₂ a un tiempo de 10 minutos



UA	concentración mol/L
0.0150	2.00E-05
0.0250	3.98E-05
0.0380	9.97E-05
0.0770	1.99E-04
0.1720	3.98E-04

Figura 28. Curva de calibración para la diálisis en continuo de vitamina B₁₂ a un tiempo de 20 minutos.

Cada una de las curvas de calibración presenta una tendencia lineal para cada uno de los tiempos estudiados, presentando un mejor coeficiente de correlación para un tiempo de extracción de 20 minutos, pero también un valor de pendiente menor que el otro intervalo. Esto indica que después de 10 minutos la extracción empieza a seguir una tendencia como se describe en la figura 29; es decir, el líquido portador está llegando a su máxima capacidad de extracción y por lo tanto a períodos de tiempo más prolongados es de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

esperarse que la pendiente disminuya, reflejando que se está alcanzando el máximo de extracción entre el líquido portador y el receptor (figura 29).

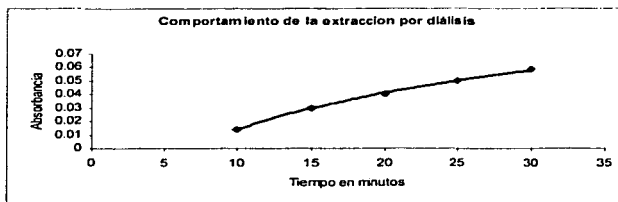


Figura 29. Comportamiento del cambio de concentración el receptor en función del tiempo en una extracción por medio de diálisis.

De acuerdo con estos resultados se toma como base de diálisis el tiempo de 10 minutos aumentando la sensibilidad en la determinación, además de que esto implica una reducción del tiempo de análisis.

4.5 Curva de calibración para las muestras dializadas

Basándonos en los resultados anteriores, se realizaron las curvas de calibración para la leche sin tratamiento previo alguno (sin precipitación ácida) solamente adicionando concentraciones conocidas de vitamina B₁₂ y se comparó contra la curva de calibración del extracto fortificado con concentraciones conocidas de vitamina antes del proceso de extracción. La configuración utilizada para estas determinaciones es la mostrada en la figura 30, en la cual después del proceso de diálisis se inyectó por medio de la válvula 3 el líquido receptor (100 µL) en un portador de agua destilada que lo acarrea hasta el detector y medir a 361 nm la concentración de vitamina B₁₂ dializada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las curvas presentan la misma cantidad de puntos (5) con series de tres inyecciones por punto, manteniendo las mismas concentraciones para cada uno de ellos.

La tabla 5 muestra las concentraciones utilizadas de vitamina B₁₂ para cada uno de los 5 puntos de las curvas de calibración de las muestras utilizadas.

Puntos	Concentración mol/L de vitamina B ₁₂
1	2.0×10^{-5}
2	3.98×10^{-5}
3	9.97×10^{-5}
4	1.19×10^{-4}
5	1.99×10^{-4}

Tabla 5. Concentraciones adicionadas a la leche y al extracto de leche para cada uno de los puntos de las curvas de calibración.

Se obtuvieron las señales analíticas de la disolución de vitamina B₁₂ a diferentes concentraciones. Con la finalidad de conocer la dependencia lineal de la absorbancia con respecto a la concentración de la vitamina, se manejó un volumen de inyección de 100 μ L y un tiempo de diálisis de 10 minutos ya que a este tiempo de diálisis se obtienen resultados favorables en la extracción de la vitamina con la configuración en circuito cerrado.

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

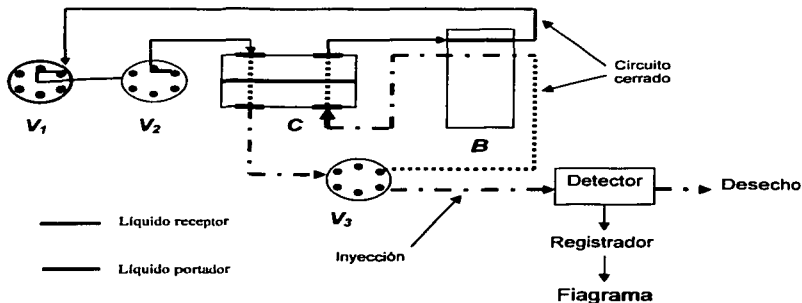


Figura 30. Configuración utilizada para la inyección de muestras al sistema FIA para obtener las curvas de calibración después de ser dializadas.
 V₁, V₂. Válvulas de inyección que forman el circuito cerrado.
 V₃. Válvula de inyección al sistema FIA con un volumen de muestra de 100 μ L la cual hace llegar la muestra al detector.
 C. Cámara de diálisis en la cual una de las salidas va al desecho o se mantiene el circuito cerrado (portador) y el receptor se dirige al detector UV- VIS aprovechando el caudal proporcionado por la bomba peristáltica B.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

4.5.1 Curva de calibración para el extracto de leche.

Se adicionó a la leche diferentes concentraciones de vitamina B₁₂ antes de obtener al extracto mediante el proceso de precipitación ácida.

La figura 31 muestra las señales obtenidas al dializar e inyectar al sistema, por triplicado, cada uno de los estándares.

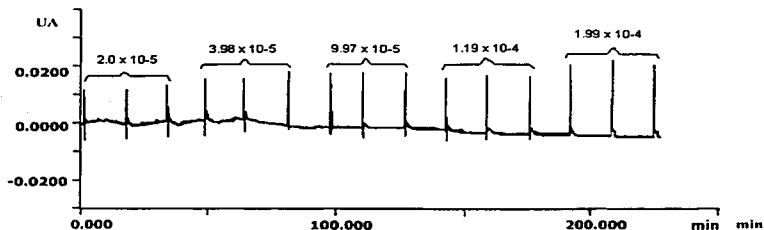
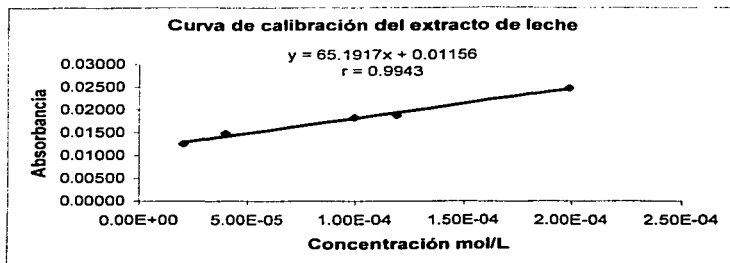


Figura 31. Diagrama obtenido de la inyección por triplicado del extracto adicionado con vitamina B₁₂ a diferentes concentraciones.

Los resultados revelan una tendencia lineal para los valores de absorbancia en función de la variación de la concentración adicionada al extracto, y no existen interferencias en la señal analítica como existían antes de dializarla, ver figura 18 y 20. El coeficiente de correlación fue 0.9943 como se indica en la figura 32.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Concentración mol/L	Concentración mg/L	Absorbancia
2.00E-05	31.592	0.01248
3.98E-05	62.870	0.01478
9.97E-05	157.486	0.01825
1.19E-04	187.972	0.01871
1.99E-04	314.340	0.02472

Figura 32. Curva de calibración para el extracto de leche adicionado en el intervalo de 1.99×10^{-5} a 2.00×10^{-4} mol/L con un coeficiente de correlación de 0.9943.

Los valores que aparecen en la tabla de la figura 32 corresponden a un promedio de tres determinaciones para cada una de las concentraciones utilizadas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.5.2 Curva de calibración para la leche fortificada y sin tratamiento de precipitación ácida.

Para la curva de calibración de la leche sin tratamiento alguno se fortificó con diferentes concentraciones de vitamina B₁₂. La diálisis y la medición se realizó igual que para el extracto fortificado. El fiagrama obtenido se muestra en la figura 33.

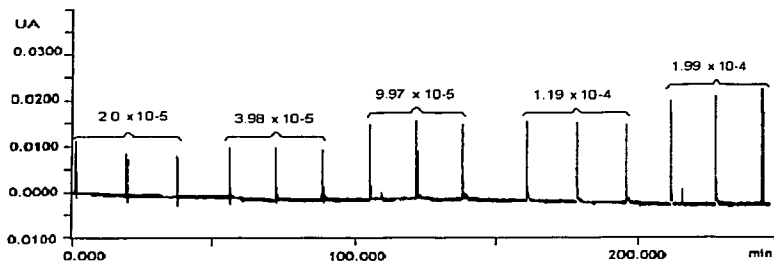
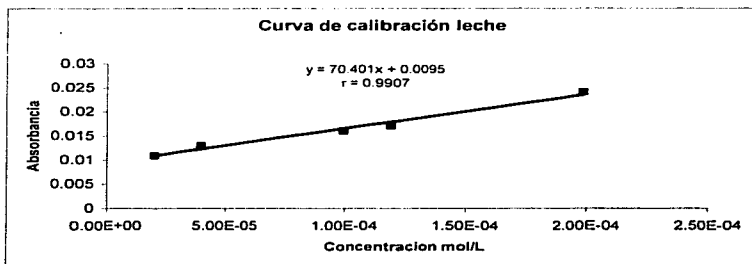


Figura 33. Fiagrama de la curva de calibración para la leche adicionada con diferentes concentraciones de vitamina B₁₂ en un intervalo de 1.99×10^{-4} a 2.00×10^{-5} mol/ L, inyectadas por triplicado.

El registro de las señales para la leche sin tratamiento, no presenta interferencias para cada una de las concentraciones manejadas en el intervalo de 1.99×10^{-4} a 2.00×10^{-5} mol/ L; presentando una tendencia lineal con respecto al incremento en la concentración de vitamina en la muestra, con un coeficiente de correlación de 0.9907, ver figura 34.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Concentración mol/L	Concentración mg/L	Absorbancia
2.00E-05	31.592	0.0109
3.98E-05	62.870	0.0130
9.97E-05	157.486	0.0160
1.19E-04	187.972	0.0170
1.99E-04	314.340	0.0241

Figura 34. Curva de calibración de leche sin tratamiento, adicionada y dializada con diferentes concentraciones de vitamina B₁₂ 1.99×10^{-4} a 2.00×10^{-5} mol/L

El valor de absorbancia registrado en la tabla de la figura 34 corresponde a un promedio del valor de tres determinaciones para cada una de las concentraciones utilizadas.

Las curvas obtenidas para las diferentes muestras presentan tendencias lineales en el intervalo de concentración estudiado, lo cual se refleja en los valores de los coeficientes de correlación. La naturaleza de la muestra no interfiere con el

paso de la vitamina a través de la membrana hacia el líquido receptor, eliminando por lo tanto las interferencias.

Por otro lado los valores de las pendientes de las curvas correspondientes al extracto y leche adicionados con vitamina B₁₂ presentan similitudes en cuanto a magnitud y al valor de la ordenada al origen de ambas ecuaciones como se observa en la tabla 6.

Concentración mol/L Para los puntos	Curva de calibración Extracto adicionado UA	Curva de calibración Leche adicionada UA
1 2.00E-05	0.01248	0.0109
2 3.98E-05	0.01478	0.0130
3 9.97E-05	0.01825	0.0160
4 1.19E-04	0.01871	0.0170
5 1.99E-04	0.02472	0.0241
Ecuación de la recta	$Y = 65.1917x + 0.01156$	$Y = 70.401x + 0.0095$
Coefficiente de correlación	0.9943	0.9907

Tabla 6. Valores correspondientes a las curvas de calibración para la disolución de vitamina B₁₂, extracto de leche y leche adicionados con vitamina B₁₂ antes del proceso de diálisis realizadas en una configuración FIA.

Los valores de absorbancia para las curvas del extracto y la leche adicionados con vitamina B₁₂ presentan una misma tendencia en cuanto al incremento de su magnitud.

Las señales obtenidas utilizando la configuración de la figura 30 muestran que es posible determinar la vitamina B₁₂ en leche.

La utilización de una cámara de diálisis con una membrana de celulosa acoplada a una configuración de flujo continuo permite dializar las muestras de leche

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

para eliminar las interferencias y poder medir la concentración de vitamina B₁₂ en continuo. Este método no requiere de un pre-tratamiento de la muestra muy elaborado por lo que ahorra tiempo de análisis y al realizarse en forma continua la purificación de la vitamina, los errores en la manipulación de la muestra se disminuyen.

Capítulo V

Conclusiones

- ✦ El intervalo lineal para la determinación de vitamina B₁₂ es de 0.787 a 39.40 mg/L con un límite de detección de 0.1130 mg/L y un límite de cuantificación de 0.3751 mg/L con una frecuencia de muestreo de 48 inyecciones /hora.

- ✦ La extracción de la vitamina B₁₂ de la muestra de leche, mediante la precipitación de proteínas es posible, pero quedan compuestos que interfieren con la medición.

- ✦ La resina de intercambio catiónico es la que presenta una mayor retención de la vitamina a un pH 4.0, pero tan solo se logra una preconcentración de 1.2 veces, lo que ocasiona que la extracción de la vitamina en continuo no sea eficiente.

- ✦ La cámara de diálisis permite eliminar las interferencias que se quedan en disolución cuando se hace la separación de la vitamina B₁₂ por precipitación de las proteínas con TCA.

- ✦ Utilizando una cámara de diálisis con una membrana de celulosa y una detección en continuo, no se requiere de un tratamiento previo en la leche para separar la vitamina B₁₂.

- ♣ Se pueden utilizar muestras de naturalezas muy diferentes que contengan vitamina B₁₂ como extractos con un pH ácido, disoluciones puras; muestras complejas como la leche para realizar la purificación de la vitamina B₁₂.
- ♣ De acuerdo a los resultados obtenidos sería posible cuantificar el contenido de vitamina B₁₂ en diferentes tipos de leche (descremadas, pasteurizadas, bronca, etc) y otras matrices alimentarias que contengan vitamina B₁₂.

Capítulo VI**Bibliografía**

1. Valcarcel C. M., Luque de Castro M.D. Análisis por Inyección en Flujo. Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba, pág. 398 - 456, 1984.
2. Oliveira, M.I., Carmo, C., Araujo, A., **L-Glutamate determination in food samples by flow injection analysis**, *Analytica Chimica Acta*, December **2001**. Volume 448, Issues 1-2, , pag. 207 - 213.
3. Garrido, M., Lista, A.G., Palomeque, M., **Fluorimetric determination of fluoride in a flow assembly integrated on-line to an open/closed FIA system to remove interference by solid phase extraction**, *Analytica Chimica Acta*, Volume 30, Issues 3-4, July **2002**, pag. 201 - 207.
4. Lenz, E. Steve, T. Craig., **Flow injection analysis with multiple on-line spectroscopic analysis (UV, UR, ¹H-NMR and MS)**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 27, Issues 1-2, January **2002**, pag. 191 - 200.
5. Hashmi, Manssur-UI-Haque. Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations. *John Wiley and Sons*, U.S.A., pág. 630 - 945, 1973.
6. Berry, O. P. The Technology of Vitamins in Food. ed. Blackie Academic and Professional, London, pág. 28, 34 – 35, 98 – 99, 223 – 242, 1993.
7. Rosenberg, H. R. Chemistry and Physiology of de Vitamins. ed. Intercience Publishers Inc., New York , pág. 99 - 153, 219 – 243, 1975.
8. Association of Vitamin Chemists. Métodos de Análisis de Vitaminas. ed. Academia, León España, pág. 22. 150 – 160, 1970.
9. Martindale, E. The Extra Pharmacopeia. Royal Pharmaceutical Society. 31^a Edition. London, pág. 1385, 1996.

10. Casanueva, E. *Nutriología Médica*. Editorial Panamericana, Fundación Mexicana para la Salud, México, pág. 170, 190 - 193, 1995.
11. West, E.S., Todd, W. R. *Bioquímica Médica*. Editorial Interamericana 14^ª edición, México 1990., pág. 750 – 760.
12. Guisar, C., Liliana, M. *Análisis de comparación de B₁₂ como materia prima por método espectrofotométrico y microbiológico*. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 28, 1967.
13. Cunniff, P. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th edition, Virginia E.U. Volume II, chapter 45, pág. 44.
14. Wei Qin, Zhujun Zhang, Huajun Liu. **Chemiluminescence flow sensor for determination of vitamin B₁₂**, *Analytica Chimica Acta*, **1997**. pág. 127 – 132.
15. Nepote, A. J., Damiani, P.C. **Chemometrics assisted Spectroscopic determination of vitamin B₆, vitamin B₁₂ and dexamethasone in injectables**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Volume 31, Issue 4, 26 March 2003, pág. 621 – 627.
16. Baker, S. A and Miller – Inli, N. J. **Determination of cobalamins using Capillary Electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Spectrichimica Acta part B: Atomic Spectroscopy*, Volume 55, Issue 12, 15 December 2000. pág 1823 – 1832.
17. Hua – Bin, L., Feng Chen., Yue Jiang. **Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high – performance liquid chromatography with fluorescence detection**, *Journal of Chromatography A*, 891, 2000. pág 243 – 247.

25. Macheras. P, Koupparis. M, **An automated flow injection – serial dynamic dialysis technique for drug – protein binding studies.** *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 30, Issues 2 – 3, June **1986**, pag. 123 – 132.
26. Friedner. S, Josephson. B, Levin. K, **Vitamin B₁₂ determination by means of radioisotope dilution and ultrafiltration.** *Clinica Chimica Acta*, Volume 24, Issues 1, April **1969**, pag. 171 – 179.
27. Skoog, D. A. Química Analítica. Ed. Mc.Graw-Hill, México, D.F., pág. 605 - 607, 1998.
28. Miller, J.C., Miller, J.N., Estadística para Química Analítica, Addison – Wesley, Wilmington, Delaware, E.U.A., 1993, pág. 100 – 104.
29. Amiot, J. Ciencia y tecnología de la leche. ed. Acribia S.A., Zaragoza España, pág. 250, 252 - 259, 1992.
30. Orozco, C. C. Método Colorimétrico en la valoración de la Vitamina B₁₂ en el Extracto de Hígado con el reactivo Nitroso R-salt. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 28, 1967.
31. Benitez, E. Determinación Polarográfica de Vit. B₁₂ en preparados multivitamínicos, Tesis maestría, UNAM, México, D.F., 1991, pág. 82 - 85.
32. Calvin, C., Ion Exchangers in Organic and Biochemistry, Interscience publishers Inc., New York, N.Y., 1957, pag. 520 - 522
33. Konrad, D., Ion Exchangers. Properties and Applications, Ann arbor science publishers, Inc., New York, N.Y., 1979, pag. 85 - 87, 99 -102.