



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Identificación de productos radiolíticos
de la vitamina B₆ y de la niacina
en solución acuosa**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

HIRAM FERNANDO RAMÍREZ CAHERO



MÉXICO, D. F.

2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia y especialmente a mi mamá: la señora Silvia Cahero, por todo el apoyo brindado durante tantos años y por confiar en mí: ``maman, c'est toi la plus belle du monde''. A todos ellos dedico este trabajo: una investigación de vitaminas.

Quiero agradecer también toda la ayuda brindada por Yolanda Guzmán Mejía y Christian Peralta Guzmán durante mi estancia en la Facultad de Química (``la Fac''), así como a Salvador Rangel Guadalupe, a Marcela Castro Martínez, a Yordan Garcés Rivero y, finalmente, a Maribel Esparza Robles, del Instituto de Ciencias Nucleares, por su gran apoyo.

Deseo agradecer, muy especialmente, a Norma Erika González Tahuilán, por todo su apoyo y amor: por estar siempre a mi lado.

Agradezco, asimismo, la revisión de los asesores de esta tesis y a la Dra. María Guadalupe Albarrán Sánchez, directora de este trabajo, por su infatigable apoyo académico, dedicación, paciencia infinita, conocimientos transmitidos y, sobre todo, por su amistad y afecto: Gracias por todo.

Además, expreso mi más sincera gratitud a mis alumnos *du français*: Jorge Rangel Cuenca, Martha Hilda Reyes Juárez y Ana María Jiménez Soto, por todo el apoyo brindado. Sólo les puedo decir una palabra (seulement un mot): Gracias: ``ese apoyo sí se vió''.

Agradezco a mis profesores de la UNAM, y de manera específica a los de la Facultad de Química, por su preparación, dedicación y tiempo, así como por los conocimientos transmitidos, y también a Tamila, ex profesora del Centro Universitario Cultural (CUC): gracias por la enseñanza de *la langue française*; y ¿por qué no?, gracias a todos los catedráticos de quienes aprendí a ser un poco radical.

Agradezco igualmente su apoyo y ayuda a Alejandro Heredia Barbero, por ser un excelente ejemplo de superación y persistencia. Y, por otro lado, a Francisco Isidoro Pacheco y a Francisco García Flores: gracias por tantas y tantas irradiaciones; agradezco también la cordialidad de los señores Salvador Teodoro Rodríguez Camacho y Salvador Valle Almazán, así como de Hugo Sánchez Granados y Horacio Cruz Martínez, todos ellos trabajadores de la UNAM.

Mil gracias a todos aquellos que de alguna manera me demostraron su amistad y afecto.

Al mismo tiempo, agradezco el esfuerzo, la investigación y crítica de grandes pensadores y revolucionarios del mundo y, por supuesto, su aporte al pensamiento crítico y libre: Owen Fennema, Robert Morrison, Karl Marx, Simón Bolívar, José Martí, Lenin, Ernesto Guevara de la Serna, Noam Chomsky, Heinz Dieterich Steffan y Luis Javier Garrido Platas: Por el derecho a la discrepancia y a la discusión crítica, sustento de la Ciencia.

Ofrezco, también, cuatro agradecimientos especiales:

Al pueblo de México por sufragar mis estudios, esperando que todos tengan la oportunidad económica de estudiar y de superarse; a la UNAM: por ser la mejor universidad de México: la Máxima Institución de Pensamiento de nuestro país: la Casa de la Reflexión; Gracias a las víctimas del 68 por haberla defendido; y finalmente un agradecimiento y reconocimiento al Comandante en Jefe de Cuba, Fidel Castro Ruz, el estratega político y militar más brillante del siglo XX, por ser un ejemplo de tenacidad, de no claudicación y, sobre todo, por *no bailar al son* de Washington, y no como tantos otros, cuyo nombre es preferible evitar.

Por último, agrego lo siguiente:

La Revolución Cubana, de la cual Fidel Castro es inspirador y líder carismático, sigue siendo, gracias a sus éxitos y a pesar de sus evidentes deficiencias (dificultades económicas, colosal incompetencia burocrática, corrupción a pequeña escala generalizada, penurias, apagones, escasez de transportes, racionamiento, dureza de la vida cotidiana, restricciones de ciertas libertades), una referencia importante para miles de desheredados del planeta. Aquí o allá, en América Latina y en otras partes del mundo, mujeres y hombres protestan, luchan y a veces mueren intentando conseguir objetivos sociales como algunos de los logrados por el modelo cubano.

Fidel Castro: Biografía a dos voces, 2005

Ignacio Ramonet.

Contenido

I. INTRODUCCIÓN	4
1. Generalidades	4
1.1. Descripción de las vitaminas estudiadas	4
1.1.1. Vitamina B ₆	4
1.1.2. Niacina.....	5
1.2. Propiedades físicas y químicas de las vitaminas estudiadas y de la piridina	5
1.2.1. Vitamina B ₆	5
1.2.2. Piridoxina en solución acuosa.....	6
1.2.3. Niacina.....	7
1.2.4. Ácido nicotínico y nicotinamida en solución acuosa	7
1.2.5. Piridina.....	8
1.3. Importancia de las vitaminas	8
1.3.1. Vitamina B ₆	8
1.3.2. Niacina.....	9
1.4. Abundancia en los alimentos	10
1.4.1. Vitamina B ₆	10
Biodisponibilidad en alimentos.....	10
Recomendaciones dietéticas	10
1.4.2. Niacina.....	12
Biodisponibilidad en alimentos.....	12
Recomendaciones dietéticas	12
1.5. Estabilidad de las vitaminas en los alimentos	14
1.5.1. Vitamina B ₆	14
1.5.2. Niacina.....	14
2. Química de Radiaciones	15
2.1. Conceptos básicos	15
2.1.1. Definiciones	15
2.1.2. Radiólisis del agua	16
3. Irradiación de alimentos	18
3.1. Propósitos	18
3.2. Elección de las dosis	19
3.3. Efectividad de la irradiación de alimentos	19
3.4. Principales cambios químicos en los componentes de los alimentos	19
3.5. Estabilidad de las vitaminas a la radiación ionizante	20

3.5.1. Vitamina B ₆ (piridoxina) y niacina	20
3.6. Descomposición de las vitaminas en alimentos irradiados	21
a) Vitamina B ₆ (piridoxamina, piridoxal y piridoxina)	21
b) Niacina	21
4. Radiólisis de vitaminas en solución acuosa	22
4.1. Aspectos cuantitativos de la irradiación de las vitaminas en solución acuosa	22
a) Vitamina B ₆	22
b) Niacina (ácido nicotínico)	23
4.2. Reacciones de la piridina, la niacina y la vitamina B₆ con las especies provenientes de la radiólisis del agua, y de manera particular con los radicales [•]OH	23
a) Niacina y piridina	23
b) Vitamina B ₆	25
c) Reacción del radical [•] H y del electrón acuoso con la piridoxina	26
d) Reacción del radical [•] OH con la piridoxina	27
5. Estudios de productos radiolíticos oxidados por el radical [•]OH en solución acuosa	28
6. Métodos Analíticos	30
6.1. Cromatografía y Cromatografía de Líquidos de Alta Presión	30
6.2. Separación de las vitaminas por CLAP	33
II. OBJETIVOS	35
III. PARTE EXPERIMENTAL	36
1. Material y reactivos	36
2. Equipos	37
3. Metodología	39
a) Preparación de curvas patrón	39
b) Dosimetría	40
c) Preparación e irradiación de las muestras	41
d) Análisis cromatográfico y cálculos	42
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
1. Radiólisis de la vitamina B₆ (piridoxina)	43
a) Curva patrón	43
b) Espectro UV	43
1.1. Efecto de las dosis de irradiación en la piridoxina	44
1.1.1. Productos radiolíticos esperados	44
a) 6-hidroxipiridoxina	45
b) Piridoxal	45
1.1.2. Productos radiolíticos identificados	45

a) 6-hidroxipiridoxina.....	47
b) Piridoxal	51
1.1.3. Cuantificación del piridoxal.....	52
1.1.4. Valor G del piridoxal.....	54
2. Radiólisis de la piridina.....	56
2.1. Efecto de las dosis de irradiación en la piridina	56
2.1.1. Productos radiolíticos identificados.....	57
2.1.2. Cuantificación de los productos radiolíticos	59
2.1.3. Valores G.....	60
2.2. Hipótesis formulada para el estudio de la radiólisis de niacina	63
3. Radiólisis de la niacina (ácido nicotínico).....	64
a) Curva patrón.....	64
b) Espectro UV.....	64
3.1. Efecto de las dosis de irradiación en el ácido nicotínico.....	65
3.1.1. Productos radiolíticos esperados	65
3.1.2. Producto radiolítico identificado: 3-hidroxipiridina.....	66
3.1.3. Cuantificación de la 3-hidroxipiridina.....	67
3.1.4. Valor G	68
3.2. Posibles mecanismos de radiólisis	69
3.3. Productos radiolíticos que no se formaron	71
4. Observaciones generales de las vitaminas y de sus productos radiolíticos.....	72
4.1. Formas químicas en las que se encontraban las vitaminas	72
4.2. Productos radiolíticos.....	72
5. Descomposición radiolítica de las vitaminas en solución acuosa.....	73
5.1. Gráficas.....	73
5.2. Cuantificación	74
5.3. Valores G°	75
CONCLUSIONES.....	77
REFERENCIAS	79

Siglas y abreviaturas utilizadas

ADN	ácido desoxirribonucleico
Co-60	cobalto 60
C ₁₈	cadena octadecilo enlazada en una columna cromatográfica
R ²	coeficiente de correlación
pKa	constante de disociación ácida
CLAP	cromatografía de líquidos de alta presión
CLAR	cromatografía de líquidos de alta resolución
e ⁻ _{ac}	electrón acuoso
eV	electrón-volt
NAD	coenzima nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
m-	isómero <i>meta</i>
o-	isómero <i>orto</i>
p-	isómero <i>para</i>
IR	infrarrojo
kGy	kiloGray
kPa	kilopascales
λ _{máx}	longitud de onda máxima
mg EN	miligramos equivalentes de niacina
mUA	miliunidades de absorbancia
H ₂ O*	molécula de agua en estado excitado
H ₂ O ⁺	molécula de agua ionizada
P ₁	pendiente
— ^{^^} →	proceso de irradiación
m/z	relación masa carga
RMP	resonancia magnética protónica
t _R	tiempo de retención
UV	ultra-violeta
G	valor de rendimiento radioquímico
G°	valor de rendimiento radioquímico cuando la dosis tiende a cero
G _{OH}	valor de rendimiento radioquímico del radical libre •OH
2-OHP	2-hidroxipiridina
3-OHP	3-hidroxipiridina
4-OHP	4-hidroxipiridina

Resumen

Dentro de la Química de Alimentos es fundamental conocer y cuantificar los cambios químicos que se producen cuando los alimentos son sometidos a procesos tecnológicos para su conservación, especialmente cuando se trata de procesos que no son aplicados de manera universal, como la irradiación de alimentos. En ese contexto, uno de los cambios más importantes que debe evaluarse es la descomposición de las vitaminas, que son los nutrimentos más sensibles de los alimentos. En el caso de la irradiación, aun cuando existen varios estudios sobre los efectos de la misma en la mayoría de las vitaminas, tanto en alimentos como en sistemas modelo, pocos de ellos han sido dedicados a la identificación de sus productos radiolíticos de degradación.

La finalidad de este estudio fue la identificación de algunos de los productos radiolíticos de las vitaminas hidrosolubles niacina y vitamina B₆ oxidados por el radical $\cdot\text{OH}$ en soluciones acuosas diluidas. Para tal propósito, se irradiaron soluciones acuosas de cada vitamina empleando radiación gamma. Cabe señalar que no se realizaron modificaciones previas del pH. Las formas químicas utilizadas de la vitamina B₆ y de la niacina fueron, de manera respectiva, la piridoxina y el ácido nicotínico.

Con la intención de predecir algunos de los productos que podían formarse, se analizaron las posibles reacciones entre las vitaminas y los radicales libres $\cdot\text{H}$ e $\cdot\text{OH}$ que se generan en la radiólisis del agua. En el caso de la niacina, a fin de obtener información sobre los posibles sitios de reacción de su molécula, como paso previo a su estudio se irradiaron soluciones acuosas de piridina, por tratarse de la molécula que constituye su anillo base. Los datos obtenidos permitieron predecir la formación del producto identificado de la vitamina.

Antes de la irradiación de las vitaminas, y de la piridina, se determinó la dosis absorbida por sus soluciones acuosas. Una vez conocida ésta, las soluciones fueron saturadas con N₂O (a fin de aumentar la concentración de radicales $\cdot\text{OH}$ en el medio de reacción, así como de eliminar el oxígeno presente), irradiadas a diferentes dosis y, posteriormente, analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con equipo acoplado a un detector de luz ultra-violeta (UV) de arreglo de diodos. Los productos radiolíticos obtenidos fueron comparados con muestras patrón de los productos esperados para comprobar su identidad. Cuando se trató de los mismos compuestos, sus espectros de absorción UV y sus tiempos de retención —empleando las mismas condiciones de análisis— resultaron ser idénticos. En el caso de las vitaminas se cuantificó su porcentaje de pérdida, así como su rendimiento radioquímico de descomposición, y en el caso de los productos radiolíticos, su rendimiento radioquímico de formación.

En el estudio de la vitamina B₆ (piridoxina) se identificaron dos productos: piridoxal y 6-hidroxipiridoxina; en tanto que en el de la niacina (ácido nicotínico) se identificó uno: 3-hidroxipiridina.

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

Las vitaminas son nutrimentos esenciales en la dieta humana.¹ Se trata de sustancias orgánicas muy diversas en cuanto a su estructura molecular, actividad biológica y propiedades químicas.² Su consumo resulta indispensable para el organismo humano debido a que la mayor parte de ellas no pueden ser sintetizadas por éste.^{1, 3} En particular, las vitaminas del complejo B (o grupo B) son todas ellas precursoras de coenzimas esenciales en el metabolismo.¹ Por último, las vitaminas se clasifican con base en su solubilidad: liposolubles e hidrosolubles; encontrándose entre las hidrosolubles las pertenecientes al complejo B.⁴

1.1. Descripción de las vitaminas estudiadas

1.1.1. Vitamina B₆

El término "Vitamina B₆" es un nombre genérico que se aplica a seis sustancias químicamente relacionadas que presentan la misma actividad biológica. Su estructura común corresponde a la molécula 2-metil-3-hidroxi-5-hidroximetilpiridina (figura 1), siendo éstas la piridoxina (figura 2), el piridoxal (figura 3), la piridoxamina (figura 4), y sus correspondientes formas fosfatadas: piridoxina-5-fosfato, piridoxal-5-fosfato (o simplemente piridoxalfosfato) y piridoxamina-5-fosfato.⁵ De la misma manera, el término piridoxina es un nombre que frecuentemente se emplea para referirse a todas las sustancias anteriores y no sólo a la forma que contiene el grupo hidroximetilo en la posición 4,² denominada anteriormente piridoxol.⁵ La vitamina B₆ pertenece al grupo de vitaminas del complejo B.⁶

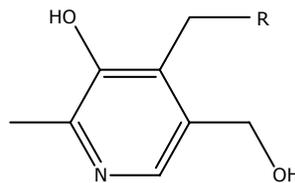


Figura 1. 2-metil-3-hidroxi-5-hidroximetilpiridina.

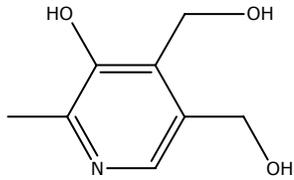


Figura 2. Piridoxina.

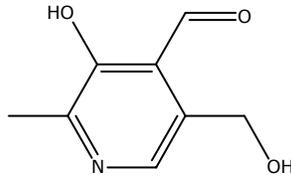


Figura 3. Piridoxal.

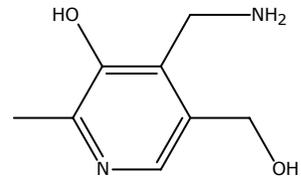


Figura 4. Piridoxamina.

1.1.2. Niacina

“Niacina” es un término general que designa dos compuestos: 1) el ácido 3-piridinacarboxílico o ácido nicotínico (figura 5), y 2) su amida, la 3-piridinacarboxamida o nicotinamida (figura 6).⁵ Anteriormente, la niacina fue denominada factor antipelagra o vitamina PP (Preventive Pelagra),^{7, 8} puesto que fue identificada como agente curativo de la pelagra, enfermedad caracterizada por una dermatitis fotosensible.¹ La niacina era también conocida con el nombre de vitamina B₃, siendo esta designación aún utilizada en etiquetas de información nutrimental.¹ Al igual que la vitamina B₆, la niacina es una vitamina del complejo B.⁶

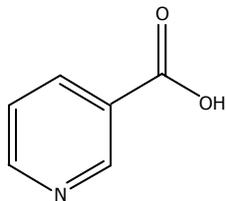


Figura 5. Ácido nicotínico.

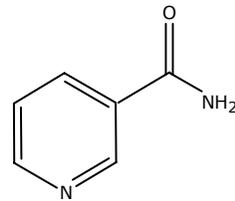


Figura 6. Nicotinamida.

La niacina presenta la particularidad de poder ser sintetizada en el organismo humano a partir del triptófano,⁵ por lo que, estrictamente hablando, no es esencial en la dieta.

1.2. Propiedades físicas y químicas de las vitaminas estudiadas y de la piridina

1.2.1. Vitamina B₆^{5, 7}

A continuación se describe la forma química de la vitamina B₆ que fue utilizada en este estudio, la piridoxina:

Es un sólido blanco; anteriormente conocido como piridoxol

Fórmula molecular: $C_8H_{11}NO_3$

Peso molecular: 169.2 g/ mol

Punto de fusión: 160 °C.

1.2.2. Piridoxina en solución acuosa

Debido al carácter básico del nitrógeno del anillo ($pK_a \approx 8$) y a la naturaleza ácida del hidroxilo de la posición 3 ($pK_a \approx 3.5-5.0$), el sistema piridínico de las moléculas de la vitamina B₆ existe principalmente en forma anfótera a pH neutro. Lo anterior implica que todas estas moléculas están protonadas al pH del organismo y que, en virtud de sus valores de pK_a , su carga neta varía en función del pH. Los valores de pK_a de la piridoxina son 5.0 para el grupo 3-hidroxilo y 9.0 para el nitrógeno;⁵ además, entre pH 5 y 9, la piridoxina está presente en solución acuosa en dos formas: con un protón unido al grupo hidroxilo o bien al nitrógeno del anillo (figura 7).¹⁰

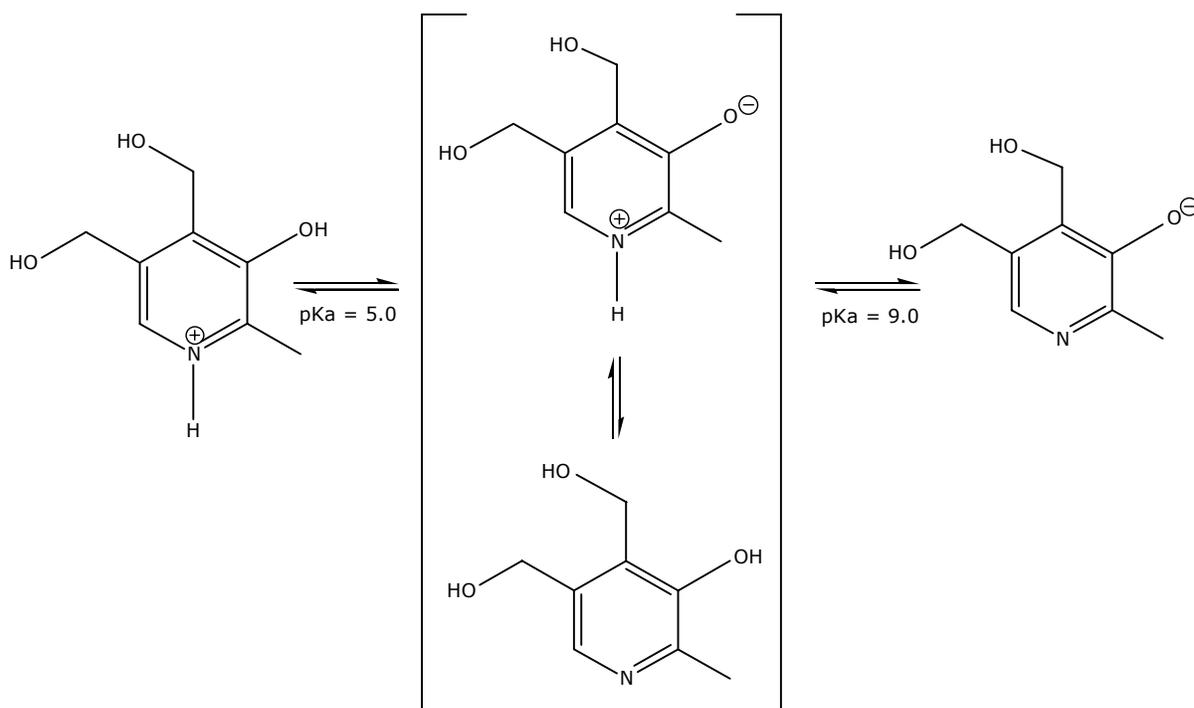


Figura 7. Formas en que puede encontrarse la piridoxina en solución acuosa.

1.2.3. Niacina ^{7, 9, 11, 12}

A continuación se describe la forma química de la niacina utilizada en este estudio, el ácido nicotínico:

Es un sólido blanco no higroscópico que, a temperatura ambiente, es estable al aire

Fórmula molecular: C₆H₅NO₂

Peso molecular: 123.11 g/ mol

Punto de fusión: 236.6 °C

Punto de ebullición: sublima sin descomponerse

Solubilidad: 0.17 g/ 100 mL de H₂O a 20 °C.

1.2.4. Ácido nicotínico y nicotinamida en solución acuosa

El ácido nicotínico en solución acuosa se encuentra en forma iónica (figura 8) presentando dos valores de pKa: 1) 2.07 para el grupo 3-carboxilo, y 2) 4.85 para el nitrógeno.¹³ El pH de una solución saturada es 2.7.⁷

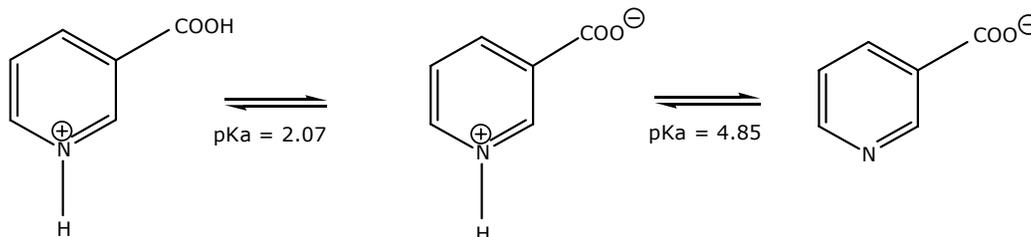


Figura 8. Formas en que puede encontrarse el ácido nicotínico en solución acuosa.

En soluciones acuosas, tanto el ácido nicotínico como la nicotinamida pueden someterse a calentamiento en autoclave durante periodos cortos; por ejemplo, durante 10 minutos a 120 °C, sin degradación; sin embargo, mientras que la estabilidad del ácido nicotínico en solución acuosa es independiente del pH, la nicotinamida es estable solamente a pH neutro. Finalmente, el calentamiento de la nicotinamida en una solución 1 N de ácido o álcali a 100 °C induce su conversión a ácido nicotínico.¹²

1.2.5. Piridina ^{7, 9, 14-16}

La piridina (figura 9) no es una vitamina, sin embargo, en virtud de que se estudió como base para un mejor entendimiento de la radiólisis de niacina, se describe a continuación:

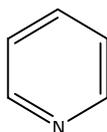


Figura 9. Piridina.

También conocida como azina, es un líquido incoloro con fuerte olor penetrante; completamente miscible en agua

Peso molecular: 79.10 g/ mol

Punto de fusión: - 42 °C

Punto de ebullición: 115 °C

Densidad: 0.9819 a 20 °C.

Propiedades químicas: La piridina resiste las adiciones, pudiendo someterse tanto a la sustitución electrofílica como a la nucleofílica. Es, asimismo, una base débil que forma sales con ácidos fuertes. Su valor de pKa es 5.23, siendo el pH de una solución acuosa 0.2 M de 8.5.

1.3. Importancia de las vitaminas

1.3.1. Vitamina B₆

La vitamina B₆ es precursora de la coenzima piridoxalfosfato (figura 10), que participa en más de cien reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, neurotransmisores, porfirinas y lípidos, así como en la transformación de triptófano en ácido nicotínico; su conversión se lleva a cabo en el hígado.^{3, 5} La piridoxamina-5-fosfato (figura 11) puede también actuar como coenzima en tales reacciones, aunque en menor grado.⁵

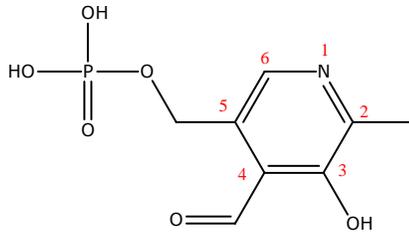


Figura 10. Piridoxalfosfato.

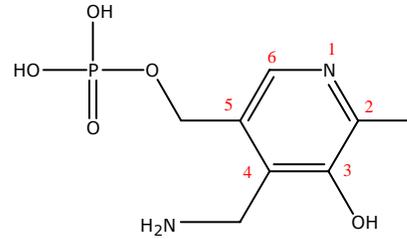


Figura 11. Piridoxamina-5-fosfato.

La deficiencia de vitamina B₆ puede producir anemia microcítica (formación de eritrocitos más pequeños),³ así como diversos signos de alteración neurológica.^{1, 5}

1.3.2. Niacina

La forma activa de esta vitamina en los organismos se encuentra como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP); figura 12.

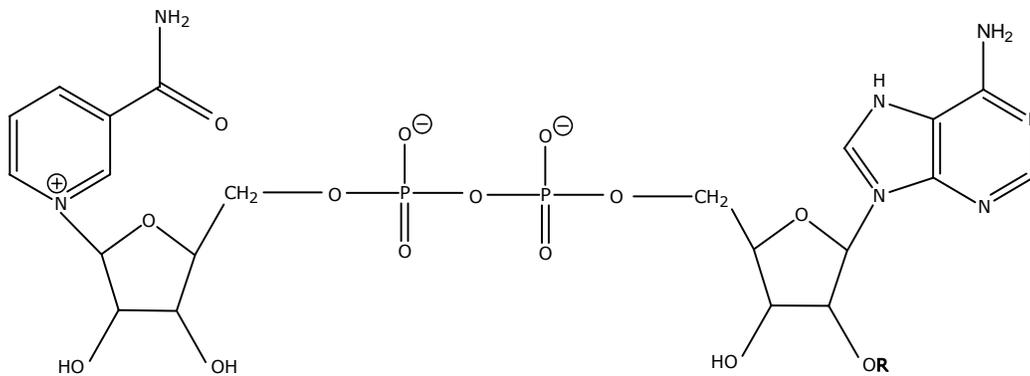


Figura 12. NAD, cuando $R = H$, y NADP, cuando $R = PO_3^{2-}$.

Las dos estructuras correspondientes a la niacina, el ácido nicotínico y la nicotinamida, son precursoras de NAD y de NADP, que intervienen como transportadores de electrones en la cadena respiratoria (reacciones de óxido-reducción) y actúan como coenzimas en la transferencia de hidrógeno en muchas reacciones de deshidrogenasas. De manera particular, la coenzima NAD interviene como aceptor de electrones en la mayor parte de las reacciones del ciclo de Krebs.^{2, 5}

1.4. Abundancia en los alimentos

Tanto la vitamina B₆ como la niacina están ampliamente distribuidas en la naturaleza.^{2, 7}

1.4.1. Vitamina B₆^{1, 2, 7, 17}

La vitamina B₆ se encuentra principalmente en carnes como la de res, pollo, cerdo y pescado (sardinas y atún); en productos cárnicos como jamón; en vísceras (hígado y riñones); en vegetales (coliflor); en tubérculos (papas); en frutas (plátano); en cereales (trigo, maíz y arroz); en leguminosas (lentejas, garbanzo); en nueces, y en la levadura de cerveza. Aunque su distribución varía ampliamente, en los alimentos se encuentran todas las formas químicas, siendo la piridoxina la más estable,⁵ y la más utilizada en la fortificación de alimentos.^{2, 18} Mientras que el piridoxal y la piridoxamina predominan en los alimentos de origen animal, la piridoxina es abundante en cereales, verduras y frutas.⁵

Biodisponibilidad en alimentos. Además de las 6 moléculas mencionadas que presentan actividad de la vitamina B₆, existen en la naturaleza formas químicas de ésta unidas a un carbohidrato a través de un enlace glicosídico (denominadas en su conjunto formas glicosiladas de la vitamina B₆), las cuales se encuentran en alimentos como cereales, verduras y frutas, principalmente como piridoxina-5'-β-D-glucósido. Dichas moléculas no son absorbidas por el organismo a menos que ocurra su hidrólisis.⁵

Recomendaciones dietéticas. Las recomendaciones diarias de esta vitamina para México van de 0.3 a 1.4 mg para niños; de 1.7 a 2.0 para hombres, y de 1.4 a 1.6 para mujeres. La cantidad recomendada para el embarazo y la lactancia es, en ambos casos, de 2.2 mg.¹⁷

A continuación, en la tabla 1 se muestra el contenido de vitamina B₆ en algunos alimentos ricos en ésta:

Tabla 1. Alimentos con un alto contenido de vitamina B₆.¹⁷

Alimento	Vitamina B₆ (mg/ 100 g)
Piñón	0.73
Garbanzo	0.54
Arroz integral, precocido o pulido	0.30
Carnes	
Carne magra de cerdo: pierna o lomo	0.90
Conejo de crianza y liebre	0.50
Vísceras: hígado	
Res	0.94
Pollo	0.76
Cerdo	0.69
Frutas y verduras	
Granada china	1.50
Plátano	0.58
Aguacate y betabel	0.28
Chile habanero, jalapeño y poblano	0.28
Poro	0.25
Nabo	0.18
Perejil y pimiento morrón rojo	0.16
Guayaba	0.14
Jitomate	0.09

1.4.2. Niacina

Las principales fuentes de niacina son las carnes, el hígado de carnero y cerdo, el pescado, el pollo, las leguminosas, la levadura de cerveza y los cereales, donde la mayor parte se concentra en la cáscara.^{2, 7, 17, 19} Apreciables cantidades se encuentran en frutas y verduras, mientras que alimentos como la leche y el huevo, aun cuando la contienen en bajas cantidades,² constituyen excelentes fuentes de ésta debido a 1) su alto contenido de triptófano en el caso del huevo, y 2) en el caso de la leche, al consumo de importantes volúmenes de ésta, que también contiene triptófano.¹⁹

Biodisponibilidad en alimentos. Casi toda la niacina se encuentra en el salvado del cereal en forma de niacitina, que es ácido nicotínico esterificado a moléculas como carbohidratos, péptidos y fenoles. La niacitina no puede ser utilizada por los humanos a menos que el ácido nicotínico se libere de ella; lo que se consigue tratando los cereales en medio alcalino. Otra de las formas no biodisponibles de la niacina, presente en baja concentración en granos y legumbres, y en alta concentración en café, es el alcaloide trigonelina o ácido N-metilnicotínico, cuya desmetilación ocurre (en el caso del café) durante el tostado. En lo que se refiere a las formas reducidas de las coenzimas NAD y NADP (NADH y NADPH, de manera respectiva), éstas exhiben muy baja disponibilidad debido a que son inestables en las condiciones ácidas del estómago.⁵

Recomendaciones dietéticas. Las recomendaciones de niacina se expresan en miligramos equivalentes (mg EN); lo que significa que la cantidad de triptófano que se convierte en niacina en el organismo (que corresponde a 1/ 60 —en virtud de que se requieren 60 mg del aminoácido para que se sintetice 1 mg de vitamina—) ya está considerada.¹⁹ En el caso de México, las recomendaciones diarias para niños van de 6 a 14 mg EN; de 15 a 17 para mujeres; y de 17 a 20 para hombres, así como también en el caso del embarazo y la lactancia.

En la tabla 2 se muestra el contenido de niacina en algunos alimentos ricos en ésta:

Tabla 2. Alimentos con un alto contenido de niacina.¹⁷

Alimento	Niacina (mg/ 100 g)
Pescados: Bonito	12.80
Conejo de crianza	10.00
Chícharo	2.60
Papa amarilla	2.00
Vísceras: hígado	
Carnero	16.90
Cerdo	15.30
Res	12.80
Frutas y verduras	
Chile morita	15.00
Tamarindo y aguacate	1.90
Tomate verde	1.70
Granada china y mamey	1.50
Guayaba	1.20
Durazno amarillo	1.00
Ciruela roja	0.90

1.5. Estabilidad de las vitaminas en los alimentos

Las vitaminas son destruidas en mayor o menor proporción durante los procesos industriales de conservación de alimentos, así como durante la preparación culinaria.²

1.5.1. Vitamina B₆

La vitamina B₆ es sensible a la luz y su degradación puede originar pérdidas durante el procesamiento térmico, preparación y almacenamiento de los alimentos, así como también durante su análisis. Por irradiación con luz UV y en presencia de oxígeno, los compuestos de la vitamina B₆ se transforman en sustancias biológicamente inactivas. Aunque todas las formas de la vitamina B₆ son estables a pH muy ácido (pH = 1) y al calor, se descomponen por la acción de álcalis. Por otro lado, la velocidad de descomposición no fotoquímica de la vitamina durante el procesamiento térmico de los alimentos depende de su forma química, de la temperatura, del pH, así como de la presencia de carbohidratos reductores y proteínas. Como caso concreto, la esterilización comercial de leche evaporada puede causar pérdidas de 40-60 % de la vitamina. No obstante, durante el calentamiento de los alimentos, la piridoxina puede también convertirse en otra forma química de la vitamina B₆ sin pérdida de actividad biológica.⁵

1.5.2. Niacina

La niacina es probablemente la más estable de todas las vitaminas: es muy estable a la luz, al oxígeno, a los cambios moderados de pH, a las bajas temperaturas de almacenamiento y al calor del cocinado de los alimentos;^{3, 5} sin embargo, el lavado de los granos de maíz cocido ocasiona pérdidas en el cereal. En contraste, el cocinado puede aumentar la concentración relativa de niacina cuando la nicotinamida se libera de las coenzimas NAD y NADP durante la ebullición del maíz. El calor, especialmente bajo condiciones ácidas, induce la conversión de nicotinamida a ácido nicotínico sin pérdida de la actividad vitamínica.⁵

2. Química de Radiaciones

La Química de Radiaciones es el estudio de los efectos químicos producidos en un sistema por la absorción de radiación ionizante.^{20, 21} Dicho estudio implica la identificación de las especies formadas cuando la radiación interactúa con la materia; de los productos estables —denominados productos radiolíticos—, así como de la transformación del sistema.

2.1. Conceptos básicos

2.1.1. Definiciones

a) Irradiación. Para efectos de este estudio, se entenderá por irradiación al proceso de exposición de un sistema a la radiación gamma (γ).

b) Radiación ionizante. Es el tipo de radiación que posee la energía suficiente para excitar o ionizar a los átomos con los cuales interactúa.²⁰ Dicha radiación puede provenir de núcleos radiactivos en forma de partículas α , β o de radiación γ ,^{22, 23} siendo esta última un tipo de energía con alto poder de penetración.^{24, 25}

c) Radiólisis.²⁰ Es la transformación química de una sustancia inducida por la radiación ionizante.

d) Unidades. La dosis de radiación absorbida por un material que ha sido irradiado (dosis de irradiación) se expresa en términos de la cantidad de energía que se absorbe por unidad de masa. La unidad de dosis absorbida es el Joule por kilogramo (J/ kg), que se conoce como Gray (Gy).²⁶ La unidad de dosis de radiación anteriormente empleada era el rad, que fue definido como 100 erg/ g. Los factores de conversión entre las unidades mencionadas son:

²⁰

$$1\text{Gy} = 100 \text{ rad}$$

$$1 \text{ Gy} = 6.241 \times 10^{15} \text{ eV/ g}$$

e) Razón de dosis.²⁷ Es la dosis absorbida por unidad de tiempo. La unidad correspondiente del Sistema Internacional es el Gy/ s, pudiendo expresarse también como Gy/ min o Gy/ h.

f) Actividad.⁹ La unidad de actividad es el Becquerel (Bq), que se define como una desintegración por segundo. Antiguamente se utilizaba el Curie, que equivale a 37 GBq.

g) Dosimetría.²⁸ La dosimetría es la medida de un cambio físico o químico producido por efecto de la radiación. La cuantificación de dicho cambio se utiliza como medida de la dosis absorbida.

h) Rendimiento radioquímico.²⁶ En Química de Radiaciones, una medida del número de moléculas o especies químicas formadas o destruidas por cada 100 electrón-volts (eV) de

energía absorbida es el rendimiento radioquímico, conocido como valor G, el cual se obtiene a través de la siguiente fórmula:

$$G = \frac{\text{número de moléculas o especies químicas producidas o destruidas}}{\text{dosis}} \times 100 \text{ eV}$$

Según sea el caso, puede calcularse el valor G de formación de una sustancia o, bien, su valor G de descomposición. Para ello, las dosis se expresan en electrón-volt por gramo (eV/g) o por mL (eV/mL). En particular, el valor de rendimiento radioquímico de descomposición cuando la dosis absorbida tiende a cero se conoce como valor G° o valor G inicial, y puede determinarse por extrapolación (a dosis cero) en una gráfica de valor G en función de la dosis de irradiación.²⁹

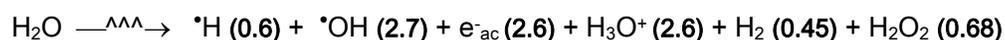
i) Productos radiolíticos primarios.³⁰ Para fines de este trabajo, se denominará productos radiolíticos primarios a los productos químicos estables formados por las reacciones de las especies primarias reactivas provenientes de la radiólisis del agua (apartado 2.1.2) con las vitaminas y la piridina.

j) Productos radiolíticos secundarios. De manera análoga, se denominará productos radiolíticos secundarios a los productos estables formados por la reacción de los productos radiolíticos primarios con las especies primarias reactivas provenientes de la radiólisis del agua.

Nota. A menos que se realice alguna precisión, al hablar de productos radiolíticos se estará haciendo referencia a los productos radiolíticos primarios de las vitaminas y/o de la piridina, que fueron los únicos investigados en esta tesis.

2.1.2. Radiólisis del agua

La radiólisis del agua esta constituida por todos aquellos cambios químicos inducidos en el agua por efecto de la radiación ionizante durante el proceso de irradiación. En términos generales, la radiólisis del agua puede representarse mediante la siguiente ecuación, que incluye el valor G de las especies formadas:²⁶



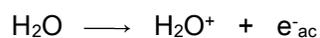
Nota. e_{ac}^- representa un electrón rodeado de moléculas de agua, también conocido como electrón hidratado o electrón acuoso.

Los radicales libres $\cdot\text{H}$ e $\cdot\text{OH}$, y el e^-_{ac} , son conocidos como especies primarias,³¹ intermediarias o reactivas de la radiólisis del agua, en tanto que el H_2 y el H_2O_2 son los productos estables de ésta. Mientras que el radical $\cdot\text{OH}$ es un potente agente oxidante, el e^-_{ac} y el radical $\cdot\text{H}$ son agentes reductores.³² Para entender de qué manera se forman tales especies, es necesario tomar en cuenta los dos principales eventos que se presentan cuando la radiación ionizante interactúa con el disolvente: 1) la excitación de sus moléculas:

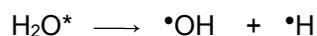
31, 33



y 2) su ionización:



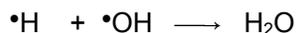
A su vez, a partir de una molécula de agua excitada pueden formarse los radicales hidrógeno e hidroxilo:



Asimismo, una molécula de agua ionizada (H_2O^+) puede dar origen a un ion hidronio y al radical hidroxilo:



Finalmente, cuando dos radicales $\cdot\text{H}$ y dos $\cdot\text{OH}$ reaccionan entre sí, se forman, de manera respectiva, los productos moleculares H_2 y H_2O_2 , mientras que la reacción entre $\cdot\text{H}$ y $\cdot\text{OH}$ produce agua:



3. Irradiación de alimentos

La irradiación de alimentos es un proceso físico utilizado como método de conservación de los mismos en el que se emplea radiación ionizante.^{24, 25} La posibilidad de conservar alimentos por irradiación fue considerada por primera vez en 1950.² Sus principales objetivos son la eliminación de microorganismos y la prolongación de la vida de anaquel de los productos alimenticios sin el deterioro de su calidad nutritiva o sensorial.⁵ No obstante, como sucede con otros métodos de conservación, durante la irradiación de alimentos también llegan a producirse, en función de las dosis, pérdidas de nutrientes esenciales, especialmente de los más sensibles, como es el caso de las vitaminas;³⁴ aunque, por otro lado, se sabe que tales pérdidas son inferiores a las registradas en los tratamientos térmicos equivalentes.^{24, 25} Las fuentes de radiación γ frecuentemente utilizadas en la irradiación de alimentos son el Cobalto-60 y el Cesio-137, debido a que con la energía emitida por estos elementos —producida por su desintegración radiactiva— se alcanza la penetración necesaria en los productos alimenticios para los propósitos de conservación.^{2, 25} En la actualidad, con el fin de minimizar las pérdidas nutrimentales por efecto de la radiación, se tiende a combinar la irradiación γ de alimentos a bajas dosis con la adición de conservadores.³⁵

A nivel internacional, se ha establecido que la irradiación de alimentos a una dosis de 10 kGy no representa riesgos toxicológicos, microbiológicos o nutrimentales para el consumo humano.⁵

3.1. Propósitos

La irradiación de alimentos puede ser utilizada con objetivos específicos; dependiendo de cual se trate, se elige la dosis de irradiación: >10 kGy en el caso de la esterilización; de 1-10 kGy para propósitos de sanitización (que se refiere a la reducción de los microorganismos totales —incluyendo la eliminación de bacterias patógenas— a niveles que las autoridades consideren seguros);^{2, 36} y ≤ 1 kGy para la prevención de brotes en papas, cebollas y ajo, así como en la eliminación de insectos.^{5, 24} Debido a que la exposición de alimentos a dosis superiores a 10 kGy puede conferirles propiedades sensoriales desagradables, y ocasionar una pérdida importante de nutrientes como las vitaminas,³⁴ la esterilización de alimentos mediante irradiación se aplica de manera limitada.²⁴ Igualmente, se evita la irradiación de alimentos con alto contenido graso puesto que los radicales libres formados en el proceso son precursores de la oxidación lipídica, responsable de la generación de sabores y aromas indeseables.³⁴

3.2. Elección de las dosis

Para elegir las dosis de irradiación a las que van a ser expuestos los alimentos se toman en cuenta los siguientes factores: a) la cantidad y tipo de microorganismo que se desea eliminar, así como b) el tipo de alimento, su temperatura, pH y contenido de agua. Tales factores son importantes porque, por ejemplo, la resistencia de ciertos microorganismos puede aumentar al disminuir la temperatura del alimento,²⁴ y lo mismo puede ocurrir cuando aumenta su contenido de humedad.³⁷ Asimismo, a mayor cantidad de microorganismos en un producto alimenticio, se van a requerir mayores dosis para alcanzar su destrucción. Entre los microorganismos que pueden aumentar su resistencia conforme aumenta el contenido de humedad de los alimentos se encuentran los del género *Bacillus*.³⁷ Con respecto a la sensibilidad de los microorganismos a la radiación ionizante, ésta es marcadamente diferente según el tipo, por ejemplo, se sabe que las bacterias Gram - son más sensibles a la radiación ionizante que las Gram +,³⁵ y en el caso de los virus, éstos presentan una particular resistencia a la radiación, no siendo afectados a dosis de 10 kGy.²⁴

3.3. Efectividad de la irradiación de alimentos

La efectividad de la radiación ionizante en los alimentos depende del daño causado al ácido desoxirribonucleico (ADN) por parte de los radicales libres formados durante el proceso de irradiación.³⁴ En virtud de que el principal componente de los alimentos es el agua, los radicales libres formados en el proceso provienen en su mayoría de la radiólisis de ésta, siendo en particular los $\cdot\text{OH}$, señalados como principales radicales oxidantes generados en la radiólisis del agua,³⁸ los responsables de la hidroxilación de las bases púricas y pirimídicas al atacar el ADN de los insectos, parásitos y microorganismos vivos presentes en los alimentos, causando su muerte.^{24, 34}

3.4. Principales cambios químicos en los componentes de los alimentos ²⁴

Los principales cambios químicos que se presentan durante la irradiación de los alimentos, que son responsables de algunos cambios sensoriales detectados en los productos irradiados, se enlistan a continuación:

- 1) Inicio de la autoxidación de las grasas (que incluye la descomposición de vitaminas liposolubles), que da origen a sabores a rancio.
- 2) Ruptura de los enlaces C-S en los aminoácidos que contienen azufre, lo que da como resultado olores y sabores desagradables.
- 3) Fragmentación de los hidratos de carbono de alto peso molecular, que origina el ablandamiento de frutas y verduras.

3.5. Estabilidad de las vitaminas a la radiación ionizante

La estabilidad de las vitaminas a la radiación ionizante depende de su estructura química, de su reactividad, de factores ambientales y del medio o sistema en el que se encuentren. En el caso de las vitaminas contenidas en los alimentos, dicha estabilidad depende de su pH, actividad acuosa, composición y geometría del alimento, así como de las dosis de irradiación a las que son expuestos; igualmente, intervienen la temperatura de irradiación, la luz, la presión parcial de oxígeno y la temperatura de almacenamiento de los productos alimenticios,³⁹ siendo estos tres últimos agentes de relevancia después de un tratamiento de irradiación. Por otro lado, es fundamental mencionar que las vitaminas puras en solución acuosa presentan menor resistencia a la radiación ionizante que cuando se encuentran en alimentos. Lo anterior se debe a que los demás constituyentes de los alimentos ejercen un efecto protector de las vitaminas^{24,39} al competir con éstas por los radicales libres formados en la radiólisis del agua durante el proceso de irradiación, dando como resultado pérdidas pequeñas de las mismas; no obstante, una excepción la constituye la tiamina o vitamina B₁, que es la vitamina hidrosoluble más sensible a la radiación ionizante,^{24, 39} en cuyo caso se pueden detectar pérdidas significativas aun en alimentos; por ejemplo, ésta puede ser muy estable en cereales como el trigo y no serlo en otros como maíz o en leguminosas como garbanzo y habas.⁴⁰

La estabilidad de las vitaminas a la radiación ionizante es también distinta cuando éstas se irradian como sólidos puros, presentando en este último caso mayor resistencia que en soluciones acuosas de la mismas, como ocurre en el caso de la cianocobalamina o vitamina B₁₂,^{41, 42} de la tiamina⁴³ y de la vitamina B₆ (piridoxina).⁴⁴ De manera análoga, las vitaminas presentan mayor resistencia a la radiación ionizante en soluciones acuosas menos concentradas, como se ha informado para la niacina³⁹ y, también, para las vitaminas anteriores: cianocobalamina,^{41, 42} piridoxina,⁴⁴ y tiamina.⁴⁵

3.5.1. Vitamina B₆ (piridoxina) y niacina

Mientras que la niacina se ha clasificado como una vitamina "ligeramente sensible" a la radiación ionizante, mostrando mayor resistencia en alimentos que en soluciones acuosas, la piridoxina exhibe mayor sensibilidad.³⁹

3.6. Descomposición de las vitaminas en alimentos irradiados

a) Vitamina B₆ (piridoxamina, piridoxal y piridoxina). A continuación se presentan grupos de alimentos irradiados en los que se ha analizado el contenido de vitamina B₆:

Leguminosas. Cuando fueron irradiadas las leguminosas brasileñas *Phaseolus vulgaris* L. variedad Carioca y *Vigna unguiculata* L. Walp, variedad Macaçar, a dosis entre 0.5 y 1 kGy, la vitamina B₆ prácticamente no fue afectada, ubicándose entre 2 y 2.5 % su porcentaje de descomposición; empero, su contenido decreció con el aumento de la dosis, alcanzando pérdidas de 17 a 22 % a 10 kGy.⁴⁶

Cereales. En muestras de trigo que fueron irradiadas a una dosis máxima de 2 kGy y almacenadas durante tres meses, se registraron pérdidas pequeñas de la vitamina.²⁴

Carnes y vísceras. En el caso de pollo e hígado de res, no se observaron pérdidas posteriores al tratamiento de irradiación a dosis entre 2.8 y 5.6 kGy.⁴⁷

b) Niacina. En chuletas de cerdo irradiadas a diferentes temperaturas a una dosis máxima de 5 kGy, se han detectado pérdidas de niacina sólo después de cierto tiempo de almacenamiento.²⁴ En cereales y leguminosas como maíz, trigo, habas y garbanzo irradiados a dosis entre 0.5 y 5.0 kGy, las pérdidas máximas fueron, de manera respectiva, 4.3, 1.8, 2.9 y 4.8 %.⁴⁰ En pan elaborado con harina de trigo irradiada entre 0.5 y 5 kGy se determinó mayor cantidad de niacina que en pan elaborado con harina de trigo no irradiada;²⁴ un resultado que es posible explicar tomando en cuenta que la radiación ionizante puede interactuar con los complejos de niacitina existentes en el trigo y liberar niacina en el proceso. Por último, a una dosis de irradiación de 27.9 kGy, se han registrado pérdidas de ácido nicotínico de 48 % en duraznos y de 35 % en leche en polvo.³⁹

4. Radiólisis de vitaminas en solución acuosa

En los sistemas biológicos y alimenticios, así como en las soluciones acuosas diluidas (< 0.1 M), la radiación ionizante es absorbida principalmente por el agua, que es el componente mayoritario.^{27, 48, 49} En virtud de ello, los cambios químicos ocasionados por la irradiación de dichos sistemas suelen ocurrir de manera indirecta a través de las especies primarias reactivas provenientes de la radiólisis del agua (e^-_{ac} , $\cdot H$, $\cdot OH$),⁴⁹ siendo éstas las principales responsables de la destrucción de las vitaminas en medio acuoso.⁵⁰ Por esa razón, en los estudios de radiólisis de vitaminas en solución acuosa se consideran las posibles reacciones entre éstas y las especies mencionadas, y en el caso particular de esta investigación, cuyo objetivo principal fue la identificación de algunos de los productos radiolíticos de la vitamina B₆ y de la niacina oxidados por el radical $\cdot OH$, se analizaron las posibles reacciones de estas moléculas con dicha especie.

4.1. Aspectos cuantitativos de la irradiación de las vitaminas en solución acuosa

a) Vitamina B₆.⁴⁴ La irradiación γ de piridoxina y piridoxal en solución acuosa, y como sólidos puros, conduce a una gran destrucción de éstos. De estas dos formas químicas de la vitamina B₆, la molécula que presenta mayor sensibilidad a la radiación ionizante es el piridoxal. Específicamente, entre los factores que intervienen en la descomposición radiolítica de la piridoxina en solución acuosa destacan la presencia o ausencia de oxígeno y el pH. Con respecto a este último, tal como lo demostraron Galatzeanu y Antoni (1966),⁴⁴ la destrucción radiolítica de la piridoxina es mayor en soluciones ácidas que en soluciones acuosas de la vitamina pura (siendo el pH para una solución 1 mM de piridoxina, de 6.3); pero mucho mayor a pH alcalino. Por ejemplo, a una dosis de 10 kGy las pérdidas fueron de 73 % a pH = 1.12; de 48 % en soluciones acuosas del compuesto puro, y de 100 % a pH = 12.5. La irradiación en dicho estudio se realizó en presencia de aire.

En otro estudio de radiólisis de piridoxina en solución acuosa, también en presencia de aire (Beltrán Texocotitla, 2002),⁵¹ en el que las dosis de irradiación se ubicaron entre 0 y 2 kGy, se informó la generación de tres productos radiolíticos a partir de la vitamina, mismos que no fueron identificados. De acuerdo con dicha investigación, el porcentaje de descomposición radiolítica de la piridoxina a la máxima dosis absorbida fue de 59 %, y su valor G°, de 3.5 moléculas destruidas por cada 100 eV de energía absorbida. La concentración inicial de piridoxina fue 1 mM.

b) Niacina (ácido nicotínico). En este caso, se ha observado mayor destrucción radiolítica cuando se irradian soluciones acuosas diluidas; por ejemplo, se ha notificado un porcentaje de pérdida de 17 % de niacina cuando se irradia una solución 0.4 mM de ésta con 5 kGy, y de 0 % al irradiar una solución 0.8 mM con 8.5 kGy.³⁹

4.2. Reacciones de la piridina, la niacina y la vitamina B₆ con las especies provenientes de la radiólisis del agua, y de manera particular con los radicales $\cdot\text{OH}$

La piridina, la vitamina B₆ y la niacina son consideradas en un mismo apartado por tratarse de moléculas que poseen la estructura común del anillo piridínico, pero sobre todo por compartir características similares de reactividad frente a los radicales libres y al e_{ac}^- .

Durante la irradiación —ya sea de alimentos o de soluciones acuosas—, las vitaminas hidrosolubles y los aminoácidos aromáticos son muy susceptibles de ser degradados puesto que los compuestos insaturados son extremadamente reactivos frente al radical $\cdot\text{OH}$.⁴⁹ En tales compuestos, el $\cdot\text{OH}$ presenta la tendencia a adicionarse al sistema aromático en vez de abstraer un hidrógeno.³¹ En particular, las vitaminas del complejo B son muy reactivas frente a los radicales $\cdot\text{H}$ e $\cdot\text{OH}$, así como frente al e_{ac}^- , y al reaccionar con cualquiera de éstos pueden dar origen, a su vez, a la formación de radicales libres muy reactivos.⁵²

Por otro lado, en los casos de la niacina^{39, 53} y de la vitamina B₆,⁵⁰ así como en el de la piridina, no existe evidencia de que la ruptura del anillo aromático ocurra fácilmente durante su irradiación.

a) Niacina y piridina. Los radicales $\cdot\text{OH}$ provenientes de la radiólisis del agua reaccionan con los compuestos aromáticos predominantemente por adición al anillo.⁴⁹ Así, la adición del $\cdot\text{OH}$ ha sido documentada para heterociclos como la piridina⁵⁴ y sus derivados sustituidos,⁵⁵⁻⁵⁸ así como para la quinolina,⁴⁸ teniendo lugar, principalmente, en los sitios del anillo más ricos en electrones, siendo éstos las posiciones 3 y 5 en el caso de la piridina; lo que conduce primordialmente a la formación del isómero 3 (*meta*),⁵⁴ que no presenta una estructura de resonancia tan desfavorable como los isómeros 2 (*orto*) y 4 (*para*).^{16, 59} A ese respecto, el porcentaje de adición del $\cdot\text{OH}$ a la posición *meta* en la piridina es de 80 % o mayor.^{54, 58} En caso de que alguna de las posiciones *meta* (3 ó 5) esté sustituida, como sucede con las dos moléculas correspondientes a la niacina, la adición del $\cdot\text{OH}$ tomará lugar en la posición *meta* no sustituida, siendo ésta, en el caso particular del ácido nicotínico, la posición 5. En ese sentido, también existe evidencia de la formación del radical intermediario que por oxidación produciría ácido 5-hidroxinicotínico (figura 13).^{13, 58}

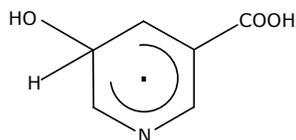


Figura 13. Radical intermediario del ácido 5-hidroxinicotínico.

Suplementariamente, en un estudio sobre la adición del $\cdot\text{OH}$ a todas las monocarboxipiridinas y dicarboxipiridinas existentes (encontrándose, desde luego, entre ellas el ácido nicotínico),⁵⁸ se observó la tendencia de este radical a adicionarse a los carbonos del anillo aromático no sustituidos por el grupo carboxilo (un resultado análogo a lo observado para los carboxibencenos), registrándose, a su vez, que el porcentaje de adición del mismo a la posición *meta* (3 ó 5) respecto al nitrógeno de todas las moléculas estudiadas fue $\geq 90\%$, excepto en el caso del ácido 3,5-dicarboxipiridínico. En cuanto a dos de las carboxipiridinas no sustituidas en la posición 3 que fueron analizadas en dicho estudio: el ácido 2-carboxipiridina (ácido picolínico) y el ácido 2,4-piridinadicarboxílico, se observó una preferente adición del $\cdot\text{OH}$ a la posición 5 de éstas, y no a la 3. Tal diferencia podría deberse —según se dice— a un impedimento estérico por parte de los grupos carboxilo adyacentes a la posición 3 en ambas moléculas, dando como resultado que la adición del radical a este sitio no se vea favorecida.

Por su parte, tanto el radical $\cdot\text{H}$ como el e_{ac}^- también reaccionan con la piridina y sus derivados sustituidos,⁵⁵⁻⁵⁷ entre los que se halla el ácido nicotínico.¹³ Con los derivados sustituidos de la piridina, el radical $\cdot\text{H}$ reacciona principalmente por adición al anillo piridínico. Finalmente, la reacción del e_{ac}^- con varias piridinas (y cationes piridinilo), entre las que se encuentran la niacina (ácido nicotínico y nicotinamida) y la coenzima NAD, produce el radical piridinilo (figura 14),⁶⁰ que es un radical reductor intermediario.

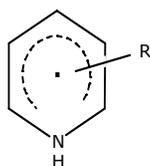


Figura 14. Radical piridinilo.

De acuerdo con la información bibliográfica, a partir de dicho radical se forma el que ha sido, al parecer, el único producto radiolítico de la niacina (ácido nicotínico) en solución acuosa informado hasta ahora: el ácido 1,4-dihidronicotínico (figura 15).¹³

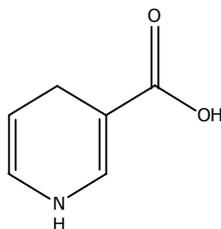


Figura 15. Ácido 1,4-dihidronicotínico.

Con respecto a otras posibles reacciones radiolíticas de la piridina, y de la niacina, así como no hay evidencia de la ruptura del anillo piridínico, tampoco la hay de la formación de algún N-óxido de piridina por reacción del nitrógeno con el $\cdot\text{OH}$ empleando CLAR.⁵⁴ De manera complementaria, en el caso del compuesto benzopiridina o quinolina, cuya molécula contiene un anillo piridínico fusionado con uno bencénico (figura 16), se ha confirmado que el ataque del radical $\cdot\text{OH}$ al nitrógeno, que es el sitio de mayor densidad electrónica en la molécula, no ocurre.⁴⁸ En lo que se refiere al ácido nicotínico, se ha informado que su descarboxilación puede ocurrir durante su radiólisis en solución acuosa.³⁹

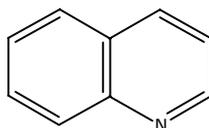


Figura 16. Benzopiridina o quinolina.

b) Vitamina B₆. Irradiando piridoxina en solución acuosa, y como sólido puro, se obtiene piridoxal (figura 3), que es, precisamente, otro de los compuestos que presentan actividad de la vitamina B₆, el cual se forma por oxidación del sustituyente 4-hidroximetilo de la piridoxina; no obstante, la conversión de este grupo funcional a aldehído no queda restringida únicamente a esa posición, siendo también posible la oxidación del grupo 5-hidroximetilo.⁴⁴

El piridoxal es, por otro lado, el único producto radiolítico confirmado e informado hasta ahora de la vitamina B₆, y de la piridoxina, pues, a excepción del ácido piridóxico ó 4-piridóxico (figura 17), señalado por Galatzeanu y Antoni (1966)⁴⁴ como “posible” producto

radiolítico, en los estudios de radiólisis de la vitamina B₆ (y/o de la piridoxina) en solución acuosa, sólo se ha notificado —por los autores mencionados— la obtención de ácidos carboxílicos aromáticos que no fueron identificados. El ácido piridóxico, en caso de producirse a partir de la piridoxina, no sería, empero, un producto radiolítico primario, sino secundario, en virtud de que para producirse, primero tendría que ocurrir la oxidación de la piridoxina para formar piridoxal (producto radiolítico primario) y, posteriormente, la oxidación del grupo 4-aldehído de éste. En esta tesis en particular, debido a que los productos radiolíticos secundarios no fueron objeto de estudio, el ácido piridóxico no se investigó. Tales productos se forman en muy poca proporción en relación con los primarios.

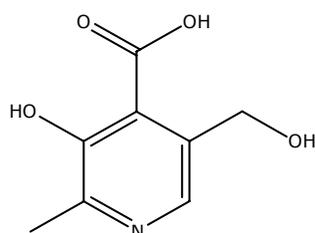


Figura 17. Ácido piridóxico.

c) Reacción del radical $\cdot\text{H}$ y del electrón acuoso con la piridoxina. La piridoxina reacciona tanto con el $\cdot\text{H}$ como con el e^-_{ac} ,⁶¹ siendo las formas de la piridoxina presentes entre pH 5 y 9 (figura 18) las que son particularmente reactivas con éste.¹⁰ Por otra parte, se ha informado que los radicales libres producidos por reacción de la vitamina con los e^-_{ac} , no reaccionan con otras moléculas de piridoxina, debido al bajo potencial redox de ésta ($E^\circ = -1.52\text{ V}$).⁵⁰

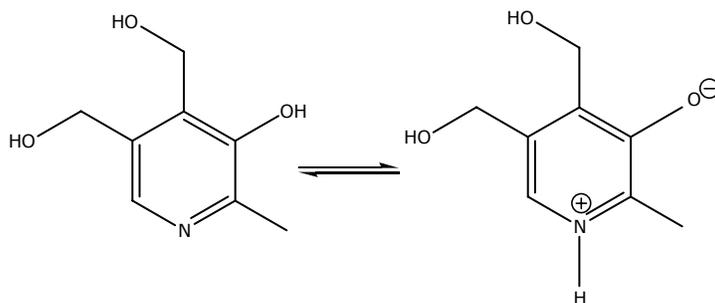


Figura 18. Formas de la piridoxina entre pH 5 y 9, mismas que son particularmente reactivas con e^-_{ac} .

d) **Reacción del radical $\cdot\text{OH}$ con la piridoxina.** Básicamente, dos tipos de reacciones del radical $\cdot\text{OH}$ con la piridoxina han sido enunciadas: 1) su adición a la molécula y 2) la abstracción de un átomo de hidrógeno de los sustituyentes CH_2OH y CH_3 .¹⁰ En el primer caso, los radicales $\cdot\text{OH}$ pueden atacar directamente la molécula de piridoxina, adicionándose a la posición del carbono 6, formando el compuesto 6-hidroxipiridoxina (figura 19), que carece de actividad vitamínica.⁵ Cabe señalar que la misma reacción puede ocurrir, presuntamente, con cualquiera de las formas químicas de la vitamina B_6 ,⁵ como es el caso del piridoxal;⁶² no obstante, se debe mencionar que la reactividad de la piridoxina frente al radical $\cdot\text{OH}$ en solución acuosa depende del pH, pues la desprotonación del nitrógeno (que ocurre a $\text{pH} > 9$) acentúa las propiedades electrofílicas de la molécula, modificando su reactividad, y concretamente aumentándola.¹⁰

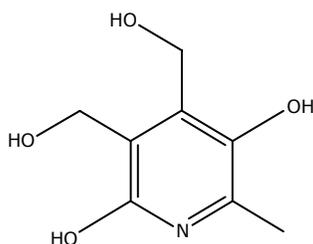
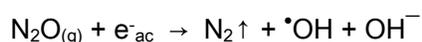


Figura 19. 6-hidroxipiridoxina.

En lo que se refiere a la abstracción de un átomo de hidrógeno por parte del $\cdot\text{OH}$, Galatzeanu y Antoni (1966),⁴⁴ y Kishore, Moorthy y Rao (1982),⁵² propusieron un mecanismo radiolítico para la producción de piridoxal a partir de piridoxina en solución acuosa, en el que la abstracción del átomo de H tiene lugar en el grupo 4- CH_2OH de la piridoxina; empero, en ningún caso se concluyó si, en efecto, la especie radiolítica involucrada era el $\cdot\text{OH}$.

5. Estudios de productos radiolíticos oxidados por el radical $\cdot\text{OH}$ en solución acuosa

Con el propósito de detectar y caracterizar adecuadamente los productos radiolíticos oxidados por el radical $\cdot\text{OH}$ que se forman a partir de sustratos irradiados en solución acuosa, especialmente aquellos que no se producen en cantidades apreciables, se requiere aumentar la concentración de éste durante la irradiación. En particular, en los estudios de Química de Radiaciones del $\cdot\text{OH}$, el aumento de su concentración se consigue saturando las soluciones acuosas de los compuestos de interés —como paso previo a su irradiación— con el agente oxidante $\text{N}_2\text{O}_{(g)}$,²⁶ mismo que reacciona, durante la irradiación, con el electrón acuoso formado en la radiólisis del agua, eliminándolo así del medio —en virtud de que prácticamente todos los e^-_{ac} (> 95 %) reaccionan con el N_2O y ninguno con los sustratos de interés—¹⁰; produciéndose, finalmente, una mayor cantidad de radicales $\cdot\text{OH}$ en el proceso.²⁶ Dicha cantidad será mayor con respecto a la generada en ausencia de gas, cuando los $\cdot\text{OH}$ provienen únicamente de la radiólisis del agua. La reacción del N_2O se muestra a continuación:^{10, 26}



La saturación de las soluciones acuosas con N_2O cumple a su vez la función de eliminar el aire disuelto en las mismas, excluyendo de esta manera la participación del oxígeno molecular en las reacciones.

A diferencia del valor de rendimiento radioquímico del radical $\cdot\text{OH}$ (G_{OH}) que se produce en la radiólisis de agua pura ($G_{\text{OH}} = 2.7$), el valor G_{OH} informado para soluciones acuosas irradiadas que han sido saturadas con N_2O es 5.5.²⁶ En este último caso, el principal radical libre en el medio de reacción es el $\cdot\text{OH}$ (radical oxidante), mientras que el radical $\cdot\text{H}$ (reductor), que también se genera, está presente en una concentración $\approx 10\%$ con respecto al primero.⁶³ Por otro lado, se ha informado que las constantes de velocidad de reacción del radical $\cdot\text{H}$ son, en términos generales, menores (en varios órdenes de magnitud) que las correspondientes al $\cdot\text{OH}$;²⁶ y en el caso específico de la reacción de abstracción de un átomo de hidrógeno a partir de compuestos orgánicos en medio acuoso, el $\cdot\text{OH}$ es ≈ 100 veces más reactivo que el $\cdot\text{H}$.³¹ De manera particular, la velocidad de adición del $\cdot\text{H}$ a las piridinas es, con respecto a sí mismo, de un orden de magnitud menor que en el caso de los bencenos sustituidos,¹³ en cuyos estudios de radiólisis por cierto, *bajo* condiciones de saturación de “sus soluciones acuosas” con N_2O , los principales productos radiolíticos o radicales libres intermediarios que se informan son producidos por el ataque del $\cdot\text{OH}$, y no del $\cdot\text{H}$, tal como se notifica en la radiólisis de benceno,^{63, 64} tolueno,^{63, 65} fenol,⁶⁵ o-, m- y p-cresol,⁶⁶ bifenilo⁶⁷ y de los ácidos salicílico⁶⁸ y benzoico.⁶⁹ Por lo tanto, *bajo*

condiciones de saturación con N_2O de las vitaminas, y de la piridina, en solución acuosa, se espera que la principal especie reactiva sea el $\cdot OH$.

Asimismo, en los estudios radiolíticos frecuentemente se utiliza el agente oxidante $K_3Fe(CN)_6$, que es un compuesto que asegura una rápida y cuantitativa conversión de los radicales libres formados por reacción del $\cdot OH$ con las moléculas de interés a productos estables, minimizando la contribución de reacciones competitivas adicionales, como lo son las reacciones en cadena, evitando así la formación de polímeros.⁴⁸

6. Métodos Analíticos

6.1. Cromatografía y Cromatografía de Líquidos de Alta Presión ^{70, 71, 72}

La cromatografía es una técnica analítica mediante la cual se separan los componentes de una mezcla de acuerdo con las distintas velocidades con que éstos se desplazan a través de una fase estacionaria cuando son transportados por una fase móvil, la cual puede ser líquida o gaseosa. Es importante señalar que todos los métodos cromatográficos tienen en común el uso de una fase estacionaria y de una móvil y, por otra parte, que todas las separaciones cromatográficas están basadas en las diferencias del grado en que se reparten los solutos entre tales fases.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP) se lleva a cabo haciendo pasar un disolvente a alta presión a través de una columna que contiene partículas de fase estacionaria de un diámetro del orden de micrómetros. Las partículas pequeñas se utilizan porque producen mayor resolución en comparación con las de mayor tamaño, permitiendo un flujo más uniforme a través de la columna; no obstante, éstas ofrecen mayor resistencia al paso del disolvente, siendo necesarias presiones entre 7 y 40 MPa para alcanzar flujos de 0.5 a 5 mL/ min. El equipo CLAP consta de una bomba, disolvente(s), una válvula de inyección, una columna, un detector y un registrador. A continuación se desarrollan algunos conceptos básicos en cromatografía y en CLAP:

La columna. En el equipo CLAP se emplean columnas de acero de una longitud de 5 a 30 cm con un diámetro interno entre 1 y 5 mm.

Elución. Es un proceso mediante el cual los solutos son transportados a través de una fase estacionaria por la adición sucesiva de disolvente (también conocido como eluyente).

Flujo. La velocidad con la que la fase móvil pasa a través de una columna cromatográfica se puede expresar como flujo, que indica cuántos mL de disolvente atraviesan la columna por unidad de tiempo.

Tiempo de retención. Es el tiempo necesario después de la inyección de una muestra en la columna hasta que ese componente llega al detector; se representa como t_R .

El cromatograma. Un cromatograma es un gráfico que representa la respuesta de un detector en función del tiempo de elución de los solutos en una columna cromatográfica, y que suministra como único elemento de información el t_R de cada componente de una mezcla. La representación de un compuesto detectado es un "pico" cromatográfico. Es importante señalar que aunque un cromatograma no permite la identificación de una especie química en una muestra, frecuentemente proporciona una evidencia segura de su ausencia. Así, el hecho de que en un análisis no se detecte un producto con el mismo t_R que un

estándar obtenido en idénticas condiciones constituye una prueba importante de que el compuesto en cuestión está ausente (o presente en una concentración por debajo del límite de detección del procedimiento).

Detector. Los detectores más generalizados en cromatografía de líquidos están basados en la absorción de radiación ultra-violeta/ visible. En CLAP, el detector más común es el de luz ultravioleta, debido a que muchos solutos absorben esta radiación. Con un detector de arreglo de diodos es posible registrar todo el espectro de cualquier soluto que pasa por el detector durante la elución, siendo posible, a su vez, a través de un equipo de cómputo con un paquete de programas específicamente diseñados para esta función, seleccionar los máximos de absorción de los productos esperados, así como la cuantificación y la visualización de los compuestos. En particular, el detector de arreglo de diodos ofrece como ventajas el registro simultáneo de la absorbancia a todas las longitudes de onda del rango UV y visible, es decir, permite una detección entre 190 y 900 nm, posibilitando así el control de la pureza del pico cromatográfico y la identificación del compuesto correspondiente. Finalmente, con los equipos de CLAP acoplados a detectores UV o de masas se cuenta con potentes técnicas de identificación de los componentes de una mezcla compleja.

Separaciones en cromatografía de líquidos. La forma más sencilla de llevar a cabo una separación en cromatografía de líquidos es mediante elución isocrática, que es la elución que se realiza manteniendo constante la composición de la fase móvil. Sin embargo, con el objetivo de mejorar la separación, en ocasiones se utiliza la elución en gradiente, denominada también elución con programa de disolventes, que consiste en utilizar mezclas variables de dos (y frecuentemente más) disolventes de distinta polaridad a diferentes tiempos durante el análisis.

Eficacia de la separación. Dos factores determinan el grado de separación de los compuestos en cromatografía; uno es la diferencia de tiempos de retención: cuánto más diferentes sean, mejor será la separación, y el otro factor es la anchura de los picos: cuánto más anchos sean, peor será la separación.

En CLAP, la cromatografía de reparto ha llegado a ser la más utilizada de todos los procedimientos de cromatografía de líquidos. En ésta se emplea una fase estacionaria líquida que forma una película fina sobre la superficie de un soporte sólido; el soluto se encuentra en equilibrio entre el líquido estacionario y la fase móvil.

Se pueden distinguir dos tipos de cromatografía de reparto en función de las polaridades relativas de las fases móviles y estacionarias utilizadas: 1) la cromatografía basada en el empleo de fases estacionarias muy polares, así como de disolventes relativamente no polares como fase móvil; denominada cromatografía en fase normal; y 2) la

cromatografía en la que la fase estacionaria es no polar (siendo frecuentemente hidrocarburos) y la fase móvil es relativamente polar; esta técnica se conoce como cromatografía de fase inversa o reversa. En ella, el componente más polar es el primero que eluye, y al aumentar la polaridad de la fase móvil, aumenta el tiempo de elución.

La fase estacionaria. El soporte más común en CLAP son partículas microporosas esféricas de sílice muy pura, que son permeables al disolvente, y que tienen un área superficial de varios cientos de m^2/g . La superficie de la sílice tiene hasta 8 μmoles de grupos silanol ($-\text{Si}-\text{O}-$) por m^2 , la mayoría de los cuales están protonados entre pH dos y tres, disociándose a $\text{pH} > 3$. Una desventaja de los soportes habituales de sílice es que originan picos distorsionados; lo que hace necesario modificar su composición química, y una manera de conseguirlo es recubriendo los grupos silanol (cargados negativamente), con grupos trimetilsililo ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), evitando así la fuerte retención de bases protonadas, que da lugar a la aparición de picos con colas. Asimismo, el empleo de sílice menos ácida (con menos grupos $-\text{Si}-\text{OH}$) permite obtener picos simétricos con menores tiempos de retención. En algunas ocasiones se adicionan trietilamina y ácido trifluoroacético a la fase móvil. La razón de ello es que permiten bloquear los puntos más adsorbentes de la columna, reduciendo la aparición de colas.

Ahora bien, el enlace siloxano ($\text{Si}-\text{O}-\text{SiR}$) se hidroliza por debajo de $\text{pH} = 2$, de modo que la CLAP con una fase enlazada en soporte de sílice está limitada al intervalo de $\text{pH} = 2-8$; empero, si los átomos de silicio se unen con grupos voluminosos como el isobutilo, el enlace $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ estará menos expuesto al ataque del H_3O^+ , dando como resultado una fase estacionaria más estable a pH bajo durante largos periodos, incluso a temperaturas elevadas.

Finalmente se presentan dos pasos experimentales fundamentales en el análisis cromatográfico cualitativo y cuantitativo: i) el calibrado con soluciones patrón y ii) la optimización del funcionamiento de una columna:

i) Calibrado con soluciones patrón. El método más directo de análisis cromatográfico cuantitativo consiste en la preparación de una serie de soluciones estándar cuya concentración se aproxima a aquella de la muestra desconocida; posteriormente se obtienen los cromatogramas de los patrones y se representan las alturas o áreas de los picos en función de la concentración. La representación de los datos debe ser una recta que pasa por el origen, puesto que los análisis se basan en dicha recta. Para obtener mayor exactitud es necesario hacer la estandarización con frecuencia.

ii) **Optimización del funcionamiento de una columna.** Una separación cromatográfica se optimiza variando las condiciones experimentales hasta que los componentes de una mezcla se separen completamente en un tiempo mínimo. Los experimentos de optimización intentan, por un lado, a) reducir el ensanchamiento de las áreas de los picos y, por el otro, b) modificar las velocidades de migración relativas de los componentes.

6.2. Separación de las vitaminas por CLAP

En los últimos años, la CLAP ha llegado a ser un método estándar en el análisis de vitaminas, especialmente en el trabajo de rutina.⁷³ Las vitaminas hidrosolubles, ya sea como componentes individuales o formando parte de ciertas mezclas (dos o tres de éstas), pueden ser analizadas isocráticamente por esta técnica; empero, cuando se realiza la determinación cromatográfica de mezclas más complejas de vitaminas, la elución con programa de disolventes puede ser la opción requerida. En cuanto a la determinación por CLAP de piridoxina y nicotinamida, así como de otras vitaminas hidrosolubles, y liposolubles, a partir de componentes "multivitamínicos", ésta puede llevarse a cabo por intercambio iónico, fase normal o mediante fase reversa, siendo esta última el método más común. De manera específica, la separación de tiamina, cianocobalamina, nicotinamida, piridoxina y del éster fosfórico de la riboflavina a partir de "una formulación multivitamínica" se ha realizado utilizando fase reversa, detección de luz UV y, como fase móvil, CH₃OH (0.05 M) y CH₃COONH₄.⁷⁴

A continuación se describen algunas condiciones cromatográficas con las que la vitamina B₆ y la niacina han sido separadas a partir de alimentos. A menos que se realice alguna precisión, en todos los casos se empleó fase reversa, elución isocrática y detección de luz UV: 1) en el análisis de cianocobalamina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, nicotinamida, piridoxal, piridoxina y piridoxamina a partir de leche infantil líquida y en polvo, se utilizó cromatografía de fase reversa e intercambio iónico y, como fase móvil, una mezcla de CH₃OH-agua (proporción 15:85) con 5 mM de ácido octanosulfónico y trietilamina al 0.5 %, a un flujo de 1.0 mL/ min;⁷⁵ 2) en la determinación de ácido nicotínico a partir de carne de res, fases móviles compuestas por CH₃OH y agua (1:9, v/v), así como por 23 % de CH₃CN, 0.1 % de H₃PO₄ y 0.1 % de dodecilsulfato de sodio en agua, han sido notificadas;⁷⁶ mientras que en otros análisis de éste, a partir de a) café instantáneo y de b) carnes y legumbres, se ha informado el uso, de manera respectiva, de 5 mM de hidróxido de tetrabutilamonio en CH₃OH-agua (8:92, v/v),⁷⁶ y de CH₃OH + CH₃COONa 0.01 M (1:9) a pH = 4.66, con 5 mM de bromuro de tetrametilamonio;⁷³ por último, en el análisis de nicotínico por medio de columnas de intercambio iónico se han empleado ácido acético diluido,¹² y solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH = 3).^{73, 76}

Empleando detección de fluorescencia en la determinación simultánea de piridoxina, riboflavina y tiamina en productos de cereales fortificados se ha utilizado H_2SO_4 0.08 N en una mezcla de CH_3OH - agua (95:5, v/v) con un flujo de 2.0 mL/ min;⁷⁷ mientras que en la separación de piridoxamina, piridoxal y piridoxina a partir de carne de cerdo y de productos cárnicos se ha informado el uso de H_2SO_4 0.01 M con un flujo de 1.0 mL/ min, a una temperatura de 30 °C.⁷⁸

Así, tanto las moléculas de la vitamina B₆ como las de niacina pueden ser monitoreadas por CLAP mediante detección de luz UV (y en lo que se refiere a la vitamina B₆, por detección de fluorescencia), encontrándose para el ácido nicotínico un intervalo de longitud de onda máxima de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) de 254-263 nm,⁷⁶ en tanto que la piridoxina presenta un valor de $\lambda_{\text{máx}} = 292$ nm.⁴⁴ Con respecto al análisis por cromatografía de líquidos de la piridina, que no es una vitamina, se encontró el uso de una solución amortiguadora de fosfatos de pH = 7. ⁷⁹

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Identificar algunos de los productos radiolíticos primarios de la vitamina B₆ y de la niacina oxidados por el radical $\cdot\text{OH}$ en soluciones acuosas diluidas.

2. Objetivos particulares

- Obtener una buena separación, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, de los productos radiolíticos de las vitaminas, y de la piridina, utilizando esta última para observar las posibilidades de reacción de la niacina, a fin de predecir los productos de dicho nutrimento.
- Cuantificar los productos identificados, expresando su rendimiento como valor G, tanto en el caso de las vitaminas como en el de la piridina.
- Cuantificar la descomposición radiolítica de las vitaminas, expresando ésta como valores G°, en condiciones de saturación de sus soluciones acuosas con N₂O (G_{OH} = 5.5).
- Determinar si el piridoxal, producto radiolítico previamente identificado de la vitamina B₆,⁴⁴ se forma en soluciones acuosas de piridoxina (otra de las formas químicas de la vitamina) que han sido saturadas con N₂O y posteriormente irradiadas; así como en ausencia de O₂ y, por último, si en su formación intervienen los radicales $\cdot\text{OH}$.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. Material y reactivos

Los reactivos empleados fueron grado analítico (la mayoría de marca Aldrich), y no se sometieron a ninguna purificación adicional. A continuación son enlistados, indicándose entre paréntesis las otras marcas utilizadas:

- Piridoxina
- Ácido nicotínico
- Piridina
- Sulfato de hierro amoniacal (II) hexahidratado: $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- Ferricianuro de potasio: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
- Óxido nitroso: N_2O (*Praixar*)
- Helio (*Praixar*)
- 2-hidroxipiridina
- 3-hidroxipiridina
- 4-hidroxipiridina
- Ácido ascórbico
- Acetato de sodio
- Clorhidrato de piridoxal
- Ácido 2-hidroxinicotínico
- Ácido 6-hidroxinicotínico
- Metanol grado CLAP
- Fosfato de sodio monobásico: NaH_2PO_4
- Ácido sulfúrico (*Sigma*)
- Ácido acético (*Merck*)
- 1-hexanosulfonato de sodio
- Agua desionizada
- Purificador de agua compacto Milli-Q Plus Water System (SimPak 01)

En la preparación de las soluciones se utilizó agua desionizada obtenida mediante este purificador, en el que el agua pasa por un proceso de desmineralización y desionización en cartuchos que contienen resinas de intercambio iónico grado nuclear para eliminar los iones inorgánicos, un filtro de carbón activado para eliminar disolventes orgánicos y un cartucho que sirve para eliminar trazas orgánicas, que fue empleado en todos los procedimientos.

- Viales usados para la irradiación

Los viales usados para la irradiación de las muestras deben estar libres de contaminantes; por esa razón no sólo fueron lavados con agua bidestilada para la realización de cada experimento, sino que cada determinado tiempo (por ejemplo, cada tres semanas) se les daba un tratamiento consistente en su sumergimiento en una mezcla sulfonítrica concentrada (1:3) durante una hora, enjuagándose posteriormente con agua desionizada y secándose a 250 °C durante 2 horas.

- Viales para cromatografía de líquidos de alta presión (marca Hewlett Packard).

2. Equipos

a) Irradiador Gamma Beam-651 PT ⁸⁰

El Irradiador Gamma Beam-651 PT (figura 20) se encuentra en la Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Sus principales componentes son:

- 1) Blindaje de bloque de concreto de 1.5 metros de espesor.
- 2) Fuentes radiactivas (nueve en total) de cobalto-60 (Co-60), el cual se encuentra encapsulado en barras de acero inoxidable sin poder contaminar ningún material. La actividad de las fuentes es de 2.3×10^{15} Bq al 1 de agosto de 1998.
- 3) Dispositivos (y sensores) de subida de las fuentes.
- 4) Piscina de almacenamiento de las fuentes (de 5m por debajo del nivel del piso), que contiene agua desionizada, la cual se utiliza como blindaje biológico cuando las fuentes se encuentran en el fondo de la misma.
- 5) Cuarto de irradiación, que es el lugar donde se colocan las muestras u objetos que se van a irradiar y donde suben las fuentes de Co-60.
- 6) Sistema de control por medio de una computadora.

Para obtener la dosis deseada, las muestras de laboratorio o productos son expuestos a las fuentes por un tiempo predeterminado. Las diferentes dosis se consiguen al variar la posición y la cantidad de fuentes radiactivas, así como la ubicación de la muestra con respecto a éstas. Las fuentes se colocan en posición de irradiación o de blindaje biológico por medio de un sistema neumático.

El irradiador cuenta, a su vez, con cinco sistemas de alarma que monitorean el nivel de radiación, así como con un detector de sismos.⁸¹

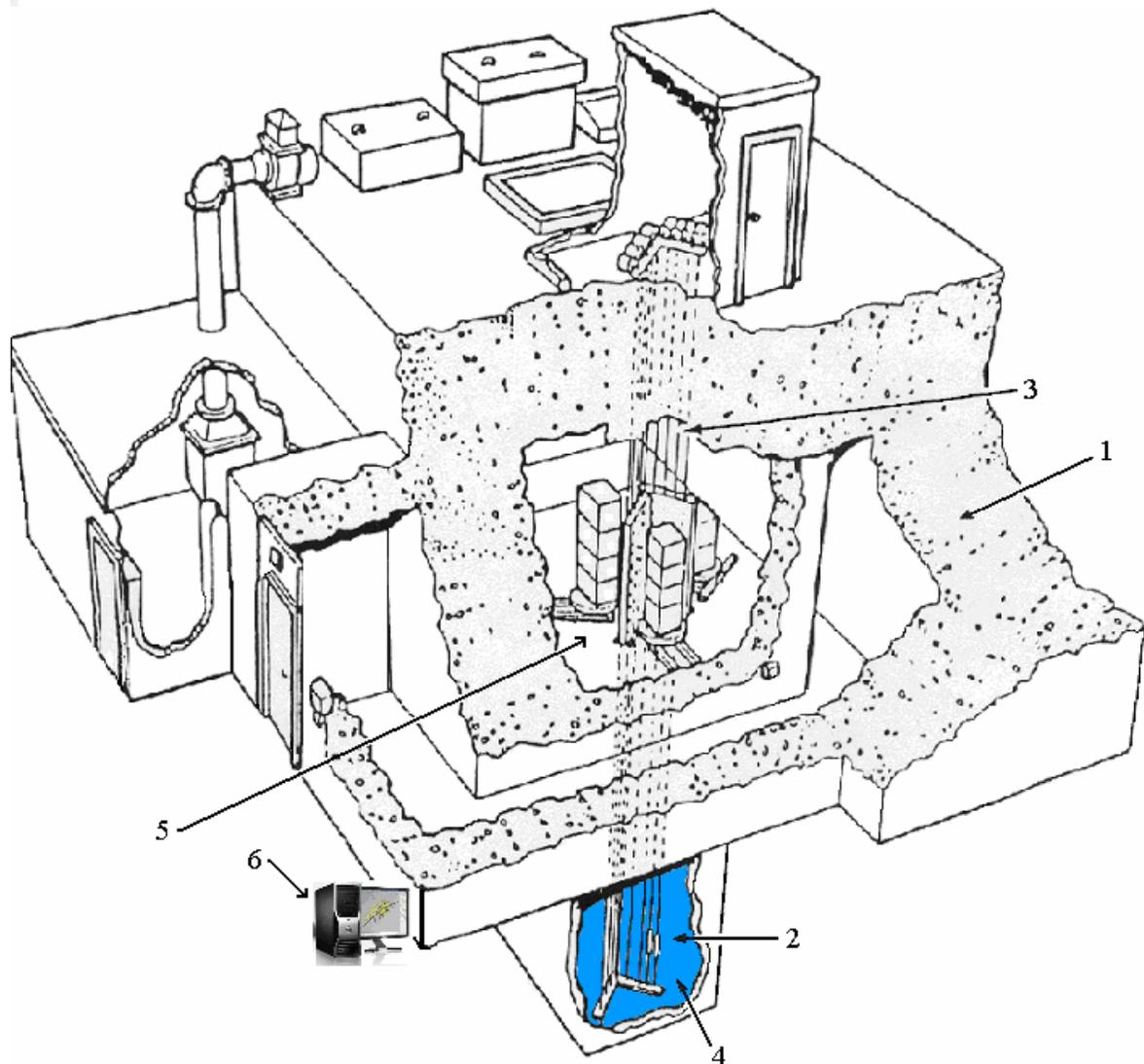


Figura 20. Irradiador Gamma Beam-651 PT.

b) Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución ⁸²

Considerando que el equipo de análisis es un cromatógrafo moderno y que el tipo de columnas es de alta resolución, de aquí en adelante será denominado cromatógrafo de líquidos de alta resolución. De manera específica, se trata de un cromatógrafo de la marca *Agilent Technologies* series 1100 acoplado a un detector de luz UV de arreglo de diodos, cuyo intervalo de longitud de onda es de 190 a 950 nm. A su vez, el equipo está acoplado a una computadora que contiene el software Chemstation para cromatografía de líquidos de alta resolución, lo que permitió visualizar los resultados y procesar los datos obtenidos. Consta, además, de una bomba cuaternaria, un microdesgasificador, un automuestreador, un registrador y, por supuesto, de una columna de alta resolución. Las condiciones cromatográficas empleadas se especifican en la parte de Resultados y Discusión (IV).

3. Metodología

El análisis de todas las muestras se realizó a temperatura ambiente mediante el cromatógrafo descrito. Antes de la irradiación, se analizaron soluciones de las vitaminas, y de la piridina, con muestras auténticas de sus productos esperados, utilizando para ello diferentes fases móviles y estacionarias, hasta conseguir una buena separación.

a) Preparación de curvas patrón

Para la cuantificación de las vitaminas y de sus productos radiolíticos, fueron elaboradas curvas patrón. En particular, se prepararon soluciones acuosas de cada vitamina a una concentración máxima de 1 mM, en sus formas químicas de piridoxina y ácido nicotínico, así como de muestras auténticas de concentraciones máximas de 0.25-0.5 mM de los productos esperados, llevando a cabo diluciones para obtener todos los puntos de las curvas. Cabe señalar que lo mismo se realizó para los productos radiolíticos esperados en el estudio de la piridina. Las áreas, en miliunidades de absorbancia (mUA), fueron determinadas por integración del pico cromatográfico de cada compuesto en su valor $\lambda_{\text{máx}}$. En todos los casos, tanto las soluciones patrón como aquellas que se irradiaron fueron preparadas el mismo día de su análisis, protegiéndose de la luz.

b) Dosimetría

Cuando un sistema es expuesto a la radiación ionizante, es necesario conocer la cantidad de dosis absorbida por éste. Básicamente, la cantidad de dosis absorbida por la materia, para una fuente radiactiva con una actividad dada, depende de dos parámetros: a) del tiempo de irradiación y b) de la distancia del material radiactivo con respecto a la muestra; por lo tanto, al variar cualquiera de éstos, lo hará también la dosis absorbida por el sistema por unidad de tiempo (razón de dosis). En la presente investigación, como se contó con una fuente radiactiva de tipo semi-industrial en forma de triángulo (figura 21), para conocer la razón de dosis absorbida por el sistema en estudio, se requirió considerar tanto la altura como la distancia a la que se ubicó dicho sistema con respecto al vértice del triángulo.

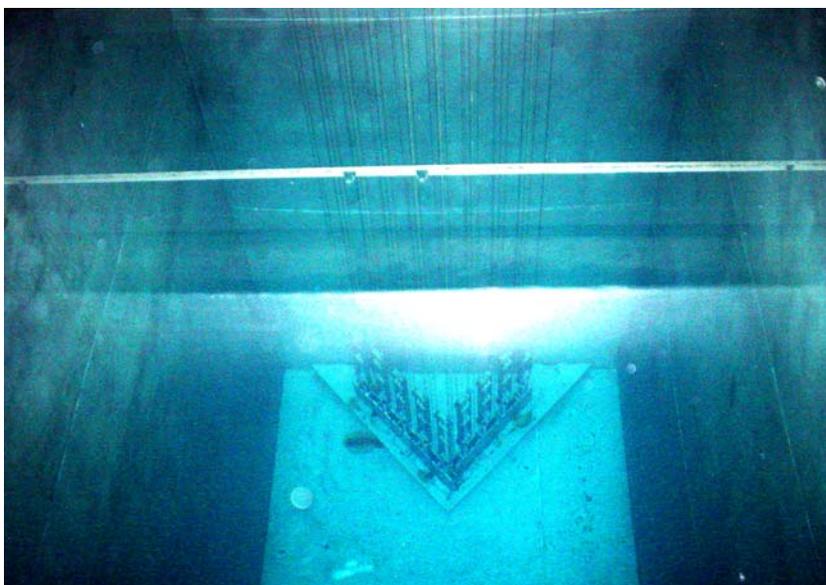


Figura 21. Fuente radiactiva de tipo semi-industrial en forma de triángulo en su posición de blindaje biológico (en el fondo de la piscina de almacenamiento). El Co-60 está contenido en una serie de nueve barras metálicas dispuestas a lo largo de dos lados del triángulo.

La razón de dosis absorbida por las soluciones de las vitaminas, y de la piridina, fue determinada a una altura de 45 cm y a una distancia de 35 cm del vértice del triángulo donde se encuentran las fuentes radiactivas, mediante el dosímetro de Fricke modificado, que consiste en una solución acuosa que contiene $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$) y H_2SO_4 ($5 \times 10^{-3} \text{ M}$), cuyo fundamento es la cuantificación de la oxidación del ion Fe^{2+} a Fe^{3+} inducida por la radiación ionizante a pH ácido.^{28, 83} Dicha solución se irradió a diferentes tiempos (15, 25, 35 y 45 minutos), midiendo posteriormente su

absorbancia en la región UV a 304 nm para determinar la cantidad de Fe³⁺ formado en cada caso. El cálculo de la dosis absorbida (en Gy) se desarrolló mediante la siguiente fórmula:⁸³

$$D = \frac{N \Delta(DO) 100}{\varepsilon (10^3) \rho G f l}$$

donde

N = número de Avogadro = 6.023 x 10²³ moléculas/ mol

Δ(DO) = cambio en la densidad óptica

ε = coeficiente de extinción molar = 2167 L/ mol cm

ρ = densidad de la solución 1x10⁻³ M de Fe³⁺ = 1.001 g/ cm³

G = rendimiento radiolítico del Fe³⁺ = 0.66 moléculas formadas/ 100 eV de energía absorbida

f = factor de conversión = 6.241 x 10¹⁵ eV/ g

l = longitud = 1 cm

y el cálculo correspondiente es:

$$D = \frac{N \Delta(DO) 100}{\varepsilon (10^3) \rho G f l} = \frac{(6.023 \times 10^{23}) \Delta(DO) 100}{2167 (10^3) (1.001) (0.66) (6.24 \times 10^{15})} = 6.74 \times 10^3 DO$$

Una vez calculada la dosis para cada tiempo de irradiación, se realizó una gráfica de dosis absorbida en función de éste. A partir de dicha gráfica se calculó el valor de la pendiente, el cual representa, precisamente, la dosis que van a absorber por minuto (razón de dosis) las soluciones de las vitaminas y la piridina.

c) Preparación e irradiación de las muestras

Se prepararon soluciones acuosas 1 mM de cada vitamina y ≈ 41 mM de piridina que contuvieron 2.5 mM del agente oxidante K₃Fe(CN)₆, las cuales fueron posteriormente saturadas con N₂O durante 10 minutos para eliminar el aire presente —y por consiguiente el oxígeno disuelto en las mismas— y finalmente irradiadas.

La irradiación se llevó a cabo en el Gamma-beam 651 PT descrito (figura 20) a tiempos de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos a una razón de dosis de 42.4 Gy/ min para la piridina y el ácido nicotínico, y de 35.8 Gy/ min para la piridoxina.

Para determinar si el piridoxal se formaba en ausencia de oxígeno molecular, y si la presencia de este último tenía alguna influencia en la generación de dicho producto radiolítico, también se irradiaron, a una dosis de 1.7 kGy y en presencia de K₃Fe(CN)₆ 2.5

mM, soluciones 1 mM de piridoxina previamente burbujeadas con He durante 10 min —con el propósito de eliminar el aire, y por consiguiente el oxígeno—, así como soluciones 1 mM expuestas al aire; finalmente, para saber si los radicales $\cdot\text{OH}$ intervenían en la formación de piridoxal al reaccionar con la piridoxina, se irradiaron, a la misma dosis, soluciones de ésta saturadas con N_2O .

d) Análisis cromatográfico y cálculos

Inmediatamente después de cada irradiación, las muestras fueron analizadas por CLAR.

La identificación de los productos radiolíticos se llevó a cabo comparando —*bajo* las mismas condiciones de elución— los diferentes espectros UV detectados en las soluciones irradiadas, con aquellos espectros correspondientes a muestras auténticas de los productos esperados. Cuando se trató de las mismas sustancias, los espectros UV y los tiempos de retención resultaron ser idénticos.

Además de la cuantificación de los productos radiolíticos, que se expresó en términos de valor G, también se calculó el porcentaje de pérdida de las vitaminas, y su descomposición radiolítica en términos de valor G° . En lo que se refiere a los productos radiolíticos identificados, siempre que se contó con muestras auténticas de los mismos, se determinaron, a las diferentes dosis de irradiación, sus correspondientes áreas bajo la curva, a fin de calcular, mediante la ecuación de la recta de sus respectivas curvas patrón, su concentración. Con el propósito de conocer la concentración residual, y así el porcentaje de pérdida, lo mismo se realizó en el caso de las vitaminas. Todas las gráficas fueron elaboradas con ayuda del programa de cómputo OriginPro 7.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Radiólisis de las vitaminas en solución acuosa

Inicialmente se presentan las curvas patrón empleadas para cuantificar la descomposición de las vitaminas y, posteriormente, las curvas de formación de los productos radiolíticos. En los estudios de las dos vitaminas, así como en el de la piridina, se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) > 0.999, mientras que la desviación estándar de las repeticiones fue < 1.5 %.

1. Radiólisis de la vitamina B₆ (piridoxina)

a) **Curva patrón.** La siguiente curva patrón (figura 22) es un ejemplo de las curvas elaboradas cada día que se realizó un experimento de irradiación, y fue determinada como el área bajo la curva del pico cromatográfico de la piridoxina en su valor máximo de longitud de onda de absorción UV ($\lambda_{\text{máx}}$), siendo éste 292 nm.

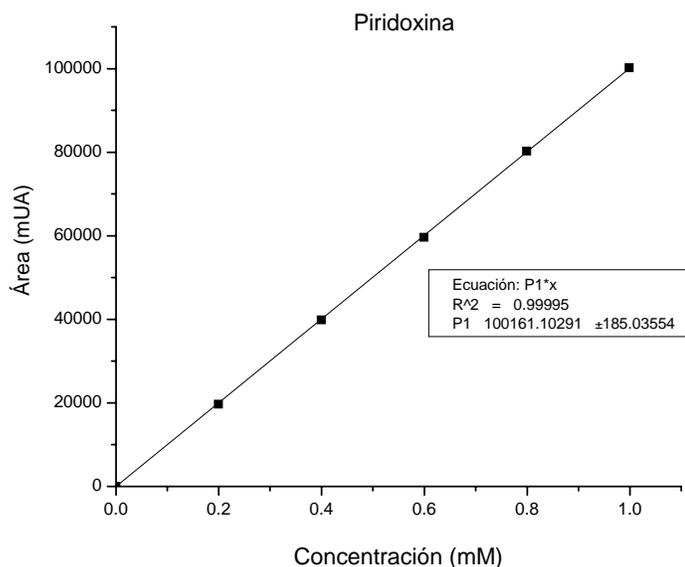


Figura 22. Curva patrón de la piridoxina.

b) **Espectro UV.** Las condiciones cromatográficas para la piridoxina y sus productos radiolíticos fueron, como fase estacionaria: columna Alltima C₁₈ de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno; tamaño de partícula: 3 μm ; y como fase móvil: 75 % de H₂SO₄ 0.08 N + 25 % de 1-hexanosulfonato de sodio; volumen de inyección: 100 μL ; flujo de elución: 0.5 mL/ min.

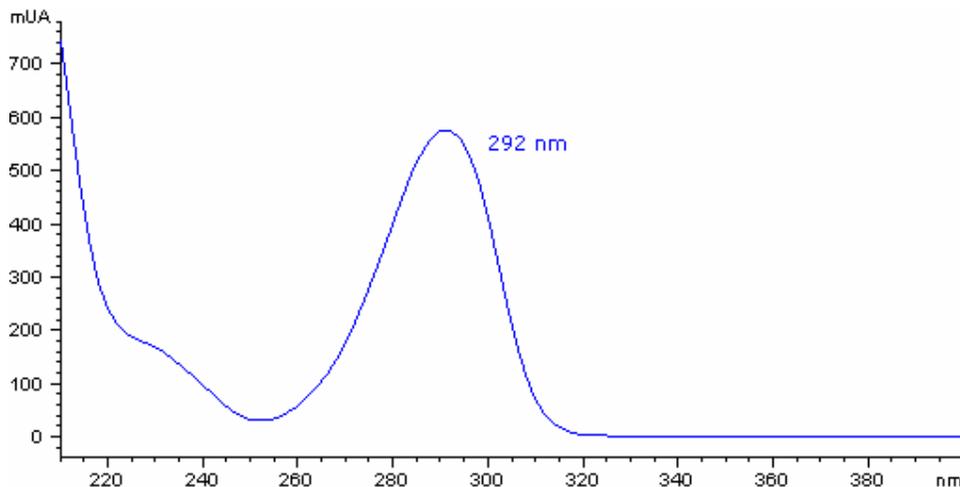
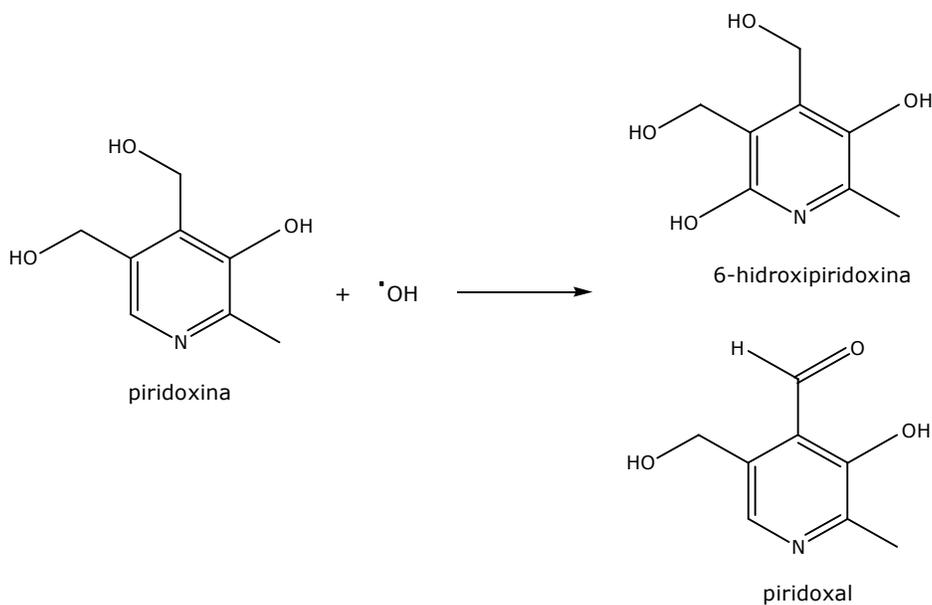


Figura 23. Espectro UV de la piridoxina 1 mM en solución acuosa; $\lambda_{\text{máx}} = 292 \text{ nm}$; $t_{\text{r}} = 17.12 \text{ min.}$

1.1. Efecto de las dosis de irradiación en la piridoxina. Las condiciones generales de reacción fueron: soluciones acuosas de piridoxina de concentración 1 mM que contenían 2.5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y que fueron saturadas con N_2O e irradiadas a una razón de dosis de 35.8 Gy/ min. Asimismo, en presencia de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2.5 mM y a una dosis de 1.7 kGy, se irradiaron soluciones 1 mM de vitamina burbujeadas con He; expuestas al aire, y saturadas con N_2O .

1.1.1. Productos radiolíticos esperados. En el siguiente esquema se muestran los productos radiolíticos que se esperó obtener por el ataque del radical $\cdot\text{OH}$ a la piridoxina en solución acuosa:



a) 6-hidroxipiridoxina. Se cuenta con información referente a la adición del radical $\cdot\text{OH}$ tanto a anillos aromáticos homocíclicos^{30, 31, 63-69, 84} como a anillos aromáticos heterocíclicos^{48, 54-58, 84-86} y, de manera particular, al anillo de la vitamina B₆ en sus formas químicas de piridoxina,⁵ piridoxal⁶² y piridoxalfosfato.¹⁰ Así, la adición del $\cdot\text{OH}$ al anillo de la vitamina B₆ y, concretamente, al de la piridoxina, puede ocurrir en la posición 6 de la molécula.⁵ Dicho ataque se ve favorecido por dos factores: la ausencia de sustituyentes y, sobre todo, por la presencia del grupo 3-hidroxilo, que es un fuerte orientador *orto-para*, cuyo efecto director *para* promovería la adición del electrófilo $\cdot\text{OH}$ a la posición del mismo nombre (figura 24).

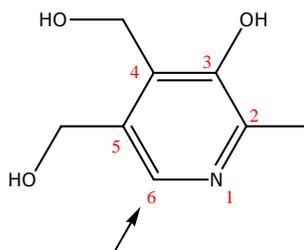


Figura 24. Posición de la piridoxina donde puede ocurrir la adición del $\cdot\text{OH}$ debido a la orientación *para* ejercida por el grupo 3-hidroxilo.

b) Piridoxal. El piridoxal, que es uno de los compuestos que poseen actividad de la vitamina B₆, había sido anteriormente identificado en soluciones acuosas de piridoxina irradiadas en presencia de oxígeno molecular;⁴⁴ sin embargo, en ese entonces no se calculó su rendimiento radioquímico de formación, y tampoco se confirmó si la especie que intervenía en la radiólisis era el $\cdot\text{OH}$, o bien el O_2 .

En lo que corresponde a la presente investigación, tomando como base un mecanismo radiolítico de formación de piridoxal a partir de piridoxina por ataque del $\cdot\text{OH}$ en soluciones acuosas de la misma en presencia de aire (Kishore, Moorthy y Rao, 1982),⁵² se propuso examinar si el piridoxal provenía efectivamente de la oxidación de la piridoxina por parte de este radical, y si la participación del oxígeno molecular era necesaria en la reacción, propósito para el cual fueron irradiadas soluciones de piridoxina que no contenían aire.

1.1.2. Productos radiolíticos identificados. Como se esperaba, dos de los productos obtenidos en la radiólisis de piridoxina fueron la 6-hidroxipiridoxina y el piridoxal. No obstante, la 6-hidroxipiridoxina sólo se detectó cuando las soluciones de vitamina no contuvieron $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Por ello, a fin de detectar dicho producto, la irradiación de piridoxina

también se realizó *bajo* las condiciones de reacción antes descritas (soluciones 1 mM de vitamina burbujeadas con He; expuestas al aire, y saturadas con N₂O) pero en ausencia de K₃Fe(CN)₆. En la figura 25 se muestran los espectros UV correspondientes a la piridoxina y a sus productos radiolíticos:

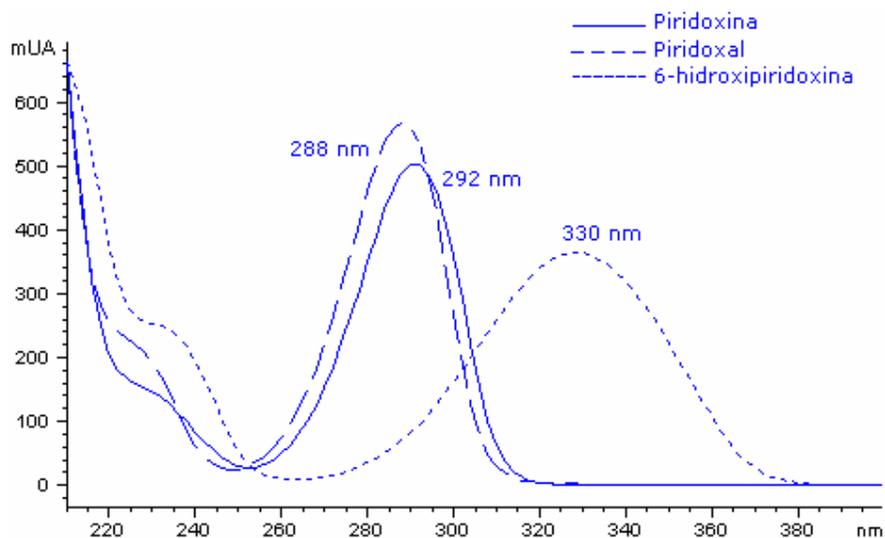


Figura 25. Espectros UV de la piridoxina, piridoxal y 6-hidroxi piridoxina.

A continuación se muestra el cromatograma correspondiente a los productos radiolíticos:

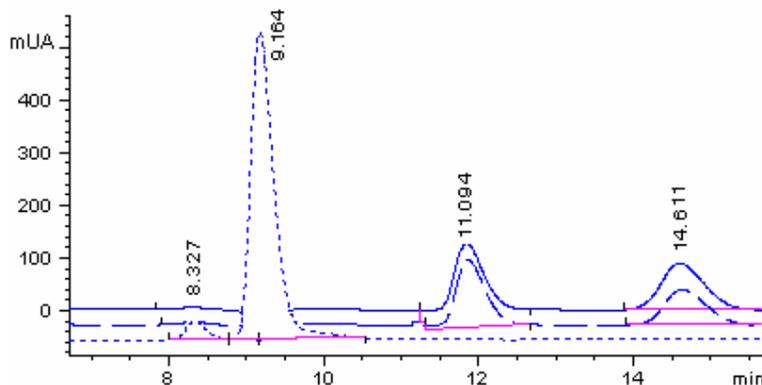
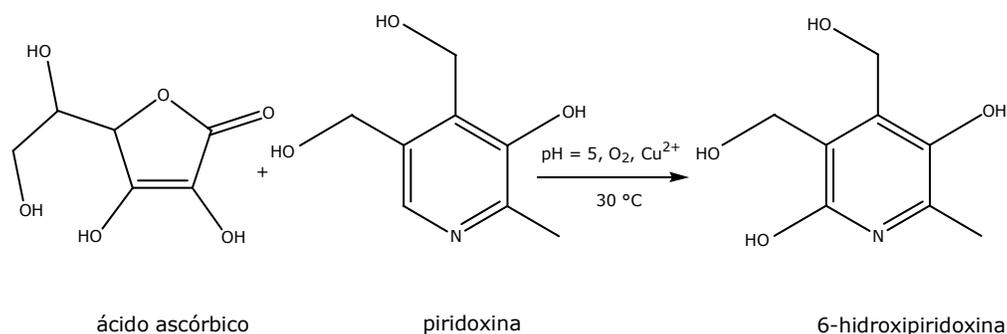


Figura 26. Cromatograma de una solución de piridoxina 1 mM que no contenía K₃Fe(CN)₆ y que fue saturada con N₂O e irradiada a una dosis de 1.7 kGy; en él se encuentran los productos 6-hidroxi piridoxina ($t_R = 9.16$ min) y piridoxal ($t_R = 11.09$ min); a ≈ 8.33 y a 14.61 min eluyen dos compuestos no identificados. Por su parte, la piridoxina eluye a ≈ 17 min, no interfiriendo en el análisis.

a) 6-hidroxipiridoxina. Debido a que el producto esperado 6-hidroxipiridoxina, previamente identificado y caracterizado mediante espectrometría UV, RMP, IR y de masas por Tadera, Arima, Yoshino, Yagi y Kobayashi (1986),⁸⁷ no estaba disponible comercialmente, su obtención se logró a través de una síntesis química descrita por Tadera, Arima y Yagi (1988),⁶² cuyo fundamento es, en principio, el mismo que el de la presente investigación: la producción de radicales $\cdot\text{OH}$ en solución acuosa para reaccionar con la piridoxina; no obstante, a diferencia de dicha síntesis, en el presente estudio no se requirió (mas que para efectos comparativos) la presencia de O_2 . La reacción que permitió obtener el estándar de 6-hidroxipiridoxina fue la siguiente:



Esta reacción se lleva a cabo por ataque (adición) de los radicales $\cdot\text{OH}$ al carbono 6 de la piridoxina,⁵ mismos que se generan en la autoxidación del ácido ascórbico.^{62, 87}

Con respecto al producto sintetizado, aun cuando no se obtuvo como sólido puro y no pudo ser cuantificado, fue separado por CLAR e identificado en la mezcla de reacción debido a su espectro de absorción UV ($\lambda_{\text{máx}} = 330 \text{ nm}$) y a su peso molecular (185.2 g/mol), que fue determinado por medio de un detector de masas acoplado al equipo utilizado. De acuerdo con Tadera *et al.* (1986),⁸⁷ la 6-hidroxipiridoxina es el principal producto de la síntesis química y también el que presenta mayor absorción de luz UV a 330 nm, siendo esto último, en particular, lo que condujo a su identificación en dicha síntesis. Posteriormente, su identificación en las soluciones de piridoxina irradiadas se realizó comparando los espectros UV de los productos formados en éstas con el espectro UV del producto obtenido por vía sintética. A continuación se muestran los espectros cuya comparación llevó a la identificación de este producto, el tiempo de retención fue de 9.1 min:

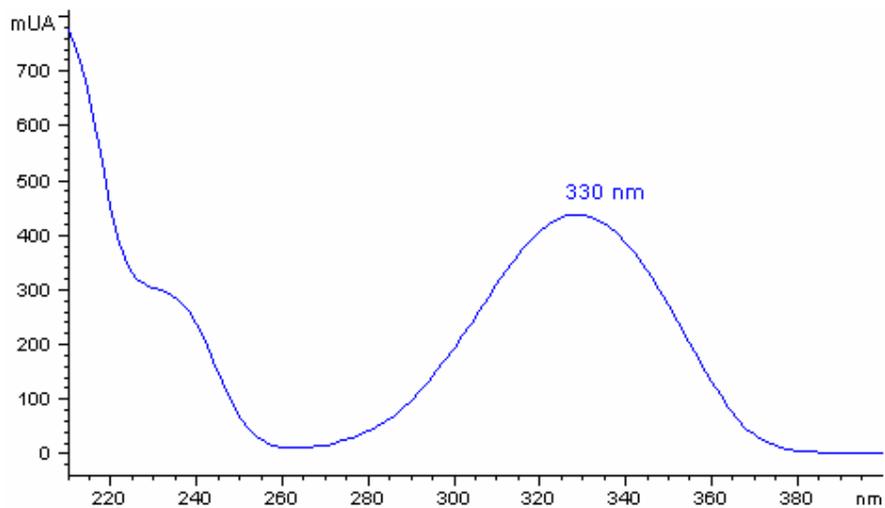


Figura 27. Espectro UV del producto 6-hidroxipiridoxina utilizado como estándar. El espectro fue obtenido de la mezcla de reacción entre el ácido ascórbico y la piridoxina en solución amortiguadora de acetatos (pH= 5) en presencia de O_2 y $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$; $\lambda_{m\acute{a}x} = 330$ nm.

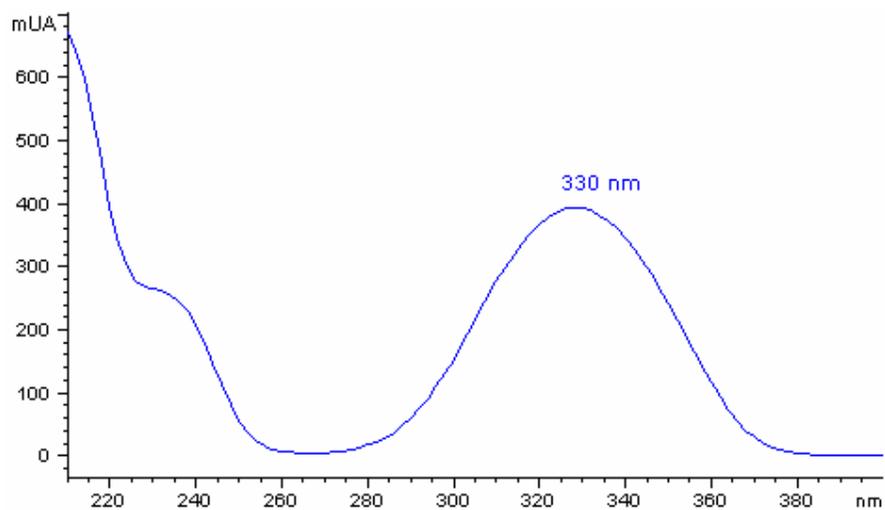


Figura 28. Espectro UV de la 6-hidroxipiridoxina obtenida por radiólisis de piridoxina 1mM en solución acuosa saturada con N_2O y en ausencia de $K_3Fe(CN)_6$; $\lambda_{m\acute{a}x} = 330$ nm.

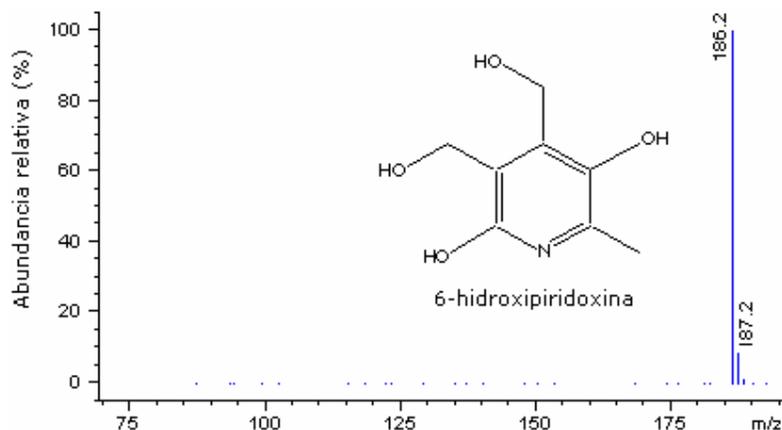


Figura 29. Espectro de masas de la 6-hidroxipiridoxina (peso molecular 186.2 g/ mol). El presente espectro fue obtenido por el método de ionización por electronebulización (electrospray positivo).

Considerando los resultados anteriores, se pudo confirmar que el producto 6-hidroxipiridoxina se forma, en efecto, por radiólisis de piridoxina en solución acuosa, aunque sólo en ausencia de $K_3Fe(CN)_6$. Una explicación de esto último es su posible oxidación por parte de los iones Fe^{3+} para formar una quinona, que no sería, sin embargo, un producto radiolítico.

En particular, la obtención de 6-hidroxipiridoxina demuestra que la adición del radical $\cdot OH$ ocurre en la posición 6 de la piridoxina, y lo mismo puede ocurrir con las demás moléculas de la vitamina B₆. Además, si se toma en cuenta que el producto principal de la síntesis descrita por Tadera *et al.* (1986) y Tadera *et al.* (1988) es, precisamente, la 6-hidroxipiridoxina,⁸⁷ y que ésta se genera por reacción de la piridoxina con los radicales $\cdot OH$ ⁶² y, concretamente, por la adición de éstos al carbono 6 de su molécula, el producto radiolítico mayoritario en la presente investigación (en la que el principal radical libre es el $\cdot OH$ [$G_{OH} = 5.5$]), podría ser, igualmente, dicha sustancia. De manera análoga, la reacción preferente en la radiólisis de piridoxina en solución acuosa, y de la vitamina B₆, podría ser la de adición del $\cdot OH$ a su anillo aromático, puesto que es a través de ésta como se forma el producto en la referida síntesis. Un elemento que puede sustentar lo anterior es el hecho de que la reacción de adición del $\cdot OH$ a anillos aromáticos tiene preferencia sobre la abstracción de un átomo de hidrógeno.³¹

Con relación a la figura 26, al irradiar soluciones de piridoxina saturadas con N_2O ($G_{OH} = 5.5$) en ausencia de $K_3Fe(CN)_6$, se formaron dos productos radiolíticos que absorben luz UV a 330 nm, uno de ellos es la 6-hidroxipiridoxina ($t_R = 9.16$ min), que presenta la mayor absorción a esa longitud de onda; el otro, un producto minoritario no identificado ($t_R \approx 8.33$ min). De igual manera, *bajo* las otras condiciones de irradiación en ausencia de $K_3Fe(CN)_6$ (soluciones de piridoxina 1 mM libres de oxígeno [burbujeadas con He], y

expuestas al aire), se formaron sendos productos minoritarios que absorben a 330 nm; no obstante, según sus correspondientes espectros UV, se trató de productos diferentes. Estos resultados permiten inferir la participación de distintas especies radiolíticas en los tres casos.

A pesar de que la 6-hidroxi piridoxina no se cuantificó, para tener una idea de la proporción en que dicha sustancia se formó *bajo* las tres diferentes condiciones de reacción, sus correspondientes áreas bajo la curva —obtenidas a 330 nm— fueron comparadas entre sí a una misma dosis (1.7 kGy), encontrándose lo siguiente: la menor concentración de producto se registró en las soluciones libres de O₂; una concentración intermedia en las soluciones con aire; y la mayor de ellas en las soluciones que contuvieron N₂O. De acuerdo con tales resultados, se puede afirmar que 1) la formación de 6-hidroxi piridoxina por radiólisis de piridoxina no requiere la presencia de O₂, puesto que dicho producto se genera aun en su ausencia (un resultado que además sugiere la participación directa del [•]OH en la reacción [teniendo en cuenta que la principal especie reactiva de la radiólisis del agua que contiene oxígeno es el [•]OH]); y que, en efecto, 2) el [•]OH es la especie que reacciona con la piridoxina para formar 6-hidroxi piridoxina; siendo esto último confirmado en el estudio de las soluciones saturadas con N₂O (las cuales no contenían aire), en donde al generarse una mayor cantidad de radicales [•]OH con respecto a las otras condiciones, se formó una mayor cantidad de producto y, por otro lado, observando que en las soluciones con aire la concentración de producto aumenta (en contraste con aquellas burbujeadas con He), se pudo confirmar que 3) su producción sí se ve afectada por la presencia de O₂.

En lo que a información adicional sobre la 6-hidroxi piridoxina se refiere, aun cuando no había sido identificada (o informada) en estudios anteriores de radiólisis de la vitamina B₆ y/o de la piridoxina, sí lo había sido en estudios de alimentos de origen vegetal que experimentaron un descenso de la actividad de la vitamina B₆ al ser tratados térmicamente; en tales estudios se observó que a medida que aumentaba la concentración de ácido ascórbico, lo hacían también la descomposición de la vitamina (en su forma de piridoxina) y la producción del compuesto.⁸⁷ En la actualidad se sabe que en su formación, tanto en productos vegetales como en la síntesis aquí utilizada, participan los radicales [•]OH, mismos que se generan por autoxidación del ácido ascórbico.⁶² Por último, resulta interesante observar que en la formación de 6-hidroxi piridoxina a partir de piridoxina en productos vegetales y por radiólisis de esta última en solución acuosa, el mecanismo de reacción implica, en ambos casos, la participación de los [•]OH y, en específico, su adición a la vitamina.

b) Piridoxal. Enseguida se muestran los espectros UV del piridoxal utilizado como estándar (figura 30) y del obtenido por radiólisis de piridoxina (figura 31):

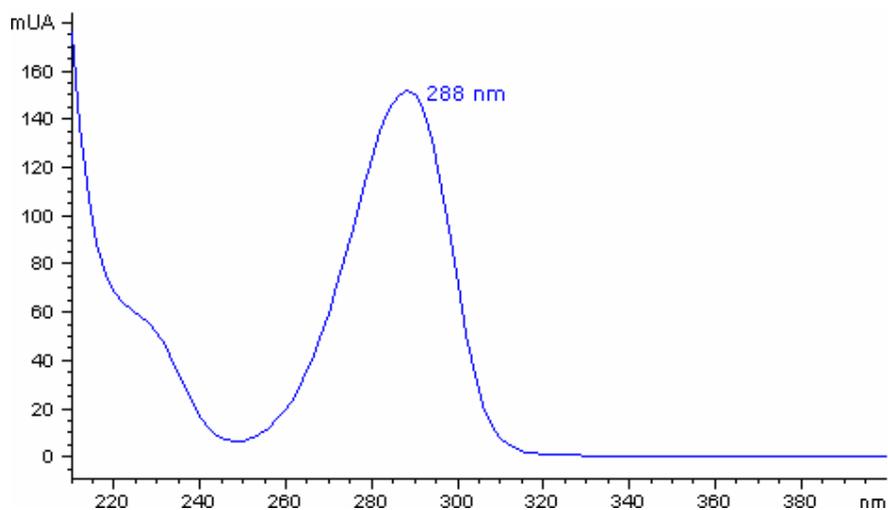


Figura 30. Espectro UV de piridoxal 0.1 mM en solución acuosa; $\lambda_{\text{máx}} = 288 \text{ nm}$; $t_{\text{R}} = 11.9 \text{ min}$.

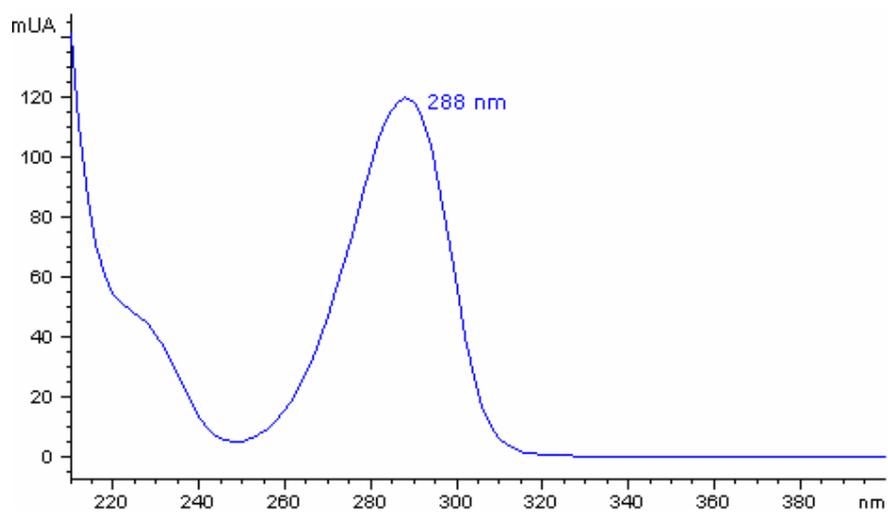


Figura 31. Espectro UV del piridoxal obtenido por radiólisis de piridoxina $\approx 1 \text{ mM}$ en soluciones saturadas con N_2O en ausencia de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; $\lambda_{\text{máx}} = 288 \text{ nm}$; $t_{\text{R}} = 11.9 \text{ min}$.

1.1.3. Cuantificación del piridoxal. Ahora se presenta un ejemplo de las curvas patrón utilizadas para la cuantificación de piridoxal:

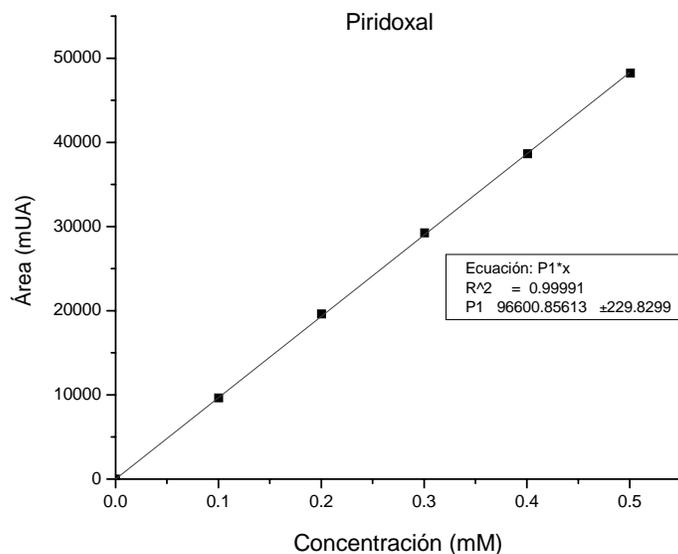


Figura 32. Curva patrón de piridoxal.

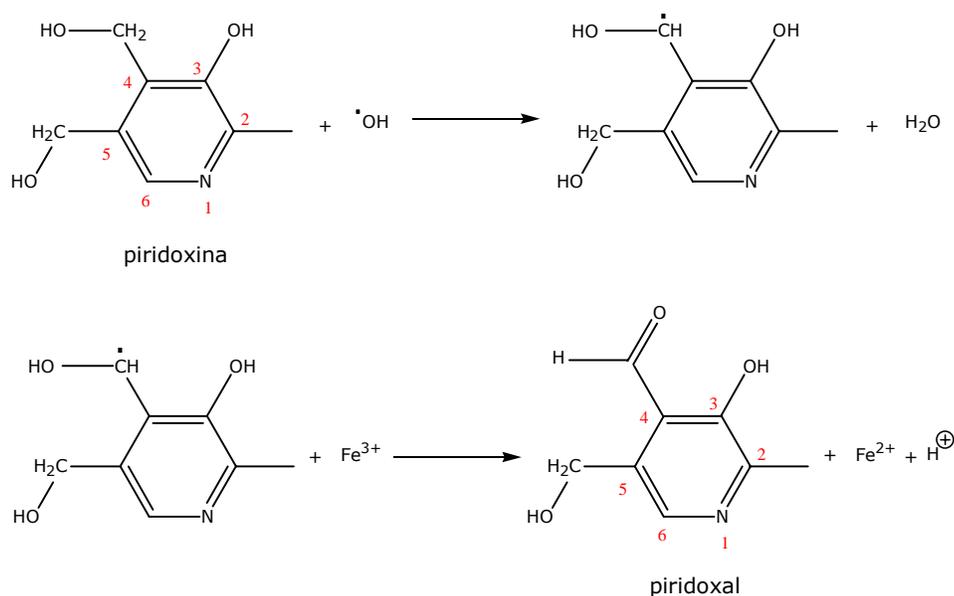
El piridoxal fue detectado en soluciones irradiadas de piridoxina 1 mM + 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ saturadas con N_2O , tanto en presencia como en ausencia de aire, pero, a diferencia del producto 6-hidroxipiridoxina (que no se detectó cuando las soluciones irradiadas de vitamina B₆ contenían $K_3Fe(CN)_6$), éste sí fue detectado en presencia de dicho oxidante *bajo* todas las condiciones de reacción empleadas (soluciones sin oxígeno; saturadas con N_2O ; y en presencia de aire).

Como se muestra en la tabla 3, la mayor concentración de piridoxal se obtuvo en las soluciones saturadas con N_2O ; en una concentración intermedia en presencia de aire; y a la más baja concentración en su ausencia.

Tabla 3. Concentración de piridoxal en soluciones de piridoxina irradiadas a 1.7 kGy *bajo* tres diferentes condiciones de reacción.

Piridoxina 1 mM + $K_3Fe(CN)_6$ 2.5 mM	Libres de O_2 (con He)	Expuestas al aire	Saturadas con N_2O
Concentración de piridoxal (μM)	22.4	27	34.25

De acuerdo con los resultados de la tabla 3, quedó comprobado que la presencia de oxígeno molecular en las soluciones irradiadas de piridoxina no es necesaria en la producción de piridoxal, siendo así las especies primarias radiolíticas del agua las responsables de su formación, y concretamente el radical $\cdot\text{OH}$, tal como se confirmó con las soluciones saturadas con N_2O : debido a que el piridoxal se obtiene en mayor concentración en presencia de N_2O ($G_{\text{OH}} = 5.5$), se verificó que el $\cdot\text{OH}$ interviene en su formación. No obstante, el mecanismo de reacción por el cual se genera este producto no corresponde al de adición del $\cdot\text{OH}$ a la molécula de piridoxina, como sucede en la generación de 6-hidroxipiridoxina, ya que la adición de esta especie a la piridoxina no permite explicar su formación, sino que se trata del mecanismo radiolítico de abstracción de un átomo de hidrógeno por parte del $\cdot\text{OH}$, que en este caso tiene lugar en el grupo 4-hidroximetilo de la piridoxina, probablemente como lo propusieron Galatzeanu y Antoni (1966),⁴⁴ y por otro lado, Kishore *et al.* (1982),⁵² en una reacción en dos etapas:



En cuanto a las soluciones irradiadas en presencia de aire, el resultado de una mayor concentración de piridoxal *bajo* esas condiciones puede indicar la participación de radicales libres diferentes al $\cdot\text{OH}$ en la generación del producto, los cuales podrían formarse a partir del oxígeno molecular.

Por último, es interesante hacer notar que en la síntesis química utilizada para obtener la muestra estándar de 6-hidroxipiridoxina en el presente trabajo, además de este producto, también se produce piridoxal; quizá de la misma manera que en este caso: con la intervención del $\cdot\text{OH}$ que se genera durante la reacción, así como a través del mecanismo de abstracción de un átomo de hidrógeno del grupo 4-hidroximetilo de la piridoxina.

A continuación se presenta la curva de formación radiolítica del piridoxal (figura 33):

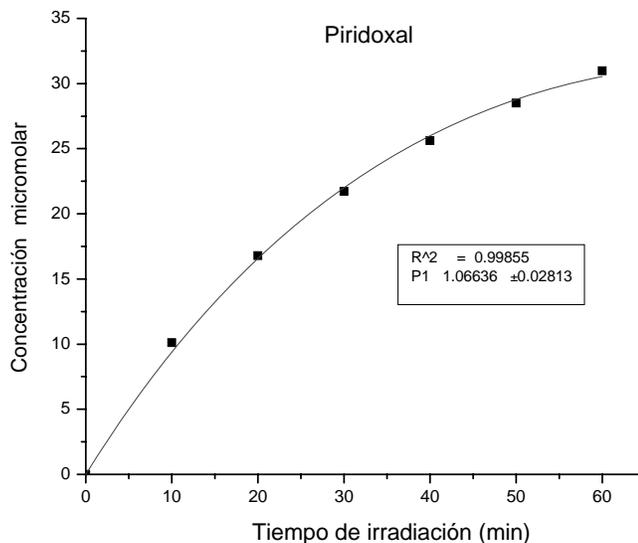


Figura 33. Curva de concentración del piridoxal producido por radiólisis de piridoxina. Las soluciones 1 mM de piridoxina + 2.5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, posteriormente saturadas con N_2O , fueron irradiadas a 35.8 Gy/ min.

De acuerdo con la curvatura observada en la figura 33, a medida que aumenta la dosis de irradiación y, al mismo tiempo, la cantidad de radicales $\cdot\text{OH}$ producidos, el piridoxal formado comienza a descomponerse, dando lugar, a su vez, a la formación de productos radiolíticos secundarios.

1.1.4. Valor G del piridoxal. El área obtenida para cada concentración de piridoxal en su valor de $\lambda_{\text{máx}}$ (288 nm) permitió conocer, mediante el dato de pendiente (P_1) de las curvas patrón, la concentración de producto formado en la radiólisis. Posteriormente se calculó su valor G, siendo éste de 0.29 moléculas producidas por cada 100 electrón-volts de energía absorbida, no habiendo encontrado referencias sobre el particular.

Con respecto al estudio realizado por Galatzeanu y Antoni (1966) sobre los efectos de la irradiación γ en la vitamina B₆,⁴⁴ en el que también se concluye la existencia de al menos tres grupos de productos radiolíticos, los cuales contuvieron 1) grupos fenólicos, 2) grupos aldehído y 3) ácidos orgánicos, se puede enunciar lo siguiente: a) se identificó 6-hidroxipiridoxina, que es un producto radiolítico con dos grupos fenólicos; b) se confirmó la formación (en ausencia y en presencia de oxígeno) de piridoxal, que es un producto con un grupo aldehído, y c) en lo que se refiere a productos radiolíticos que contienen grupos carboxilo (ácidos orgánicos), ningún producto radiolítico primario con dichos grupos fue esperado para la piridoxina, en cuya molécula, en caso de que tales productos se formasen, primero tendría que ocurrir la oxidación de alguno de sus grupos hidroximetilo (4 ó 5), lo que daría lugar a los correspondientes aldehídos (productos radiolíticos primarios), y posteriormente, por reacción de éstos con las especies primarias de la radiólisis del H₂O, a los respectivos ácidos carboxílicos, que serían productos radiolíticos secundarios, que se forman en muy pequeña proporción, y que no fueron estudiados en este trabajo.

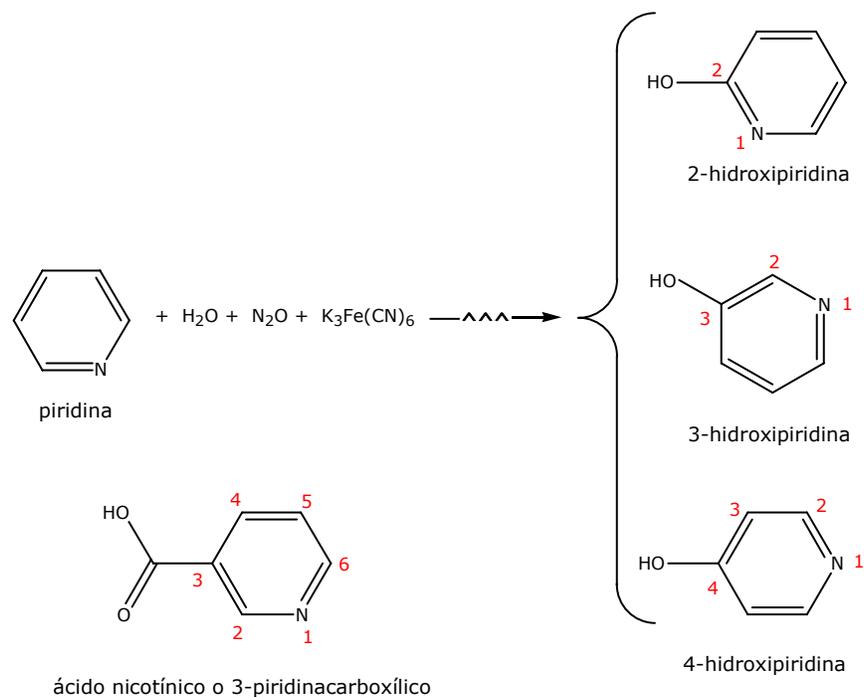
2. Radiólisis de la piridina

Con el objetivo de conocer el principal efecto director del nitrógeno de la niacina (ácido nicotínico) con respecto a la adición de los radicales $\cdot\text{OH}$, antes de su irradiación se llevó a cabo la radiólisis en solución acuosa de piridina, que es la molécula que constituye su anillo base; de tal manera que, extrapolando los resultados de esta última a la niacina, pudiera observarse el efecto director del nitrógeno de la vitamina hacia la adición electrofílica del $\cdot\text{OH}$, y proponerse el sitio más favorable para la adición de éste a su molécula.

2.1. Efecto de las dosis de irradiación en la piridina

El estudio de la piridina se realizó *bajo* las siguientes condiciones: se prepararon soluciones acuosas de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2.5 mM que posteriormente fueron saturadas con N_2O durante 10 min, a las cuales se les adicionó un volumen de 10 μL de piridina, dando esto una concentración de piridina \approx 41 mM, irradiándose finalmente a una razón de dosis de 42.4 Gy/ min.

En el siguiente esquema se muestran los productos radiolíticos esperados en la radiólisis de piridina en solución acuosa. Con fines comparativos se incluye la estructura química del ácido nicotínico:



Es a partir del mayor rendimiento radioquímico observado entre los tres productos propuestos como podrá saberse cuál o cuáles serían las posiciones más favorecidas para la adición del $\cdot\text{OH}$ al anillo aromático del ácido nicotínico y, por consiguiente, cuáles serían algunos de los productos radiolíticos que con mayor seguridad podrían formarse. En ese sentido, y con base en la información recopilada, se descartó la formación de un N-óxido de piridina.^{48, 54}

2.1.1. Productos radiolíticos identificados. Los productos radiolíticos que se identificaron fueron, como se esperaba, los isómeros 2-, 3- y 4-hidroxipiridina (2-OHP, 3-OHP y 4-OHP, de manera respectiva). Las condiciones de elución fueron las siguientes: como fase estacionaria: columna Alltima C₁₈ de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno; tamaño de partícula: 3 μm ; y como fase móvil: 30 % de metanol + 70 % de NaH₂PO₄ 50 mM; volumen de inyección: 25 μL ; flujo: 0.5 mL/ min. A continuación se muestran, con sus respectivos valores de $\lambda_{\text{máx}}$, los espectros UV de los productos radiolíticos:

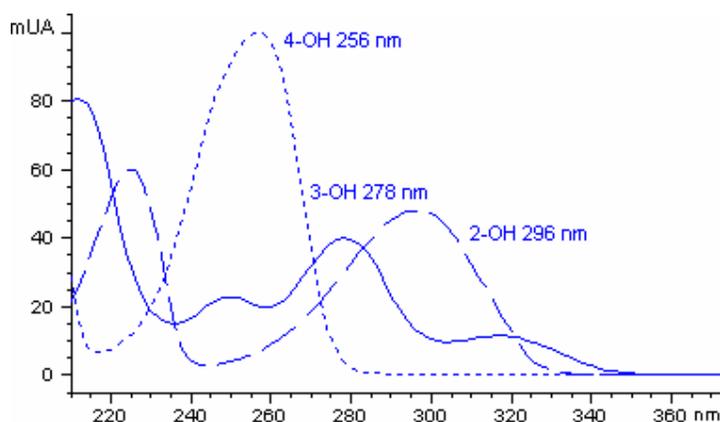


Figura 34. Espectros UV de la 2-hidroxipiridina (2-OHP), la 3-hidroxipiridina (3-OHP) y la 4-hidroxipiridina (4-OHP); solución estándar 0.25 mM.

En los siguientes cromatogramas se muestran los tres isómeros separados con sus respectivos tiempos de retención, tanto en solución patrón (figura 35) como en solución irradiada (figura 36). Se encontró que la piridina no interfiere en el análisis de los productos.

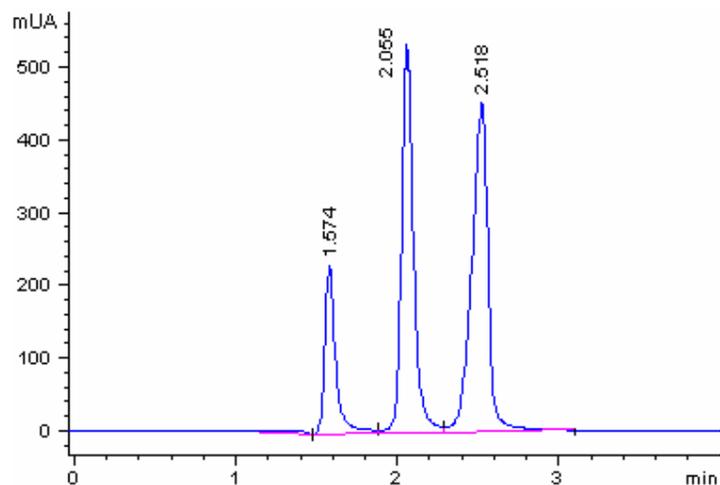


Figura 35. Cromatograma de los compuestos 4-OHP ($t_r \approx 1.58$ min); 2-OHP (≈ 2.05 min) y 3-OHP (≈ 2.52 min); solución patrón 0.5 mM de cada compuesto.

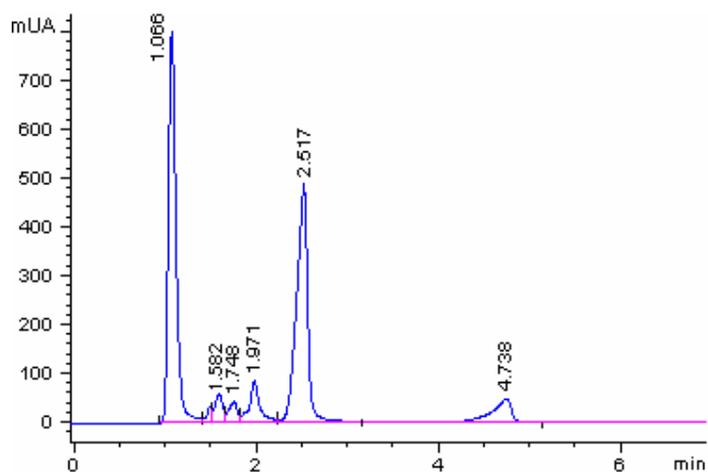
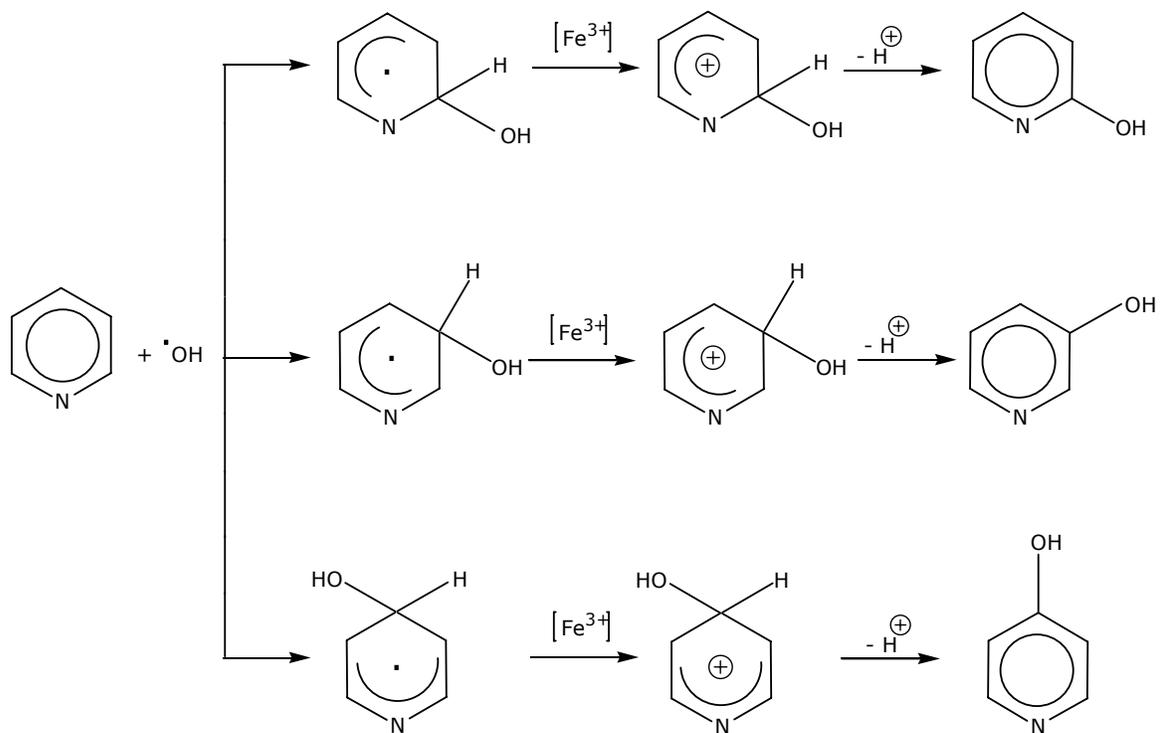


Figura 36. Cromatograma de los productos radiolíticos 4-OHP ($t_r = 1.58$ min); 2-OHP (≈ 2 min) y 3-OHP (≈ 2.52 min) obtenidos al irradiar piridina en solución acuosa a una dosis de 2.54 kGy (60 min de irradiación). A ≈ 1.07 min eluye el $K_3Fe(CN)_6$, mientras que entre éste y la 4-OH, así como a ≈ 1.75 min, eluyen dos productos no identificados, seguramente secundarios. Por último, a ≈ 4.74 min eluye la piridina.

A continuación se muestran los mecanismos para la formación de los isómeros 2-OHP, 3-OHP y 4-OHP por ataque del radical $\cdot OH$ a la piridina en presencia de Fe^{3+} ; tal esquema fue anteriormente postulado por Selvarajan y Raghavan (1980):⁵⁴



2.1.2. Cuantificación de los productos radiolíticos. Enseguida se muestran las curvas patrón de los tres productos radiolíticos de la piridina, que son un ejemplo de las curvas elaboradas cada día que se realizó un experimento de irradiación:

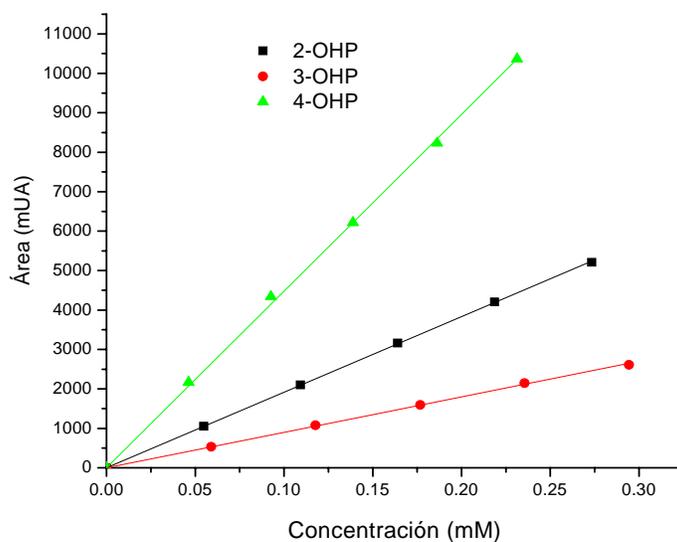


Figura 37. Curvas patrón de la 2-, 3- y 4-hidroxipiridina (2-OHP, 3-OHP y 4-OHP, recíprocamente).

Enseguida se presentan las curvas de producción de la 2-OHP, 3-OHP y de la 4-OHP en función del tiempo de irradiación (figura 38):

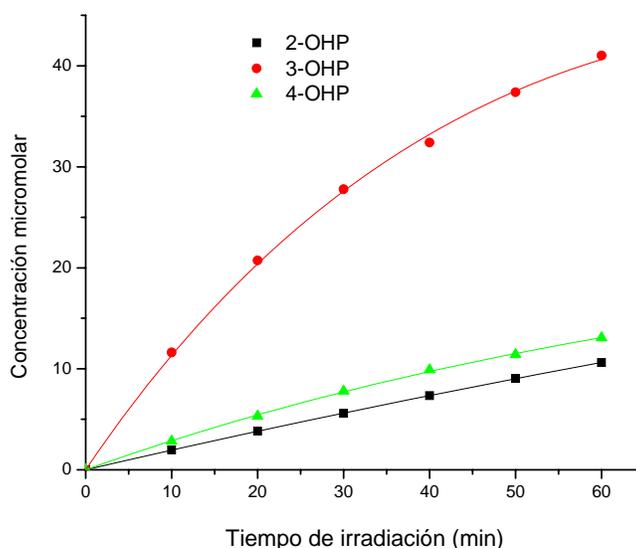


Figura 38. Curvas de producción de los productos 2-, 3- y 4-hidroxi piridina que se formaron por radiólisis de piridina (≈ 41 mM) en solución acuosa saturada con N_2O , en presencia de $K_3Fe(CN)_6$ 2.5 mM; la razón de dosis fue de 42.4 Gy/ min.

2.1.3. Valores G. A partir de las áreas obtenidas para cada concentración de 2-OHP, 3-OHP y 4-OHP, en sus respectivos valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$, y mediante el dato de pendiente (P_1) de sus curvas patrón, fue posible conocer la concentración de producto formado en la radiólisis, así como su valor G.

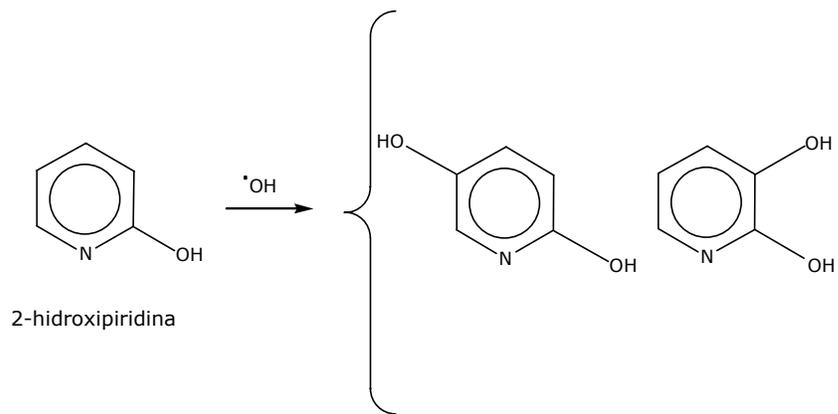
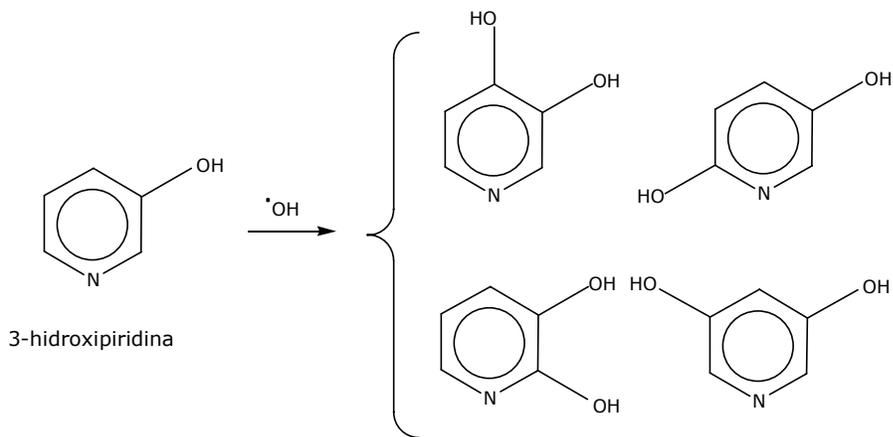
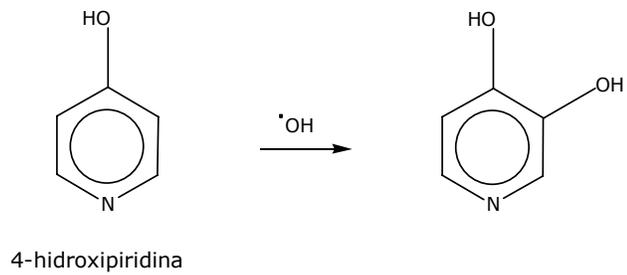
En la tabla 4 se presentan los valores G de los tres isómeros.

Tabla 4. Valores G de los productos radiolíticos de la piridina en solución acuosa.

Producto radiolítico	3-hidroxi piridina	4-hidroxi piridina	2-hidroxi piridina
Valor G	2.97	0.07	0.044

Los valores G de los productos radiolíticos 3-OHP, 4-OHP y 2-OHP fueron, recíprocamente, 2.97, 0.07 y 0.044, lo que significa que el isómero 3-OHP es el que se produce en mayor proporción, seguido de la 4-OHP y, finalmente, de la 2-OHP. A partir de estos resultados se puede apreciar que el nitrógeno del anillo piridínico es, con respecto a electrófilos como el radical $\cdot\text{OH}$, esencialmente un orientador *meta*; un hallazgo que coincide con lo informado en la literatura, tanto en lo que se refiere a la sustitución electrofílica en la piridina, que se lleva a cabo, principalmente, en la posición 3, análoga a la sustitución *meta* que muestran los derivados desactivados del benceno, como en lo referente a la naturaleza electrofílica del radical $\cdot\text{OH}$, cuya adición ocurre predominantemente en la posición menos deficiente de electrones de la piridina, siendo ésta la 3.^{16, 54, 59} En cuanto al menor rendimiento radioquímico observado para los isómeros 2-OHP y 4-OHP, éste puede ser explicado si se considera que el ataque electrofílico en las posiciones 2 y 4 de la piridina produce un intermediario inestable, en el que una de las estructuras de resonancia tiene una carga positiva y sólo seis electrones en el átomo de nitrógeno.¹⁶

Por otra parte, en lo que se refiere a las curvas de formación de los productos radiolíticos (figura 38), la mayor curvatura del producto 3-OHP con respecto a los isómeros 4-OHP y 2-OHP indica una mayor descomposición radiolítica del mismo; lo que puede comprenderse si se toma en cuenta la presencia en su estructura del grupo 3-hidroxilo, que al ser un fuerte orientador *orto-para*, daría lugar, en virtud de su posición, a la formación de un mayor número de productos radiolíticos secundarios al reaccionar con los $\cdot\text{OH}$: de cuatro productos en total, en contraste con los isómeros 4-OHP y 2-OHP, que darían lugar, de manera respectiva, a la producción de uno y dos productos, puesto que, analizando el efecto director del sustituyente OH en las tres moléculas, así como el efecto orientador *meta* del nitrógeno piridínico (que favorece la adición del $\cdot\text{OH}$ a las posiciones 3 y 5), y si, por último, se recuerda que la formación de un N-óxido de piridina no ocurre,^{48, 54} la 3-OHP presenta cuatro posiciones posibles para la adición del $\cdot\text{OH}$: dos posiciones *orto* y una *para*, más una posición *meta* respecto al nitrógeno; mientras que los isómeros 2-OHP y 4-OHP presentan sólo dos: la 3 y la 5. Lo anterior puede ilustrarse en los siguientes esquemas:



2.2. Hipótesis formulada para el estudio de la radiólisis de niacina. La radiólisis de piridina permitió conocer las posibilidades de reacción de la niacina, y en particular del ácido nicotínico, en virtud de su estructura químicamente similar. Así, a partir de los datos experimentales del heterociclo base (piridina), y de la información bibliográfica recopilada, se formularon las siguientes hipótesis: 1) debido a que la posición *meta* del anillo piridínico es el sitio favorecido para la adición electrofílica del radical $\cdot\text{OH}$, así como a la posibilidad de que ocurra la descarboxilación del ácido nicotínico durante su radiólisis,³⁹ uno de los productos radiolíticos de esta vitamina en solución acuosa será la 3-hidroxipiridina; y 2) considerando que la posición 5 del ácido nicotínico (que es la otra posición *meta* de la molécula) también está favorecida para la adición electrofílica, tanto por efecto del nitrógeno como del grupo carboxilo, y que existe evidencia de la preferente adición del $\cdot\text{OH}$ a ésta,⁵⁸ así como de la formación del radical intermediario derivado de su adición a dicho sitio (figura 13),^{13, 58} otro de los productos radiolíticos del ácido nicotínico en solución acuosa será el ácido 5-hidroxinicotínico, que será, además, el principal producto radiolítico.

3. Radiólisis de la niacina (ácido nicotínico)

a) **Curva patrón.** La siguiente curva patrón es un ejemplo de las curvas elaboradas cada día que se realizó un experimento de irradiación, y fue determinada como el área bajo la curva del pico cromatográfico del ácido nicotínico en su valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción de luz UV, que fue de 262 nm.

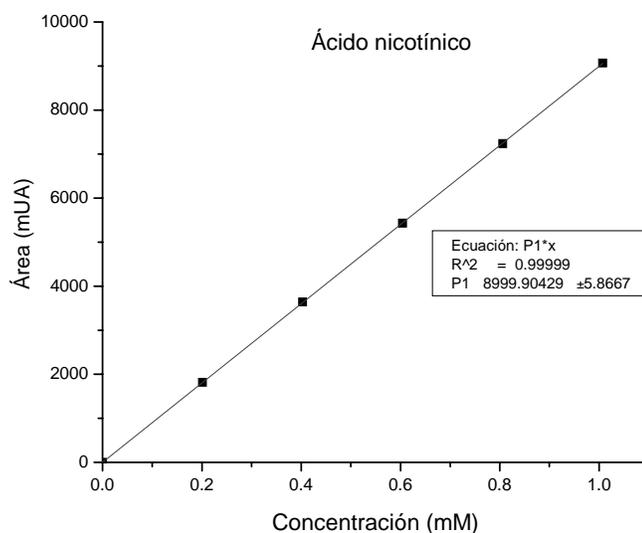


Figura 39. Curva patrón del ácido nicotínico.

b) **Espectro UV.** El siguiente espectro fue obtenido a partir de una solución estándar de ácido nicotínico. Las condiciones cromatográficas de elución para éste y sus soluciones irradiadas fueron las siguientes: como fase estacionaria: columna Alltima C₁₈ de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno; tamaño de partícula: 3 μm ; y como fase móvil: 75 % de H₂SO₄ 0.08 N + 25 % de 1-hexanosulfonato de sodio; volumen de inyección: 100 μL , y flujo: 0.3 mL/ min.

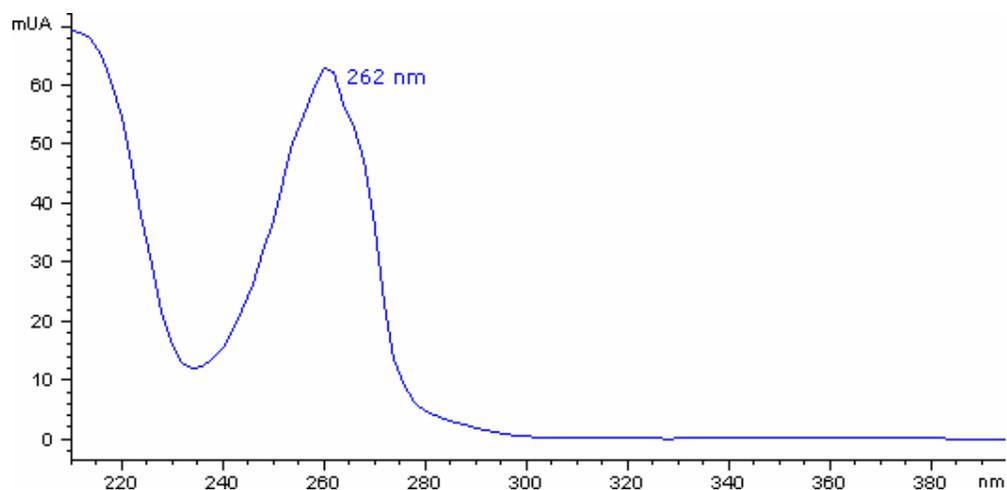
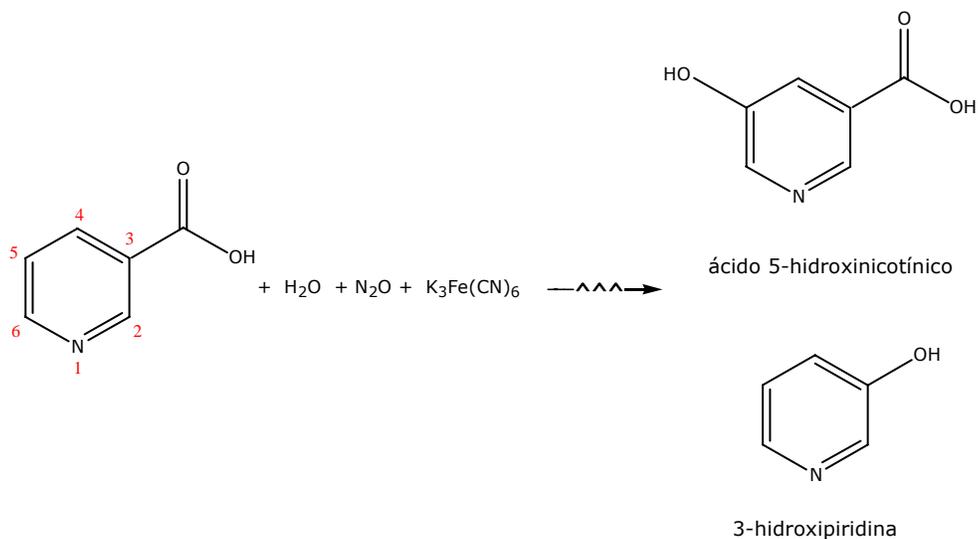


Figura 40. Espectro UV del ácido nicotínico; solución 0.8 mM; $\lambda_{\text{máx}} = 262 \text{ nm}$; $t_{\text{R}} = 4.1 \text{ min}$.

3.1. Efecto de las dosis de irradiación en el ácido nicotínico. Las condiciones de reacción de las soluciones de vitamina fueron las siguientes: ácido nicotínico 1 mM + 2.5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ que fueron saturadas con N_2O e irradiadas a una razón de dosis de 42.4 Gy/ min.

3.1.1. Productos radiolíticos esperados. En el siguiente esquema se muestran los productos radiolíticos esperados en la radiólisis de ácido nicotínico en solución acuosa:



3.1.2. Producto radiolítico identificado: 3-hidroxi piridina. Debido a que no se contaba con una muestra auténtica de ácido 5-hidroxinicotínico —pues no estaba disponible comercialmente—, el único producto radiolítico identificado en la radiólisis del ácido nicotínico fue la 3-hidroxi piridina (3-OHP). Enseguida se muestran los espectros UV utilizados como estándares del ácido nicotínico y de la 3-OHP (figura 41); así como el de la 3-OHP formada por radiólisis (figura 42) y, finalmente, el cromatograma de los productos radiolíticos del ácido nicotínico (figura 43):

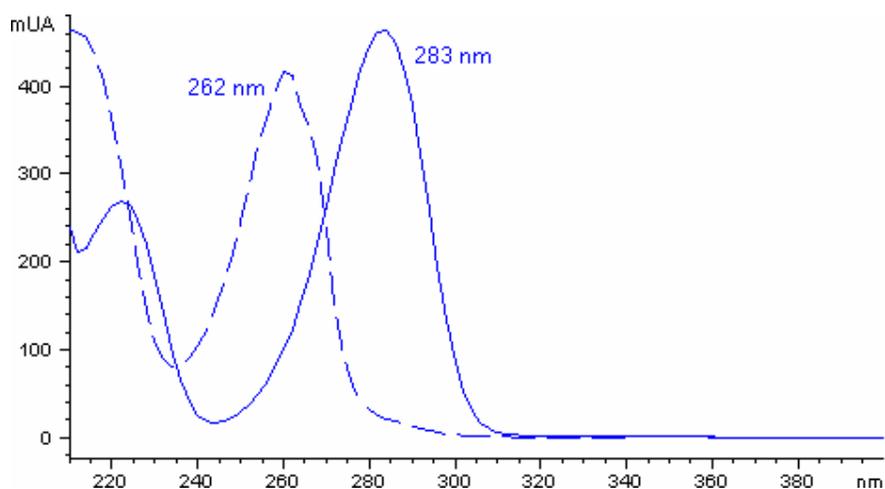


Figura 41. Espectros UV del ácido nicotínico (0.5 mM; $\lambda_{\text{máx}} = 262 \text{ nm}$; $t_{\text{R}} \approx 4.1 \text{ min}$) y de la 3-OHP (0.26 mM; $\lambda_{\text{máx}} = 283 \text{ nm}$; $t_{\text{R}} \approx 3.6 \text{ min}$).

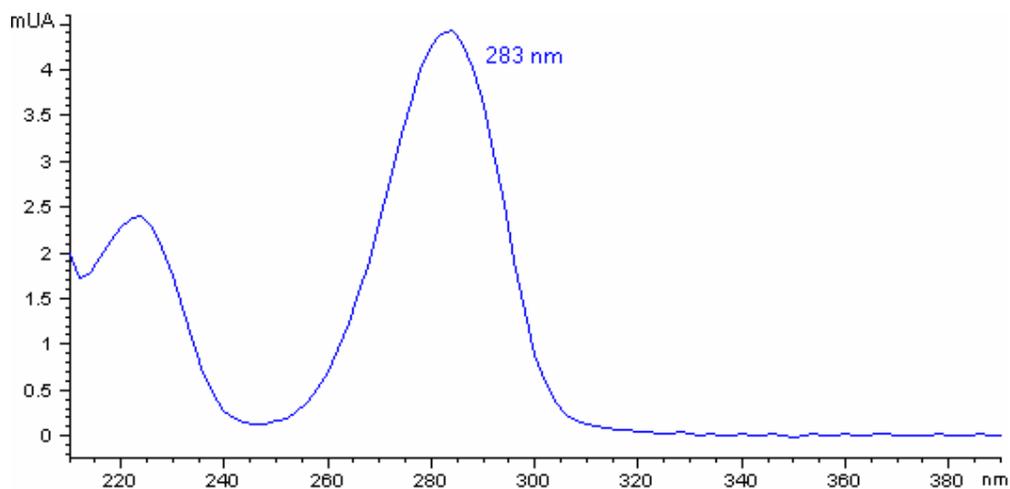


Figura 42. Espectro UV de la 3-OHP formada por radiólisis de nicotínico; $\lambda_{\text{máx}} = 283 \text{ nm}$; $t_{\text{R}} \approx 3.6 \text{ min}$.

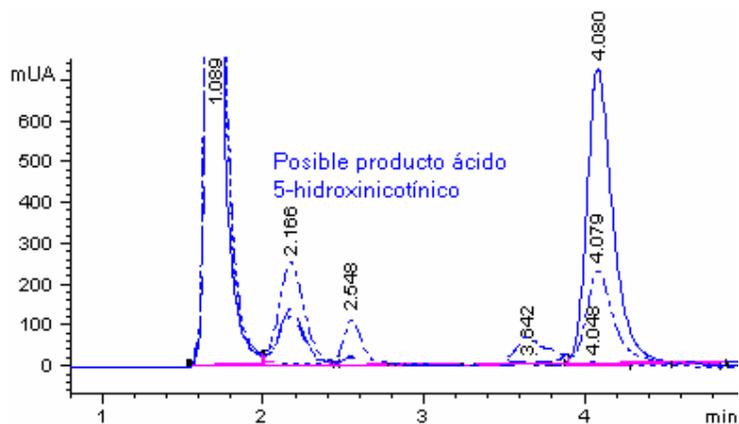


Figura 43. Cromatograma de una solución de ácido nicotínico 1 mM + 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ saturada con N_2O e irradiada a una dosis de 2.54 kGy. A 1.09 min eluye el $K_3Fe(CN)_6$; a ≈ 4.1 min lo hace el ácido nicotínico; a 3.64 min la 3-OHP; a ≈ 2.5 min eluye un compuesto desconocido, mientras que a ≈ 2.17 min lo hace el compuesto que se piensa que es el ácido 5-hidroxinicotínico, el que sería —únicamente si se considera el área de su pico cromatográfico— el producto formado en mayor proporción.

3.1.3. Cuantificación de la 3-hidroxipiridina. A continuación se presenta un ejemplo de las curvas patrón utilizadas para la cuantificación de la 3-hidroxipiridina:

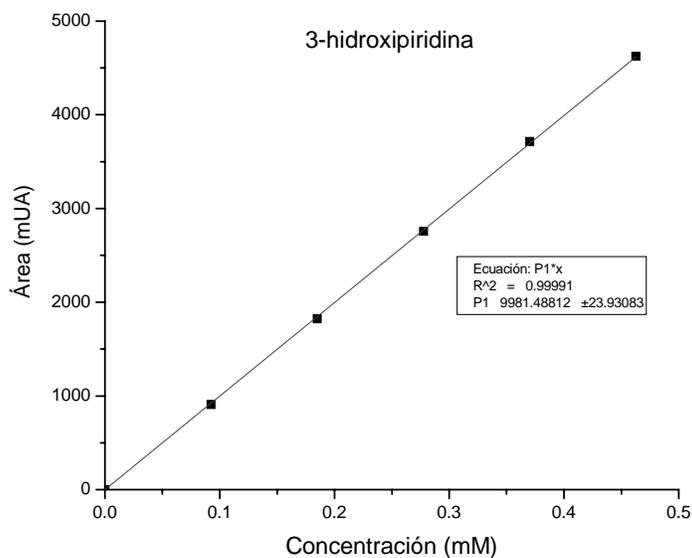


Figura 44. Curva patrón de la 3-hidroxipiridina.

Ahora se presenta un ejemplo de las curvas de producción de la 3-hidroxipiridina obtenida por radiólisis de ácido nicotínico:

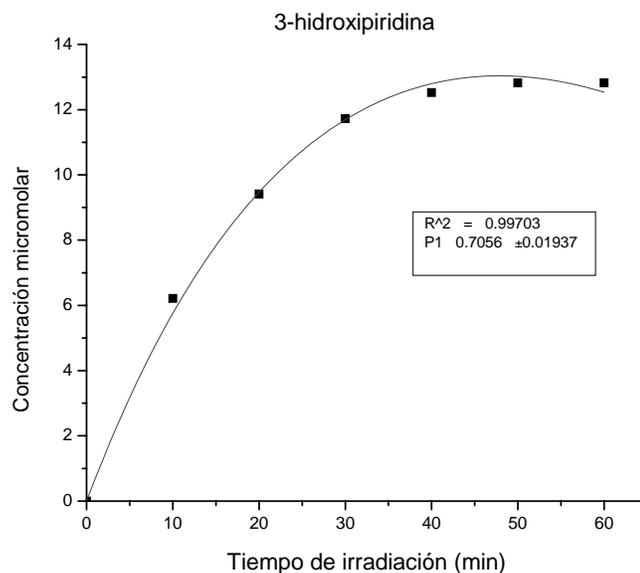
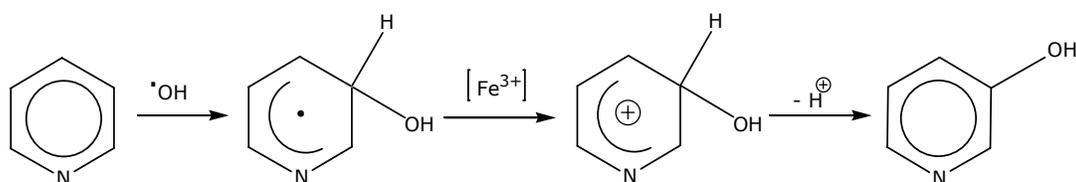


Figura 45. Curva de producción de la 3-hidroxipiridina obtenida por radiólisis de ácido nicotínico en función del tiempo de irradiación. Las condiciones de reacción fueron: soluciones 1 mM de ácido nicotínico + 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ que fueron saturadas con N_2O e irradiadas a 42.4 Gy/ min.

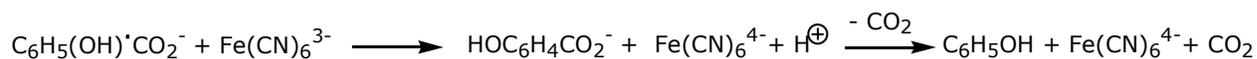
3.1.4. Valor G. A partir de las áreas determinadas para cada concentración de 3-OHP producida, y mediante el dato de pendiente (P_1) de su curva patrón, fue posible conocer la concentración de producto formado en la radiólisis de ácido nicotínico. Posteriormente se calculó su valor G, siendo éste de 0.18 moléculas producidas por cada 100 electrón-volts de energía absorbida; no encontrándose en la literatura información referente al particular. En la presente investigación, sin embargo, dicho valor de rendimiento fue comparado con el valor G del mismo producto obtenido por radiólisis de piridina ($G = 2.97$), observándose en la radiólisis de ácido nicotínico un rendimiento muy inferior del producto (en $\approx 94\%$); un resultado que puede explicarse no sólo tomando en cuenta que dos de las condiciones de radiólisis eran distintas: 1) la concentración, que era ≈ 41 mM para la piridina, y de 1 mM para el ácido nicotínico, así como también 2) el pH de las soluciones de piridina y de ácido nicotínico (que contenían $K_3Fe(CN)_6$ 2.5 mM), de 8.2 y de 4, de manera respectiva; encontrándose a pH = 8.2 un mayor número de moléculas desprotonadas de piridina ($pK_a = 5.23$)⁹ que de ácido nicotínico a pH = 4 (siendo el pK_a para el nitrógeno de su molécula de 4.85)¹³, lo que en el caso de la piridina conduciría a una mayor destrucción radiolítica de su molécula, puesto que cuando el nitrógeno de la piridina está desprotonado, sus propiedades electrofílicas se acentúan, aumentando su reactividad;⁵⁴ sino también, y quizá sea uno de los factores más importantes, por el hecho de que la reacción de descarboxilación, que ocurre en la molécula de ácido nicotínico, implica un mecanismo radiolítico más complejo

que aquel que tiene lugar en la formación de 3-hidroxipiridina por radiólisis de piridina; una aseveración que, por otra parte, coincide con lo informado en la literatura en el sentido de que existe una mayor tendencia del radical $\cdot\text{OH}$ a adicionarse a la posición o posiciones no sustituidas en un anillo piridínico.⁵⁸

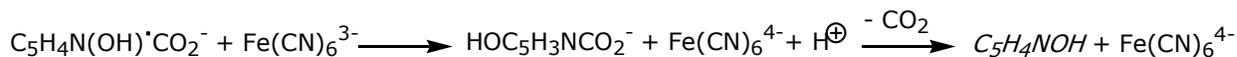
3.2. Posibles mecanismos de radiólisis. Con la intención de explicar la formación de 3-hidroxipiridina por radiólisis de ácido nicotínico en solución acuosa, enseguida se muestran dos mecanismos de reacción que fueron tomados como base para proponer una posible ruta para la formación de dicho producto: 1) el mecanismo radiolítico de la piridina por ataque del radical $\cdot\text{OH}$:⁵⁴



Así como 2) un mecanismo radiolítico propuesto para la adición del radical $\cdot\text{OH}$ al ácido benzoico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2^-$ —un ácido aromático—) con posterior descarboxilación:⁶⁹



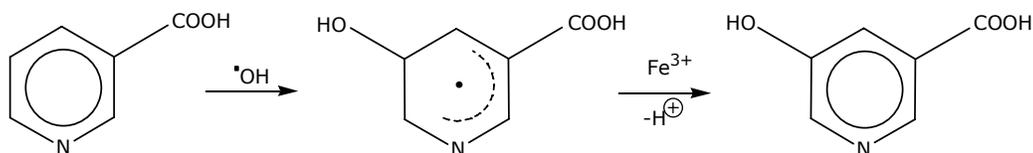
Proponiéndose así, a partir de lo anterior, el mecanismo de radiólisis que sigue, en donde $C_5H_4NCO_2^-$ y C_5H_4NOH representan, de manera respectiva, al ácido nicotínico y a la 3-hidroxipiridina:



En lo que se refiere al ácido 5-hidroxinicotínico, aun cuando no pudo ser identificado por no contar con su respectiva muestra estándar, la hipótesis de su formación, así como de que sería el producto mayoritario de la radiólisis en solución acuosa del ácido nicotínico, se sustentó sobre las siguientes bases: 1) la orientación *meta* del nitrógeno y del grupo carboxilo en la molécula de ácido nicotínico favorecen ambos la adición del $^{\bullet}OH$ a su posición 5 no sustituida, en contraste con la adición del mismo a la posición 3, que se ve favorecida sólo por el efecto *meta* del nitrógeno; 2) la mayor tendencia del $^{\bullet}OH$ a adicionarse a la posición *meta* no sustituida de la molécula,⁵⁸ pues la descarboxilación de ésta implicaría —como ya se mencionó— un mecanismo radiolítico más complejo que la sola adición del $^{\bullet}OH$; y 3) la evidencia en estudios previos de radiólisis de esta vitamina en solución acuosa de la generación del radical intermediario que por oxidación daría lugar al producto propuesto (figura 13).^{13, 58}

En particular, la hipótesis de que el ácido 5-hidroxinicotínico sería el producto mayoritario no pudo ser contrastada debido a que no se cuantificó, y la única especulación al respecto puede hacerse al considerar el área de su pico cromatográfico, que es la mayor en relación con los demás productos (figura 43).

Para la formación de este producto, se propone el siguiente esquema de reacción:



3.3. Productos radiolíticos que no se formaron. Se confirmó que los productos radiolíticos ácido 2-hidroxinicotínico y 6-hidroxinicotínico, que se formarían en caso de que la adición de los $\cdot\text{OH}$ ocurriera, de manera respectiva, en las posiciones 2 y 6 (no sustituidas) del ácido nicotínico, sin que tuviera lugar, desde luego, su descarboxilación, no se producen *bajo* las condiciones de trabajo, a saber: ácido nicotínico 1 mM + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2.5 mM, saturación con N_2O , dosis máxima de 2.54 kGy, o bien no lo hacen en concentraciones apreciables como para poder ser detectados. De manera análoga, no se produjo ni piridina ni los isómeros 2- y 4-hidroxipiridina, que a diferencia de los ácidos 2- y 6-hidroxinicotínico, provendrían, en caso de formarse, tanto de la descarboxilación del ácido nicotínico como de la adición de radicales libres a su anillo. En el caso hipotético de que se formara piridina a partir de ácido nicotínico tendría que ocurrir, aparte de su descarboxilación, la adición de un $\cdot\text{H}$ a su posición 3, una reacción que no está tan favorecida pues, además de que en soluciones acuosas irradiadas que han sido saturadas con N_2O ($G_{\text{OH}} = 5.5$) el $\cdot\text{H}$ está presente en una concentración $\approx 10\%$ con respecto al $\cdot\text{OH}$,⁶³ los dos radicales se adicionan predominantemente a la posición *meta* no sustituida del ácido (posición 5), aunado a que el $\cdot\text{H}$ es un radical débilmente electrofílico, cuya velocidad de sustitución en el caso de las piridinas es menor que para los bencenos sustituidos,¹³ de los cuales se sabe, por cierto, que *bajo* condiciones de saturación con N_2O de "sus soluciones acuosas", la especie que reacciona con éstos es el $\cdot\text{OH}$, y no el $\cdot\text{H}$; y si los productos radiolíticos fueran 2- y 4-hidroxipiridina, tendría que verificarse la adición del $\cdot\text{OH}$ a las posiciones 2 ó 4; lo que, de acuerdo con los resultados de esta investigación, no ocurre. En ese contexto, la piridina sería un producto radiolítico primario del ácido nicotínico, formado por la sustitución del grupo 3-COOH por un hidrógeno, mientras que los isómeros 2- y 4-hidroxipiridina serían productos radiolíticos secundarios, en virtud de que para producirse, primero tendrían que formarse los productos radiolíticos que les dieran origen (primarios): ya sea productos de descarboxilación (que en ambos casos sería piridina), que posteriormente experimentasen la adición del $\cdot\text{OH}$, o bien los ácidos 2- y 4-hidroxinicotínico, que posteriormente se descarboxilasen. La confirmación de que los productos anteriores no se formaron, se realizó, en todos los casos, empleando muestras auténticas en estado puro. Por último, considerando que ni la adición del $\cdot\text{H}$ a la posición 3 del ácido nicotínico ni aquella del $\cdot\text{OH}$ a las posiciones 2, 4 y 6 tuvieron lugar, se pudo confirmar que 1) la principal especie reactiva que interviene en la radiólisis de ácido nicotínico *bajo* condiciones de $G_{\text{OH}} = 5.5$ es el $\cdot\text{OH}$ (y no el $\cdot\text{H}$) y, por otro lado, que 2) las posiciones 2, 4 y 6 del ácido no están favorecidas para la adición de éste, tal como se ha informado para está y otras carboxipiridinas.⁵⁸

4. Observaciones generales de las vitaminas y de sus productos radiolíticos

4.1. Formas químicas en las que se encontraban las vitaminas. Es importante informar en qué forma química se encontraban las vitaminas en solución acuosa antes de ser irradiadas. Teniendo presentes sus valores de pKa ($pK_{a1} = 5.0$ y $pK_{a2} = 9.0$),¹⁰ a pH = 6.3 la piridoxina se encontraba como molécula protonada en dos formas posibles (figura 46), mientras que el ácido nicotínico, en virtud de sus valores de pKa ($pK_{a1} = 2.07$ y $pK_{a2} = 4.85$),¹³ a pH = 4 se encontraba en su forma anfótera (figura 47).

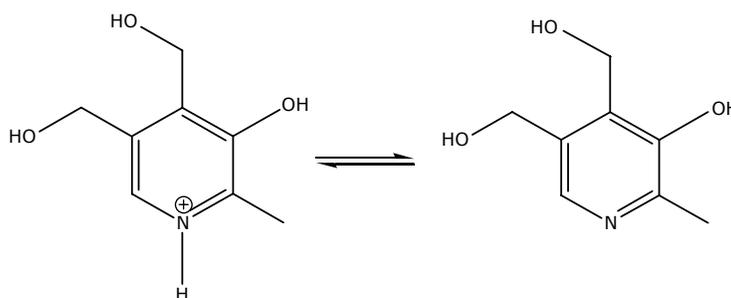


Figura 46. Formas de la piridoxina a pH = 6.3.

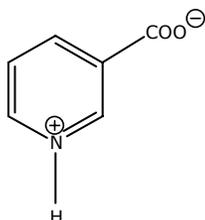


Figura 47. Forma química (anfótera) del ácido nicotínico a pH = 4.

4.2. Productos radiolíticos. De los dos productos identificados en el estudio de radiólisis de la vitamina B₆, la 6-hidroxipiridoxina y el piridoxal, sólo el piridoxal presenta actividad vitamínica, pues se trata, precisamente, de otra de las formas químicas en las que la vitamina B₆ se encuentra en la naturaleza. Por su parte, la 6-hidroxipiridoxina carece tanto de actividad nutricional como de actividad antinutricional.^{5, 88}

Con respecto al estudio de radiólisis de niacina, ni la 3-hidroxipiridina, también conocida como 3-piridinol,¹¹ ni el ácido 5-hidroxinicotínico (producto no confirmado) son reconocidos como vitaminas.

5. Descomposición radiolítica de las vitaminas en solución acuosa

5.1. Gráficas. Los estudios de descomposición radiolítica se realizaron utilizando ácido nicotínico, en el caso de la niacina, y piridoxina, en el de la vitamina B₆. Las soluciones de vitamina de concentración 1 mM, que contenían 2.5 mM de K₃Fe(CN)₆ y que fueron saturadas con N₂O, se irradiaron a dosis entre 0 y 2.15 kGy.

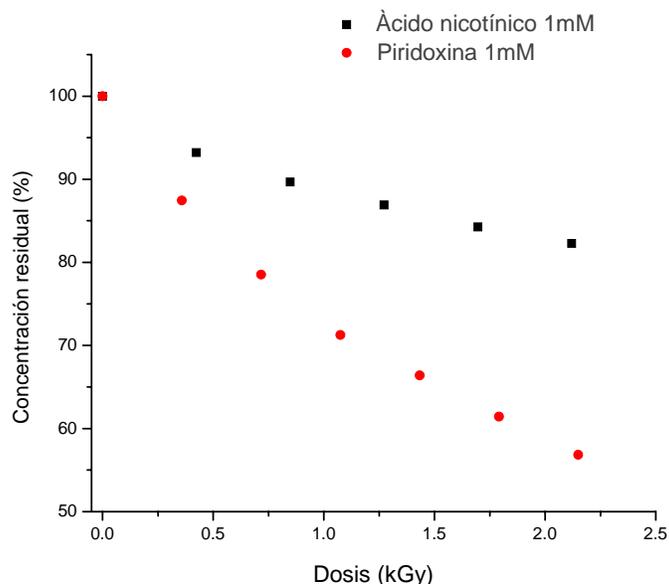
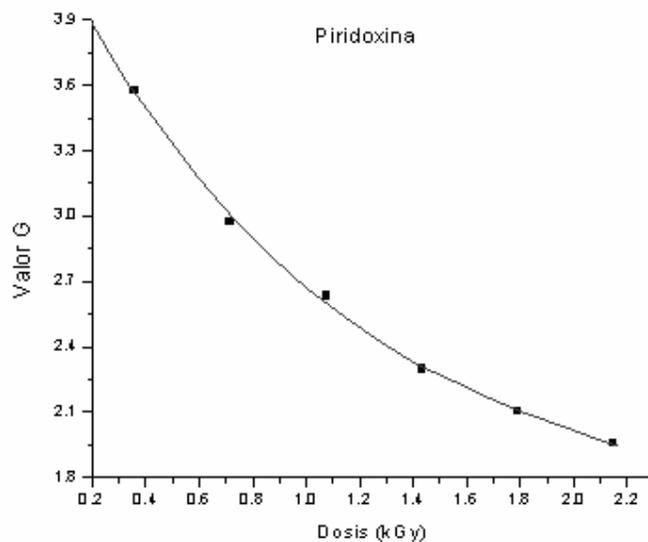
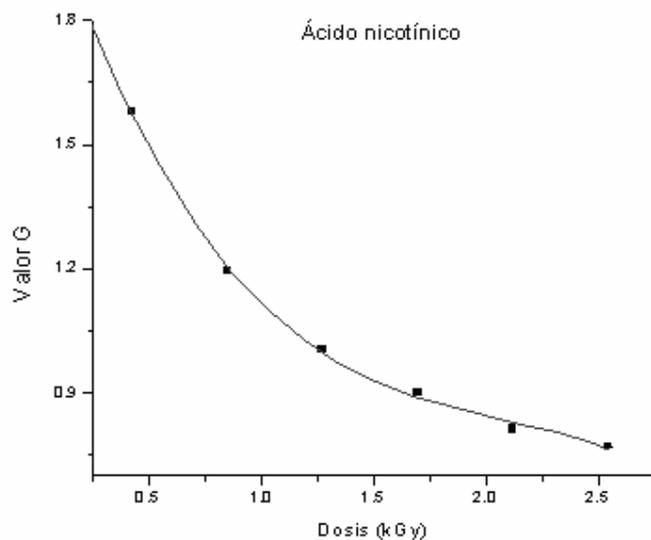


Figura 48. Gráfica donde se muestra la descomposición radiolítica del ácido nicotínico y de la piridoxina 1 mM — en términos de la concentración residual de las vitaminas— en función de las dosis de irradiación.

Como puede observarse en la figura 48, a medida que aumenta la dosis de irradiación, disminuye la concentración de las vitaminas en solución acuosa, debido al aumento de su destrucción radiolítica. Asimismo, en ambos casos puede observarse la tendencia a una menor destrucción radiolítica conforme aumenta la dosis, o dicho en otros términos, a pesar de que la descomposición radiolítica de las vitaminas continúa conforme se incrementa la dosis, el grado de destrucción de éstas es cada vez menor; siendo posible explicar lo anterior si se toman en cuenta, al menos, dos factores: 1) la disminución de la concentración original de las vitaminas, que da como resultado un menor número de moléculas “de sustrato” en solución acuosa y, por consiguiente, un menor número de reacciones con los radicales $\cdot\text{OH}$; y 2) la formación de los productos radiolíticos primarios — cuya concentración aumenta a mayores dosis—, los cuales entran en competencia con las vitaminas por los radicales $\cdot\text{OH}$.

5.2. Cuantificación. A una misma dosis de irradiación, así como a una misma concentración de vitamina (1 mM), el ácido nicotínico fue destruido en menor proporción que la piridoxina; por ejemplo, a una dosis de 2.15 kGy se registró una destrucción de 18 % para el ácido y de 43 % para la piridoxina. Tales resultados coinciden con lo informado en la literatura, en donde la niacina es clasificada como “más resistente” a la radiación ionizante que la vitamina B₆ (clasificada como de “resistencia intermedia”).³⁹ En ese contexto, la menor destrucción radiolítica de la niacina puede comprenderse al observar las estructuras químicas de ambas vitaminas: teniendo la piridoxina un mayor número de grupos funcionales que el ácido nicotínico, se esperaría, con base en esto, una mayor destrucción radiolítica de la primera al reaccionar con las especies radiolíticas primarias del agua ($^{\bullet}\text{H}$, $^{\bullet}\text{OH}$ y e_{ac}^{-}) y, en particular, en el caso de esta investigación, al reaccionar con los radicales $^{\bullet}\text{OH}$. En ese sentido, además de su adición al anillo heterocíclico de la vitamina B₆ y de la niacina, las reacciones del $^{\bullet}\text{OH}$ también implican la radiólisis de los grupos funcionales de las vitaminas, como fue comprobado con la obtención de piridoxal, que es un producto generado por la reacción del grupo 4-hidroximetilo de la piridoxina con el $^{\bullet}\text{OH}$, siendo posible, del mismo modo, la obtención de un producto radiolítico con un grupo aldehído en la posición 5 —en caso de que el $^{\bullet}\text{OH}$ reaccionara con el grupo 5-hidroximetilo de la piridoxina—⁴⁴; lo que contrasta con las posibilidades de reacción del ácido nicotínico, cuyo grupo funcional 3-COOH presenta, *bajo* las condiciones de trabajo ($G_{\text{OH}} = 5.5$), únicamente la posibilidad de la descarboxilación.

5.3. Valores G°. Las siguientes gráficas (figuras 49 y 50) corresponden a la extrapolación de los distintos valores G de descomposición del ácido nicotínico y de la piridoxina en función de las dosis de irradiación; dicha extrapolación permitió conocer el valor G° de las vitaminas:



Figuras 49 y 50. Gráficas respectivas de los distintos valores G de descomposición del ácido nicotínico y de la piridoxina en función de las dosis de irradiación.

Los valores G° de la piridoxina y del ácido nicotínico fueron, recíprocamente, de 3.9 y 1.8 moléculas de vitamina destruidas por cada 100 eV de energía absorbida.

En el caso del ácido nicotínico no se encontraron datos previos de su valor G° ; lo que sí puede decirse para la piridoxina, en cuyo caso se informó el valor 3.5 —correspondiente a un estudio de radiólisis de ésta en solución acuosa—,⁵¹ que indica una menor destrucción radiolítica de la vitamina en comparación con el dato del presente trabajo. Las similitudes observadas en ambos casos fueron la concentración de vitamina (1 mM) y la razón de dosis (de 35 Gy/ min en el estudio previo, y de 35.8 Gy/ min en el presente); sin embargo, la diferencia fundamental la constituyó la utilización de N_2O : mientras que en el primer estudio se irradiaron soluciones de vitamina que no contenían N_2O , en la presente investigación las soluciones fueron saturadas con éste antes del proceso de irradiación; lo que en este último caso dio como resultado una mayor producción de radicales $\cdot OH$ durante el proceso ($G_{OH} = 5.5$, comparado con $G_{OH} = 2.7$ del estudio anterior), cuya consecuencia fue el aumento del número de reacciones de la piridoxina con tal especie, contribuyendo, por consiguiente, a una mayor destrucción radiolítica de ésta, como lo indicó su valor G° (de 3.9).

Finalmente, comparando los valores G° de la piridoxina y del ácido nicotínico obtenidos en el presente estudio, la molécula que experimenta mayor destrucción radiolítica cuando la dosis de irradiación absorbida por las soluciones acuosas tiende a cero es la piridoxina. Dicho hallazgo coincide tanto con lo informado en las fuentes documentales, en el sentido de que la piridoxina es una vitamina más sensible a la radiación ionizante que el ácido nicotínico, como con los resultados de mayor descomposición radiolítica observados en el presente trabajo (figura 48). A partir de lo anterior, y considerando, específicamente, que incluso a dosis próximas a cero (tal como lo indica la definición de valor G°) la piridoxina es destruida en una proporción de más del doble que el ácido nicotínico (3.9 frente a 1.8), se pudo confirmar que la primera es más sensible a la radiación ionizante y, en particular, muy susceptible de ser destruida por los radicales $\cdot OH$.

CONCLUSIONES

- Mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, empleando como fase móvil 75 % de H_2SO_4 0.08 N + 25 % de 1-hexanosulfonato de sodio y como fase estacionaria una columna de fase reversa, así como detección de luz UV, se obtuvo una buena separación de la vitamina B_6 (piridoxina) y de la niacina (ácido nicotínico) de sus respectivos productos radiolíticos.
- En el estudio de radiólisis de la vitamina B_6 (piridoxina) en solución acuosa se identificaron dos productos radiolíticos primarios oxidados por el radical $\cdot\text{OH}$: el piridoxal y la 6-hidroxipiridoxina.
- En el caso del piridoxal, se comprobó que este último se forma a partir de la reacción de los radicales $\cdot\text{OH}$ con la piridoxina, no siendo necesaria la presencia de O_2 para su formación; sin embargo, la presencia de dicho elemento sí influye en su concentración, concretamente aumentándola.
- El valor G del piridoxal en condiciones de ausencia de aire y de saturación con N_2O de las soluciones acuosas de piridoxina 1 mM + 2.5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ fue de 0.29 moléculas formadas por cada 100 electrón-volts de energía absorbida. El valor G del producto radiolítico 6-hidroxipiridoxina no fue calculado por no haber contado con una muestra del mismo de concentración conocida.
- Con respecto al estudio de radiólisis de piridina, la utilización de la fase móvil 30 % de metanol + 70 % de NaH_2PO_4 50 mM, así como de una columna de fase reversa en cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de luz UV, permitió la separación e identificación del principal producto formado en la radiólisis de piridina en solución acuosa: la 3-hidroxipiridina. En dicho estudio se identificaron tres productos radiolíticos: 2-hidroxipiridina, 3-hidroxipiridina y 4-hidroxipiridina, siendo sus respectivos valores G de 0.044, 2.97 y 0.070 moléculas formadas por cada 100 electrón-volts de energía absorbida. A partir de tales valores, y de las referencias consultadas, fue posible predecir la formación del producto radiolítico identificado en el estudio de radiólisis de niacina.
- En el estudio de radiólisis de niacina (ácido nicotínico) en solución acuosa se identificó un producto radiolítico primario oxidado por el radical $\cdot\text{OH}$: la 3-hidroxipiridina.
- El valor G de la 3-hidroxipiridina en condiciones de ausencia de aire y de saturación con N_2O de las soluciones acuosas de ácido nicotínico 1 mM + 2.5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ fue de 0.18 moléculas formadas por cada 100 electrón-volts de energía absorbida.
- Se fundamenta la formación del ácido 5-hidroxicotínico; sin embargo, por no encontrarse en el mercado, no fue posible contrastar su identificación.

- Con respecto a la radiólisis de niacina, los compuestos piridina, ácido 2-hidroxinicotínico, ácido 6-hidroxinicotínico, 2-hidroxipiridina y 4-hidroxipiridina, con cuyas muestras auténticas en estado puro se contaba, no se formaron *bajo* las condiciones de reacción descritas: soluciones de ácido nicotínico 1 mM + 2.5 mM de $K_3Fe(CN)_6$, saturadas con N_2O e irradiadas a una dosis máxima de 2.54 kGy; o bien en caso de haberlo hecho, su concentración se ubicó por abajo del límite de detección del procedimiento.
- Los radicales $\cdot OH$ generados en la radiólisis del agua reaccionan con ambas vitaminas por adición a su anillo heterocíclico. Es a través de dicha reacción como se formaron la 6-hidroxipiridoxina, en el caso de la vitamina B_6 (piridoxina), y la 3-hidroxipiridina, en el caso de la niacina (ácido nicotínico); sin embargo, en la formación de piridoxal a partir de piridoxina no ocurre la adición del $\cdot OH$ al anillo aromático de esta última, sino que tiene lugar un mecanismo radiolítico distinto: el de abstracción de un átomo de hidrógeno del grupo 4- CH_2OH por parte del $\cdot OH$.
- Por último, los valores G° de descomposición de la piridoxina y del ácido nicotínico en ausencia de aire, así como en presencia de $K_3Fe(CN)_6$ y con $G_{OH} = 5.5$ (soluciones saturadas con N_2O) fueron, de manera respectiva, 3.9 y 1.8; con lo cual se observó una mayor destrucción radiolítica de la vitamina B_6 que de la niacina, y se confirmó una menor sensibilidad de esta última a la radiación ionizante.

REFERENCIAS

1. Wardlaw, G. M., Hampl, J. S. y DiSilvestro, R. A. (2005). *Perspectivas en nutrición* (6ª ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
2. Coultate, T. P. (1998). *Manual de química y bioquímica de los alimentos* (2ª ed.). Zaragoza, España: Acribia.
3. Primo Yúfera, E. (1998). *Química de los alimentos*. España: Síntesis.
4. Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. & Scrimgeour, K. G. (2002). *Principles of Biochemistry* (3rd ed.). USA: Prentice Hall.
5. Fennema, O. R. (Ed.). (1996). *Food chemistry* (3rd ed.). USA: Marcel Dekker.
6. Llamas Noeggerath, R. (2005). *Mis vitaminas*. México: Trillas.
7. Budavari, S. (Ed.). (1996). *The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals* (12th ed.). NJ, USA: Merck.
8. Machlin, L. J. (Ed.). (1991). *Handbook of vitamins* (2nd ed.). New York, USA: Marcel Dekker.
9. Lide, D. R. (Ed.). (2003). *Handbook of chemistry and physics* (84th ed.). USA: CRC Press.
10. Moorthy, P. N. & Hayon, E. (1975). One-electron redox reactions of water-soluble vitamins. III. pyridoxine and pyridoxal phosphate (vitamin B₆): Short communication. Journal of the American Chemical Society **97**, 8, 2048-2051.
11. Yalkowsky, S. H. & He, Y. (2003). *Handbook of Aqueous Solubility Data*. USA, CRC Press.
12. Russel, L. F. (2000). Quantitative determination of water-soluble vitamins (2nd ed.). In Nollet, L. M. L. (Ed.), *Food Analysis by HPLC* (pp. 403-476). USA: Marcel Dekker.
13. Solar, S., Solar, W., Getoff, N., Holcman, J. & Sehested, K. (1988). Reactivity of H, OH and e_{aq}⁻ with nicotinic acid: a pulse radiolysis study. Radiat. Phys. Chem. **32**, 3, 585-592.
14. Luxon, S. G. (Ed.). (1992). *Hazards in the Chemical Laboratory* (5th ed.). Cambridge, Great Britain: The Royal Society of Chemistry.
15. Klingsberg, E. (Ed.). (1960). *Pyridine and its derivatives: Part One*. New York, USA: Interscience Publishers.
16. Morrison, R. T. & Boyd, R. N. (1992). *Organic Chemistry* (6th ed.). USA: Prentice-Hall.
17. Bourges Rodríguez, H., Mendoza M., E., Morales de León, J., Peralta M., L. y Ruiz Jiménez, S. (Eds.). (1993). *Composición de Alimentos Industrializados: Tablas de uso práctico*. México: Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ).
18. Badui Dergal, S. (1993). *Química de los alimentos* (3ª ed.). México: Alhambra Mexicana.

19. Bourges Rodríguez, H. (1984, Enero-febrero). La pelagra y la niacina. Cuadernos de Nutrición 1, 7, pp. 3-10.
20. Spinks, J. W. T. & Woods, R. J. (1990). *An introduction to radiation chemistry* (3rd ed.). New York, USA: John Wiley & Sons.
21. Mozumder, A. (1999). *Fundamentals of radiation chemistry*. USA: Academic Press.
22. Földiák, G. (Ed.). (1981). *Radiation chemistry of hydrocarbons*. Studies physical and theoretical chemistry 14. Hungary: Elsevier Scientific.
23. Joint FAO/ International Atomic Energy Agency (IAEA). (1982). *Training manual on food irradiation technology and techniques* (2nd ed.). Vienna, Austria: IAEA
24. Kilcast, D. (1994). Effect of irradiation on vitamins. Food Chemistry 49, 157-164.
25. Bello Gutiérrez, J. (2000). *Ciencia bromatológica: Principios generales de los alimentos*. Madrid, España: Díaz de Santos.
26. Wilkinson Richter, H. (1998). Radiation chemistry: Principles and applications. In Wishart, J. F. & Nocera, D. G. (Eds.), *Photochemistry and Radiation Chemistry: Complementary Methods for the Study of Electron transfer* (pp. 5-33). Washington, USA: An American Chemical Society.
27. Choppin, G. R., Liljenzin, J.-O. & Rydberg, J. (2002). *Radiochemistry and nuclear chemistry* (3rd ed.). USA: Butterworth-Heinemann.
28. Azamar B., J. A. (1982). *Dosimetría de las fuentes de irradiación gamma de ⁶⁰Co del Centro de Estudios Nucleares, UNAM: Gammabeam-650 y Gammacell-200* (Inf. Téc. Q-01-82).
29. Kishore, K., Moorthy, P. N. & Rao, K. N. (1980). Radiation induced reactions in aqueous solutions of thiamine (vitamin B₁). Radiat. Phys. Chem. 15, 669-676.
30. Farhataziz, ? & Rodgers, M. A. J. (Eds.). (1987). *Radiation chemistry: Principles and applications*. USA: VCH.
31. Burton, M. & Magee, J. L. (Eds.). (1969). *Advances in radiation chemistry* (Vol. 1). New York, USA: Wiley-Interscience.
32. Stewart, E. M. (2001). Food Irradiation Chemistry. In Molins, R. A. (Ed.), *Food Irradiation: Principles and Applications* (pp. 37-76). USA: Wiley-Interscience.
33. Adloff, J.-P. & Guillaumont, R. (1993). *Fundamentals of Radiochemistry*. USA: CRC Press.
34. Donnelly, J. K. & Robinson, D. S. (1994). Invited review free radicals in foods. Free Rad. Res. 22, 2, 147-176.
35. Ouattara, B., Giroux, M., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., Borsa, J. & Lacroix, M. (2002). Microbiological and biochemical characteristics of ground beef as affected by gamma irradiation, food additives and edible coating film. Radiation Physics and Chemistry 63, 299-304.
36. Longrée, K. y Blaker, G. G. (1972). *Técnicas sanitarias en el manejo de los alimentos*. México, D.F.: Pax-México.

37. Todoriki, S., Furuta, M., Nagai, T. & Hayashi, T. (2000). Modification of radiation resistance of *Bacillus* spores by water. Radiation Physics and Chemistry **57**, 531-534.
38. Draganić, I. G. & Draganić, Z. D. (1971). *The radiation chemistry of water*. USA: Academic Press.
39. Tობბაკ, P. P. (1977). Radiation chemistry of vitamins. In Elias, P. S. & Cohen, A. J. (Eds.), *Radiation chemistry of major food components: Its relevance to the assessment of the wholesomeness of irradiated foods* (pp. 187-220). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Scientific.
40. Badshah, A. K. & Klopfenstein, C. F. (1989). Effects of gamma irradiation on the nutritional quality of grain and legumes. I. Stability of niacin, thiamin, and riboflavin. Cereal Chem. **66**, 3, 169-170.
41. Juanchi Gómez, X. (1997). *Radiólisis de vitamina B₁₂*. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, UNAM.
42. Juanchi, X., Albarrán, G. & Negrón-Mendoza, A. (2000). Radiolysis of cyanocobalamin (vitamin B₁₂). Radiation Physics and Chemistry **57**, 337-339.
43. Chijate, C., Albarrán, G. & Negrón-Mendoza, A. (1998). Radiolysis of aqueous solutions of thiamine. Radiat. Phys. Chem. **52**, 1-6, 401-404.
44. Galatzeanu, I. & Antoni, F. (1966). Les effets des radiations gamma sur la vitamine B₆. International Journal of Applied Radiation and Isotopes **17**, 369-390.
45. Chijate Baeza, M. del C. (1997). *Efecto de la radiación gamma sobre la vitamina B₁ en solución acuosa*. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, UNAM.
46. Villavicencio, A. L. C. H., Mancini-Filho, J., Delincée, H. & Bognár, A. (2000). Effect of gamma irradiation on the thiamine, riboflavin and vitamin B₆ content in two varieties of Brazilian beans. Radiation Physics and Chemistry **57**, 299-303.
47. Richardson, L. R., Wilkes, S. & Ritchey, S. J. (1961). Comparative vitamin B₆ activity of frozen, irradiated and heat-processed foods. J. Nutrition **73**, 363-368.
48. Nicolaescu, A. R., Wiest, O. & Kamat, P. V. (2005). Mechanistic pathways of the hydroxyl radical reactions of quinoline. 1. Identification, distribution, and yields of hydroxylated products. Phys. Chem. A **109**, 2822-2828.
49. Wong, D. W. S. (1989). *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. New York, USA: Van Nostrand Reinhold.
50. Hau, L.-B. & Liew, M.-S. (1993). Effects of γ -irradiation and cooking on vitamins B₆ and B₁₂ in grass prawns (*Penaeus monodon*). Radiat. Phys. Chem. **42**, 1-3, 297-300.
51. Beltrán Texocotitla, J. M. (2002). *Radiólisis de la tiamina, riboflavina y piridoxina en solución acuosa*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química, UNAM.
52. Kishore, K., Moorthy, P. N. & Rao, K. N. (1982). Role of H₂O₂ in the radiolysis of B-group vitamins in neutral aqueous solutions. Part I. Reactions with vitamin radicals produced by OH radical reaction. Radiation Effects Letters **67**, 153-159.

53. Lee, K.-F. & Hau, L.-B. (1996). Effect of γ -irradiation and post-irradiation cooking on thiamine, riboflavin and niacin contents of grass prawns (*Penaeus monodon*). Food Chemistry **55**, 4, 379-382.
54. Selvarajan, N. & Raghavan, N. V. (1980). Reaction of OH with pyridine: Pulse-radiolytic and product-analysis studies. J. Phys. Chem. **84**, 2548-2551.
55. Dey, G. R., Kishore, K. & Moorthy, P. N. (1997). Pulse radiolysis study of 2,6-pyridinedicarboxylic acid in aqueous solutions. Radiation Physics and Chemistry **49**, 1, 9-14.
56. Dey, G. R., Naik, D. B., Kishore, K. & Moorthy, P. N. (1992). Reactions of e^-_{aq} , H and OH with picolinic acid studied by pulse radiolysis. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles **163**, 2, 391-400.
57. Solar, S., Getoff, N., Sehested, K. & Holcman, J. (1993). Pulse radiolysis of pyridine and methylpyridines in aqueous solutions. Radiat. Phys. Chem. **41**, 6, 825-834.
58. Steenken, S. & O'Neill, P. (1978). Selectivity of addition of the hydroxyl radical to ring positions of pyridine and pyridine mono- and dicarboxylic acids. An electron spin resonance investigation. The Journal of Physical Chemistry **82**, 3, 372-374.
59. Wade, L. G., Jr. (1993). *Química Orgánica* (2ª ed.). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.
60. Neta, P. & Patterson, L. K. (1974). Substituted pyridinyl radical in aqueous solutions. Formation, reactivity, and acid-base equilibria. The Journal of Physical Chemistry **78**, 22, 2211-2217.
61. Moorthy, P. N., Kishore, K. & Rao, K. N. (1982). Role of H_2O_2 in the radiolysis of B-group vitamins in neutral aqueous solutions. Part II. Reactions with reduced vitamin radicals. Radiation Effects Letters **67**, 161-166.
62. Tadera, K., Arima, M. & Yagi, F. (1988). Participation of hydroxyl radical in hydroxylation of pyridoxine by ascorbic acid. Agric. Biol. Chem. **52**, 9, 2359-2360.
63. Schuler, R. H. & Albarrán, G. (2002). The rate constants for reaction of $\cdot OH$ radicals with benzene and toluene. Radiation Physics and Chemistry **64**, 189-195.
64. Albarrán, G. (2000). Electroforesis capilar en el estudio de la oxidación radiolítica del benceno en solución acuosa. Revista de la Sociedad de Química de México **44**, 3, 194-199.
65. Albarrán, G. & Schuler, R. H. (2002). Micellar electrophoretic capillary chromatographic analysis of the products produced in the radiolytic oxidation of toluene and phenol. Radiation Physics and Chemistry **63**, 661-663.
66. Albarrán, G. & Schuler, R. H. (2005). Concerted effects of substituents in the reaction of $\cdot OH$ radicals with aromatics: The cresols. J. Phys. Chem. A **109**, 9363-9370.
67. Chen, X. & Schuler, R. H. (1993). Directing effects of phenyl substitution in the reaction of OH radical with aromatics: The radiolytic hydroxylation of biphenyl. J. Phys Chem. **97**, 421-425.
68. Albarrán G. & Schuler, R. H. (2003). Concerted effects in the reaction of $\cdot OH$ radicals with aromatics: Radiolytic oxidation of salicylic acid. Radiation Physics and Chemistry **67**, 279-285.
69. Klein, G. W., Bhatia, K., Madhavan, V. & Schuler, R. H. (1975). Reaction of $\cdot OH$ with benzoic acid. Isomer distribution in the radical intermediates 1. The Journal of Physical Chemistry **79**, 1767-1774.
70. Harris, D. C. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo* (2ª ed.). Barcelona, España: Reverté.

71. Skoog, D. A., West, D. M. y Holler, F. J. (1997). *Fundamentos de Química Analítica* (4ª ed.). (Vol. 2). España: Reverté.
72. Noa Pérez, M., Pérez Flores, N. A., Díaz González, G. y Vega y León, S. (2005). *Cromatografía de Gases y de Líquidos de Alta Resolución: Aplicación en el análisis de alimentos*. México: Serie Académicos CBS (UAM-Xochimilco) núm. 57.
73. Rizzolo, A. & Polesello, S. (1992). Chromatographic determination of vitamins in foods: Review. Journal of Chromatography **624**, 103-152.
74. Moreno, P. & Salvadó, V. (2000). Determination of eight water -and fat- soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A **870**, 207-215.
75. Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M. & Mariné-Font, A. (1997). Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A **778**, 247-253.
76. Lambert, W. E. & De Leenheer, A. (1992). Quantitative determination of water-soluble vitamins using HPLC. In Nollet, L. M. L. (Ed.), *Food Analysis by HPLC* (pp. 341-369). New York, USA: Marcel Dekker.
77. Wehling, R. L. & Wetzel, D. L. (1984). Simultaneous determination of pyridoxine, riboflavin and thiamine in fortified cereal products by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry **32**, 1326-1331.
78. Esteve, M. J., Farré, R., Frígola, A. & García-Cantabella, J. M. (1998). Determination of vitamin B₆ (pyridoxamine, pyridoxal, pyridoxine) in pork meat and pork meat products by liquid chromatography. Journal of Chromatography A **795**, 383-387.
79. Zweig, G. & Sherma, J. (Eds.). (1976). *Handbook of Chromatography* (Vol. 1). USA: CRC Press.
80. Cruz Zaragoza, E. y García Flores, F. (1999). *Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares* (Inf. Téc. ICN UNAM-UI-I-99).
81. Ramón, V. (2005, Noviembre, 7). Usan irradiación nuclear para conservar alimentos. Gaceta UNAM núm. **3851**, pp. 8-9.
82. Hewlett-Packard (1999). *Specifications Hewlett-Packard 1100 Series: The new standard for value and productivity* (Manual). Germany: Author.
83. Perezgasca, L., Aguirre, M. E. y Negrón-Mendoza, A. (1988). *Dosimetría de la Unidad Gammabeam 651 PT* (2ª parte). (Inf. Téc. Q-01-88). México: UNAM.
84. Jonah, Ch. D. & Madhava Rao, B. S. (Eds.). (2001). *Radiation Chemistry: Present Status and Future Trends*. Studies physical and theoretical chemistry **87**. Netherlands: Elsevier Science.
85. Josimović, L.J., Janković, I. & Jovanović, S. V. (1993). Radiation induced decomposition of tryptophan in the presence of oxygen. Radiat. Phys. Chem. **41**, 6, 835-841.
86. Matloubi, H., Aflaki, F. & Hadjiezadegan, M. (2004). Effect of γ -irradiation on amino acids content of baby proteins. Journal of Food Composition and Analysis **17**, 133-139.

87. Tadera, K., Arima, M., Yoshino S., Yagi, F. & Kobayashi, A. (1986). Conversion of pyridoxine into 6-hydroxypyridoxine by food components, especially ascorbic acid. J. Nutr. Sci. Vitaminol 32, 267-277.
88. Gregory, J. F., III & Leatham, K. (1990). Lack of vitamin B₆ activity of 6-hydroxypyridoxine. Journal of Food Science 55, 4, 1143-1146.