



IPN
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología
Determinación de Vitaminas Hidrosolubles por EC
en fármacos de uso veterinario y suplementos alimenticios



**DTERMINACION Y CUANTIFICACION DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES EN FARMACOS
DE USO VETERINARIO Y SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS POR EL ELECTROFORESIS
CAPILAR.**

**INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACION**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO FARMACÉUTICO**

**PRESENTA:
LEON ESCALANTE LORENA**

DIRECTOR: M. EN C. YOLANDA DE LAS MERCEDES GOMEZ Y GOMEZ

MÉXICO, D.F. MAYO DEL 2008



AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres y maestros por el esfuerzo y apoyo para que una persona como yo no cayera y se dejara vencer.

Agradezco el echo que se me permitiera conocer mas de lo que muchas personas pueden conocer ,

Permitirme ser más inteligente y mas madura para saber sobrellevar las situaciones buenas y malas

Agradezco el apoyo de todas aquellas personas que estuvieron a mi lado en las buenas pero sobretudo en las malas puesto que ahí es donde la gente seda cuenta lo mucho que la aprecian y lo importante que van hacer estas personas durante toda tu vida.

Agradezco a mis amigos que siempre me apoyaron , me hicieron reír, llorar enojarme y demás sentimientos que sólo un amigo te puede brindar

Gracias a todos por permanecer a mi lado.

Att. Lorena



Índice	Paginas
Resumen1
1. Introducción2-16
1.1 Electroforesis capilar2,3
1.2 sistema de Enfriamiento3,4
1.3 Fundamento de EC4
1.4 Componentes básicos de EC5
1.5 Otros tipos de EC6,7
1.6 Velocidad del Analito7,8
1.7Reproducibilidad, Tiempo de Migración y Movilidad8
1.8 Aplicaciones en la Industria Farmacéutica8,9
1.9 Vitaminas Hidrosolubles10-16
2. Objetivos17
2.1 Objetivo General17
2.2 Objetivos Específicos17
3. Justificación17
4. Material Empleado18
5. Método19-21
5.1Preparasion de Soluciones Madre19,20
5.2Condiciones Iniciales20
6.Resultados21-28
7. Discusión de Resultados29-32
8. Conclusiones33
9. Observaciones para el mejoramiento del método33
10.Glosario34-36
11. Anexos



DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES POR EL METODO DE ELECTROFORESIS CAPILAR EN FARMACOS DE USO VETERINARIO Y SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS.

Lorena León Escalante, Yolanda Gómez Gómez *

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología- IPN, ygomezipn@hotmail.com Tel 75296000 Ext 56342

*Palabras clave: Vitaminas hidrosolubles,
Electroforesis capilar.*

Introducción. La electroforesis capilar (CE) es una técnica analítica que utiliza capilares de sílice fundida (de entre 25-100 µm de diámetro interno y 20-80 cm de longitud) junto con altos campos eléctricos (normalmente hasta 1000 V/cm), proporcionando separaciones rápidas y con eficacias elevadas. La electroforesis capilar se puede considerar como una técnica alternativa a la cromatografía de líquidos y entre sus ventajas se pueden citar su gran eficacia, el corto tiempo de análisis y el relativo bajo coste asociado a la técnica y a los reactivos que requiere. Sin embargo, su poca sensibilidad es una de las mayores limitaciones ya que, normalmente, se requieren métodos que permitan alcanzar bajos límites de detección.

VITAMINAS HIDROSOLUBLES. Definición: Vitamina, cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento y, en general, para el buen funcionamiento del organismo. Las vitaminas participan en la formación de hormonas, células sanguíneas, sustancias químicas del sistema nervioso y material genético.

Objetivo: Determinar y cuantificar el Ac. Pantoténico y el Ac. Nicotínico en fármacos de uso veterinario así como suplementos alimenticios.

Método. Las muestras fueron inyectadas a 0.5 psi por 10s, el voltaje de separación fue de 24Kv a 214nm de longitud. El buffer de corrida fue de boratos 30 mM con un pH 8.8. La concentración en los estándares de vitamina fue de 0.1 mg/mL, mientras que para las muestras inyectables varió.

Resultados. Se obtuvo una buena separación de las diferentes vitaminas probadas con el método utilizado. Los tiempos de detección (Td) para cada vitamina se muestran en la tabla 1 al igual que los coeficientes de correlación.

Tabla 1. Tiempo de retención en min. Y áreas (UA)

Nº	Muestra de vitamina	Área (UA)	Tiempo de migración (min.)
1	B1	35163	2.088
2	B12	107630	2.760
3	B6	163542	4.217
4	Ac. Pantoténico	16233	4.799
5	Ac. Nicotínico	292896	5.850

Ya establecidas las condiciones iniciales se realizó la corrida de los facos para poder determinar el Ac. Nicotínico y el Ac. Pantoténico según el fármaco si este lo contiene o no.

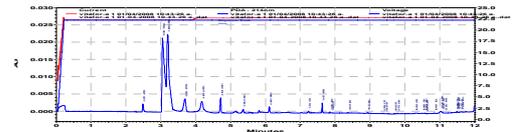


Figura 1. Electroferograma de Vitafort - A

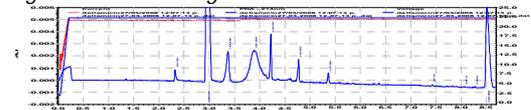


Figura 2. Electroferograma de Deltamicin

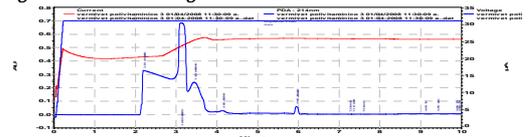


Figura 3. Electroferograma de Vermivet Polivitamínico
 Tabla 2. Concentraciones de Ac. Nicotínico y Ac. Pantoténico en los fármacos y suplementos de uso veterinario.

Fármaco	[mg/ml] de Ac. Pantoténico
Vermivet Polivitamínico	No contiene
Deltamicin	0.03388
Vitafort - A	0.1361
Fármaco	[mg/ml] de Ac. Nicotínico
Vermivet Polivitamínico	0.1306
Deltamicin	0.00298
Vitafort - A	0.03425

En la tabla 2 se muestra las concentraciones en las que se encuentran cada una de las vitaminas ya mencionadas en los diferentes fármacos.

Conclusiones. La metodología establecida es adecuada y óptima para la determinación de las vitaminas hidrosolubles Ac. Pantoténico y Ac. Nicotínico en fármacos de uso veterinario y en suplementos alimenticios, determino y cuantifico las vitaminas Ac. Pantoténico y Ac. Nicotínico por el método de Electroforesis Capilar en fármacos de uso veterinario y Suplementos alimenticios.

Referencias. Jorgenson, J.W. & Lukacs, K.D. (Capillary Zone Electrophoresis." Science 222: 266-272 (1983); Hong-Ji Liu J.Chromatography (1994)610,59,66 S.A. Cohen y K.M.De Antonis J. Chromatography (1994)661,25-34.; Avendaño, C. (Coord.). **Introducción a la química farmacéutica** (3ª reimp.). Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, 1996



1. INTRODUCCION.

1.1. Electroforesis Capilar.

La electroforesis capilar se basa en los mismos principios de las técnicas electroforéticas convencionales, pero utiliza condiciones y tecnología distinta que nos permiten obtener una serie de ventajas al respecto.^{4,1}

La electroforesis capilar (CE) es una técnica analítica que utiliza capilares de sílice fundida (de entre 25-100 μm de diámetro interno y 20-80 cm de longitud) junto con altos campos eléctricos (normalmente hasta 1000 V/cm), proporcionando separaciones rápidas y con eficacias elevadas.^{20,23,28}

La electroforesis capilar se puede considerar como una técnica alternativa a la cromatografía de líquidos y entre sus ventajas se pueden citar su gran eficacia, el corto tiempo de análisis y el relativo bajo coste asociado a la técnica y a los reactivos que requiere. Sin embargo, su poca sensibilidad es una de las mayores limitaciones ya que, normalmente, se requieren métodos que permitan alcanzar bajos límites de detección.^{19,20,23,26}

La causa principal de esta baja sensibilidad es el pequeño volumen de muestra introducido en el capilar, normalmente del orden de pocos nL y, en el caso de la detección espectroscópica, el pequeño camino óptico, que corresponde al diámetro interno del capilar (normalmente 50 o 75 μm). Así, para hacer de la electroforesis capilar una técnica competitiva en términos de sensibilidad, es necesario solventar uno o ambos problemas.^{20,23,26}

Para aumentar el camino óptico se han desarrollado capilares con celdas burbuja (*bubble-cells*) o celdas en forma de Z (*Z-shaped cells*), pero en contraposición, la resolución se ve afectada.^{29,20,27}

Alternativamente, se utilizan detectores más sensibles como la detección fluorimétrica (LIF) o la espectrometría de masas (MS) o los más recientemente desarrollados *charge-coupled device array detectors* (CCD).



Cuando el objetivo es aumentar la cantidad de analito introducida en el capilar, deben utilizarse métodos de preconcentración.^{18,15,23}

Las propuestas más interesantes son aquellas que evitan una manipulación de la muestra, es decir, los métodos en línea. Estos métodos pueden clasificarse en función del mecanismo de preconcentración en electroforéticos o cromatográficos. Éstos últimos son, quizás, los menos utilizados debido a que se necesitan dispositivos especiales, en ocasiones difíciles de acoplar al capilar.^{29,9,16}

La detección en CE se lleva a cabo, en la mayoría de los instrumentos comerciales, mediante absorción de luz ultravioleta-visible (UV-Vis) en el modo *on-column*, es decir, el propio capilar de separación actúa como célula de detección. Aunque los detectores UV-Vis son baratos, fiables y su manejo y mantenimiento es sencillo, poseen una sensibilidad relativamente baja asociada al pequeño paso óptico (el propio diámetro interno del capilar, entre 25 y 100 μm).^{19,21,22,26,20,22}

Otros sistemas de detección utilizados son los basados en la fluorescencia inducida por láser (LIF), espectrometría de masas (MS), y en menor medida, los detectores amperométricos, conductimétricos, radiométricos, de índice de refracción, basados en la espectrometría Raman y en la quimioluminiscencia.^{19,16,23}

La fluorescencia inducida por láser es el tipo de detección más empleado después de la detección por absorción UV-Vis y además, la que mayor sensibilidad proporciona. Sin embargo, su empleo está limitado a aquellos compuestos que contengan grupos fluoróforos o que posean grupos susceptibles de derivatización, si bien es posible su uso también en modo indirecto.^{21,23}

1.2 Sistema de enfriamiento.

El sistema de enfriamiento debe aislar al capilar de los cambios ambientales y disipar el calor generado durante la separación.^{17,16,15}



Existen dos modos de enfriamiento:

- ◆ Utilizando aire, por medio de un ventilador.
- ◆ Empleando un líquido (refrigerante).

La ventaja de esta técnica es que el capilar de silica fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventaja a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la visualización es en línea.^{6,9}

Algunas de las ventajas mas importantes que tiene el equipo de Electroforesis Capilar son:

- Mejor disipación del calor
- Tiempos de análisis cortos
- Detección en continuo
- Automatización (sencillo y rápido)
- Pequeños volúmenes de muestra
- Amplio rango de aplicación

1.3 Fundamento de Electroforesis Capilar.

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo) lo cual permitirá observar por medio de un monitores el comportamiento por medio de una grafica de la sustancia a analizar.^{9,13,16,27,25}

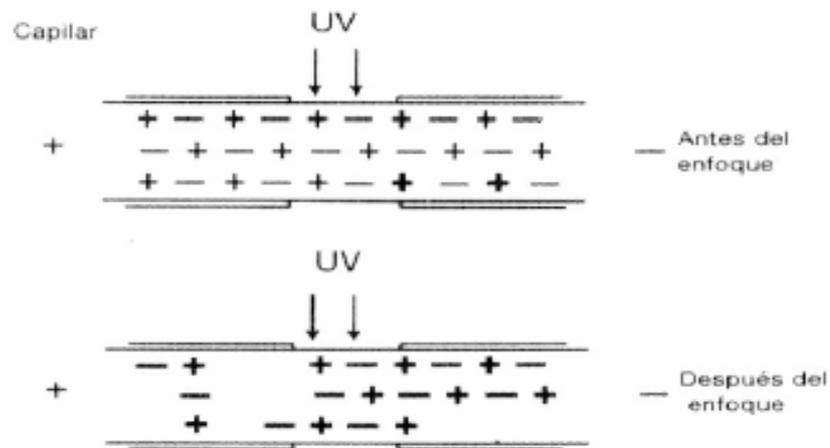
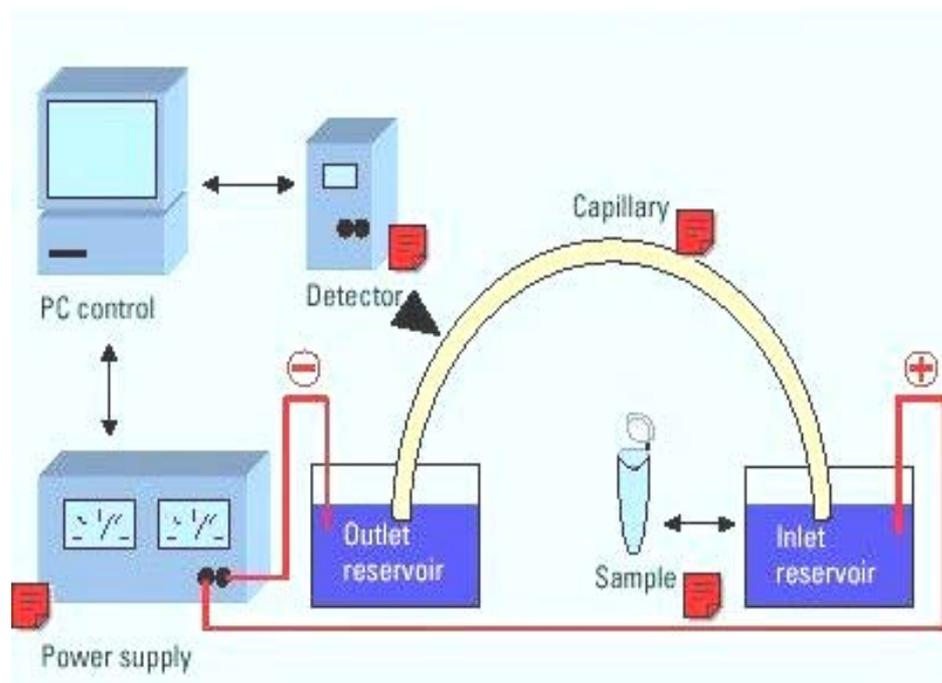


Imagen 1 Enfoque de la muestra en la migración electroforética

En este se podrá observar la longitud de onda a la que se está considerando, tiempo migración, área del gráfico lo cual permitirá ser comparado con datos bibliográficos y observar si este es correcto.^{9,27,24}



1.4. Componentes básicos de la electroforesis capilar



PC control: monitor de cómputo.

Detector: PD.

Power suplí: controlador de voltaje.

Outle Reservoir(-) : viales de salida con dirección del capilar asía el ánodo.

Intle Reservior(+) : viales de entrada con dirección del capilar asía el cátodo.

Capillary: capilar de silica fundida (permitirá la detección de las moléculas a determinar).



1.5 Otros tipos de electroforesis capilar

Electroforesis capilar. Modos.

Existen diversos modos de separación en CE entre los que se encuentran la electroforesis capilar de zona libre (CZE), la electrocromatografía (CEC), la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), la electroforesis capilar en geles o redes poliméricas (CGE), el isoelectroenfoco (CIEF) y la isotacoforesis (CITP). Estas distintas modalidades se diferencian principalmente en la naturaleza del medio de separación que se encuentra dentro del capilar y en las características de los analitos que quieren ser separados.^{26,27,20}

Los modos de CE más adecuados para su acoplamiento con MS son los de zona libre y electrocromatografía ya que son los que pueden utilizar un tampón de separación más compatible con la posterior detección por espectrometría de masas^{22,24,29}

Electroforesis capilar en zona libre (CZE o FSCE).

Además de ser la primera modalidad de electroforesis desarrollada, es hoy en día la más utilizada. En el interior del capilar se encuentra únicamente el tampón de separación. De este modo, al aplicar voltaje, las sustancias con carga, se moverán en el interior del capilar en función de su movilidad, directamente relacionada con su relación carga/masa. Existe un valor óptimo de campo eléctrico a partir del cual se obtendrán los tiempos de análisis más cortos con una eficacia adecuada. A partir de este valor comienzan a aparecer fenómenos relacionados con la generación de calor por efecto Joule disminuyendo la eficacia de la separación. La CZE posee una serie de limitaciones, que en algunos casos se consiguen superar con el empleo de otras modalidades de CE.^{23,24,29}

Entre estas limitaciones hay que destacar que no se van a poder separar compuestos que no presenten carga al pH del tampón de separación. Por otro lado, se pueden producir adsorciones sobre la superficie del capilar de algunas especies generalmente con una densidad de carga positiva elevada (dichas adsorciones van a influir negativamente en el proceso de separación).^{20,21}



Como ya se ha indicado, este modo de electroforesis capilar ha sido el más utilizado en los acoplamientos *on-line* a un espectrómetro de masas. Otros modos de separación por electroforesis capilar tienen sus ventajas específicas en la separación de determinados compuestos como se verá abajo, sin embargo su acoplamiento con un espectrómetro de masas presenta algunas dificultades y limitaciones.^{29,20}

Electrocromatografía (CEC).

Este tipo de CE recibe este nombre debido a su similitud con la cromatografía de líquidos. Al igual que ocurre en MEKC, su desarrollo se debe fundamentalmente a la necesidad de separar por CE compuestos sin carga eléctrica (17). El capilar se rellena de partículas de sílice que pueden estar recubiertas o no de una fase estacionaria. El tampón que actúa de fase móvil, se mueve al aplicar un campo eléctrico, siendo su velocidad proporcional al flujo electroosmótico.^{21,22,26}

1.6 VELOCIDAD DE MIGRACIÓN DEL ANALITO.

♦ **Muestra.**

La naturaleza de los compuestos con carga eléctrica afecta a su velocidad de migración de varias formas, por ejemplo :^{16,22}

- **Carga:** La velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la magnitud de la carga depende del pH.^{20,28}
- **Tamaño:** La velocidad de migración es menor en las moléculas grandes, debido al incremento de las fuerzas de fricción y electrostáticas ejercidas por el medio circundante.^{22,26,24}
- **Forma:** Las moléculas de tamaño similar pero con diferentes formas, tales como las proteínas fibrosas y las globulares, exhiben distintas características migratorias a causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas.^{22,19,20}



◆ **Selección del buffer.**

La sensibilidad del FEO al pH, requiere el uso de un buffer que pueda mantener un pH constante. Los sistemas efectivos de buffer tienen un rango de dos unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa.^{19,27,26}

Un buffer para ser utilizado en EC debe poseer las siguientes características:

Buena capacidad de amortiguación en el rango seleccionado.

Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.

Baja o nula absorbancia a la longitud de onda de detección (cuando aplique).

(Marina, 1994, Pp. 1411-1433; Heiger, 1997, Pp-44 -45)

Clasificación de los sistemas buffer:

Químicos:

Citrato, rangos de pH (2.08 – 5.74)

Acetato, rangos de pH (3.76 – 5.76)

Fosfato, rangos de pH (1.14 – 3.14 / 6.20 – 8.20)

Borato, rangos de pH (8.14 – 10.14)

1.7. Reproducibilidad, tiempo de migración y movilidad.

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes. Esto se refiere a los resultados de estudios entre diferentes analistas, en diferentes días en el mismo laboratorio o diferente laboratorio.^{28,29}

Se pueden obtener buenos valores en los tiempos de migración y en la movilidad; es decir menores a 0.5% DER (desviación estándar relativa). Este valor depende de la condición de la pared capilar, de la composición, del pH y de la viscosidad del buffer, la naturaleza de la muestra, así como la calidad de la instrumentación.^{21,20,26}

El estándar interno de una u otra manera puede ser adicionado a la mezcla de la muestra o puede ser un componente de la muestra original. En ciertos casos el FEO, se observa como un pico negativo debido al desplazamiento del búfer, puede ser una referencia de uso para calcular la movilidad o para usarlo como un estándar interno.^{23,26,24}



1.8 Aplicación en la Industria Farmacéutica.

◆ Industria farmacéutica

El área farmacéutica es uno de los campos de acción donde la electroforesis es muy empleada. Esta técnica se puede utilizar en cada uno de los pasos de producción de los medicamentos: en la caracterización y control de las materias primas, cuantificación de el(los) principio(s) activo(s) a lo largo de todo el proceso de producción (ejem. prueba de disolución) y en el producto final. Además, durante el desarrollo y prueba de nuevos medicamentos y en estudios farmacocinéticos en el monitoreo terapéutico de los principios activos y sus metabolitos y hasta en química forense (Vargas M., 2001, en prensa; Revilla V., 2001, en prensa)

En este proyecto se determino y cuantifico las vitaminas hidrosolubles por el método de electrofóresis capilar, es conveniente conocer un poco sobre las vitaminas hidrosolubles así como sobre el método de electroforesis capilar.^{23,24,25}

Se conoce que en los alimentos se encuentran las fuentes tradicionales de obtención de vitaminas, sin embargo los investigadores continuamente buscan otras fuentes no convencionales para obtener estos componentes indispensables en la dieta.^{15,14,16}

La Association of Official Analytical Chemist ha recomendado la determinación de vitaminas del complejo B mediante métodos microbiológicos, espectrofotométricos y fluorométricos: estas técnicas también han sido sugeridas para la cuantificación de vitaminas en la *Spirulina platenses*. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido la principal vía de análisis de las mezclas de vitaminas. y más recientemente, la electroforesis capilar ha sido empleada para llevar a cabo la separación de mezclas de vitaminas.^{15,23,29}



1.9 VITAMINAS HIDROSOLUBLES.

Definición:

- ❖ Vitamina, cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento y, en general, para el buen funcionamiento del organismo. ^{1,3}
- ❖ Las vitaminas participan en la formación de hormonas, células sanguíneas, sustancias químicas del sistema nervioso y material genético. ^{3,4,2}
- ❖ Por lo general actúan como catalizadores, combinándose con las proteínas para crear metabólicamente enzimas activas que a su vez producen importantes reacciones químicas en todo el cuerpo.²

Estas se clasifican en vitaminas liposolubles y vitaminas hidrosolubles:

- ❖ Las vitaminas hidrosolubles están conformadas por las vitaminas B, como también por la C. ²

Cuadro 1. Vitaminas hidrosolubles, funcionamiento de estas así como fuente de donde se pueden obtener.

Vitamina	Función (interviene en)	Fuente
<u>B1</u>	Participa en el funcionamiento del sistema nervioso. Interviene en el metabolismo de glúcidos y el crecimiento y mantenimiento de la piel.	Carnes, yema de huevo, levaduras, legumbres secas, cereales integrales, frutas secas. 
<u>B2</u>	Metabolismo de proteínas y glúcidos Efectúa una actividad oxigenadora y por ello interviene en la respiración celular, la integridad de la piel, mucosas y el sistema ocular por tanto la vista.	Carnes y lácteos, cereales, levaduras y vegetales verdes 
<u>B3</u>	Metabolismo de proteínas, glúcidos y lípidos Interviene en la circulación sanguínea, el crecimiento, la cadena respiratoria y el sistema nervioso.	Carnes, hígado y riñón, lácteos, huevos, en cereales. 
<u>B6</u>	Metabolismo de proteínas y aminoácidos Formación de glóbulos rojos, células y hormonas. Ayuda al equilibrio del sodio y del potasio.	Yema de huevos, las carnes, el hígado, el riñón, los pescados, los lácteos, granos integrales, levaduras y frutas secas 
<u>B12</u>	Elaboración de células Síntesis de la hemoglobina Sistema nervioso	Sintetizada por el organismo. No presente en vegetales. Si aparece en carnes y lácteos. 

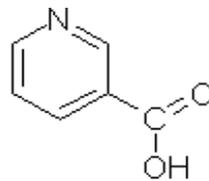


LAS VITAMINAS B

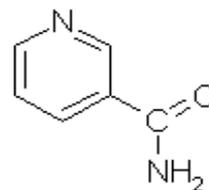
Conocidas también con el nombre de complejo vitamínico B, son sustancias frágiles, solubles en agua, varias de las cuales son sobre todo importantes para metabolizar los hidratos de carbono o glúcidos.^{2,3,6}

Las vitaminas hidrosolubles que se analizaron en este proyecto fueron el Ac. Pantoténico y el Ac. Nicotínico (Niacina o Nicotinamida).^{3,2,10}

Vitamina B3 o Nicotinamida, Niacina, Ac. Nicotínico



Nicotinic Acid



Nicotinamide

Estructura del ac. Nicotínico y la Nicotinamida. Tomado de Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica.

Llamada niacina y en algunos países vitamina PP, la vitamina B3 participa en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas, en la circulación sanguínea y en la cadena respiratoria. Interviene en el crecimiento, funcionamiento del sistema nervioso y el buen estado de la piel.^{7,8,3}

La nicotinamida o vitamina B3, B cuya estructura responde a la amida del ácido nicotínico o niacina, funciona como coenzima para liberar la energía de los nutrientes.^{3,4,5}

La insuficiencia de niacina o ácido nicotínico produce pelagra, cuyo primer síntoma es una erupción parecida a una quemadura solar allá donde la piel queda expuesta a la luz del sol.^{5,9}

En grandes cantidades reduce los niveles de colesterol en la sangre, y ha sido muy utilizada en la prevención y tratamiento de la arteriosclerosis (véase Ateroma).^{3,1}



Funciones^{9,10,3,16}:

- Interviene junto a otras vitaminas del complejo B en la obtención de energía a partir de los glúcidos o hidratos de carbono.
- Mantiene el buen estado del sistema nervioso junto a otras vitaminas del mismo complejo, la piridoxina (B6) y la riboflavina (B2).
- Mejora el sistema circulatorio, permite el perfecto flujo sanguíneo, ya que relaja los vasos sanguíneos otorgándoles elasticidad a los mismos.
- Mantiene la piel sana, junto con otras vitaminas del complejo B, al igual que mantiene sanas las mucosas digestivas.
- Estabiliza la glucosa en sangre.

Vitamina B5 Ac. Pantoténico.



Ácido pantoténico

Ácido pantoténico y Coenzima A (CoA. Tomado de Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica.

El ácido pantoténico es un nutriente hidrosoluble considerado perteneciente al complejo de las vitaminas del grupo B que fue descubierta en 1933 por el Dr. Roger J. Williams a partir del crecimiento de levaduras. Pero fue recién en 1938 que el Dr. Williams pudo aislar la vitamina B5 de células del hígado.^{3,9,12}

Su nombre deriva de la palabra griega pantothen (παντόθεν) que significa "en todas partes". Está presente en la mayoría de los alimentos que comemos. Tiene la ventaja que las bacterias intestinales también la sintetizan, por lo tanto su carencia o deficiencia es casi inexistente. El ácido pantoténico es vital para la síntesis y el mantenimiento de la coenzima A (CoA), componente esencial de numerosos procesos enzimáticos. Trabaja en conjunto con la biotina en varios procesos metabólicos del organismo.^{5,6,2}



IPN

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

Determinación de Vitaminas Hidrosolubles por EC

en fármacos de uso veterinario y suplementos alimenticios



Anteriormente supuesto como vitamina B5, el ácido pantoténico, es necesario para la asimilación de carbohidratos, proteínas y grasas indispensables para la vida celular. ⁴

Se encuentra presente en la mayoría de los alimentos, aunque en mayor proporción en alimentos de origen animal. Por tanto los veganos, o vegetarianos totales tienen mayor posibilidad de padecer su carencia. ^{2,3,4,6}

Funciones. ^{2,3,4,6}:

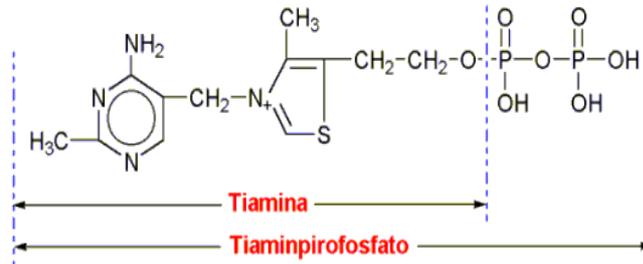
- Forma parte de la Coenzima A.
- Interviene en la síntesis de hormonas antiestrés (adrenalina) en las glándulas suprarrenales, a partir del colesterol. Junto con otras vitaminas del complejo B es utilizada para mejorar y aliviar trastornos ocasionados por el estrés.
- Interviene en el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono y grasas.
- Es necesaria para que nuestro organismo forme los anticuerpos manteniendo al sistema inmune en óptimo estado.
- Es necesaria para la síntesis de hierro.
- Interviene en la formación de insulina.
- Es importante en la obtención de energía de nuestro metabolismo.
- Ayuda a aliviar los síntomas de la artritis.
- Reduce la acidez estomacal junto a la biotina y la tiamina, por lo tanto alivia la gastritis, las úlceras estomacales y demás patologías gástricas.
- Ayuda a disminuir los niveles de colesterol en sangre.
- Mejora algunas afecciones de la piel.
- Ayuda a disminuir los síntomas de la migraña.

Otras vitaminas importantes para la elaboración de este proyecto son ^{4,6,3,1} :

Tiamina o vitamina B1

Piridoxina o vitamina B6

Cobalámína o vitamina B12

**Vitamina B1 o Tiamina.**

La Tiamina pertenece al complejo de Vitaminas B y fué descubierta en 1912. En 1926, por primera vez, fue identificada en su forma pura en un laboratorio por el químico Casimir Funk, y al ser la primera vitamina hidrosoluble del grupo B descubierta fue bautizada B1. ^{1,2,3,6}

Se descubrió cuando se trataba de encontrar la cura a una enfermedad, llamada 'beriberi', descubierta por el holandés Christiaan Eijkman a fines del siglo XIX durante sus años de investigación en la isla de Java. ^{5,3,1}

En aquellas zonas, la alimentación se basaba en el consumo de cereales refinados, y debido a que estos carecen de vitaminas B sus pobladores padecían esta dolencia. ^{2,4}

Como consecuencia de esta enfermedad, ya en el siglo XX, se obligó a la suplementación de vitamina B en estos cereales. En la actualidad, todos los cereales refinados llevan la adición de esta vitamina, y si bien esta enfermedad se considera erradicada, solo puede aparecer en algunos países en vías de desarrollo. ^{5,3}

Funciones. ^{2,3,4,6:}

La tiamina interviene en varios procesos de nuestro metabolismo:

- En la transformación de los alimentos en energía, puesto que las enzimas que intervienen en este proceso metabólico necesitan de Vitamina B.
- La absorción de glucosa por parte del sistema nervioso: es un proceso donde interviene la tiamina, y como consecuencia de su deficiencia, se pueden presentar síntomas como la falta de coordinación y hormigueo en extremidades. Todo ello causado por la degradación de las fibras nerviosas.



IPN

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

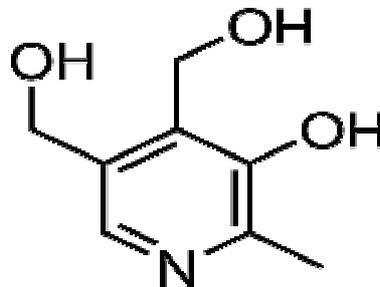
Determinación de Vitaminas Hidrosolubles por EC

en fármacos de uso veterinario y suplementos alimenticios



- Cuando se nombra al sistema nervioso se incluye al cerebro, ya que esta vitamina es esencial para que el mismo pueda absorber la glucosa de manera adecuada. Si así no sucede, pueden aparecer problemas depresivos, cansancio, poca habilidad mental, etc.
- El buen estado de uno de los sentidos como la vista, también depende de la tiamina, para funcionar óptimamente, y así no padecer enfermedades como glaucoma (donde se han detectado niveles muy bajos de esta vitamina).
-

Vitamina B6 o Piridoxina



Piridoxina, piridoxal y piridoxamina. Tomado de Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica.

Se presenta en tres formas: piridoxal, piridoxamina y piridoxina. Esta última, la piridoxina, en su forma activa como piridoxal fosfato, es una coenzima que interviene en múltiples procesos químicos de nuestro cuerpo, la mayoría de los mismos están dirigidos a la síntesis de neurotransmisores.^{3,1,5}

Funciones.^{2,3,4,6:}

- Interviene en la transformación de hidratos de carbono y grasas en energía para el organismo.
- Interviene en el proceso metabólico de las proteínas
- Mejora la circulación general porque disminuye los niveles de homocisteína (aminoácido no esencial que interviene en patologías cardiovasculares)
- Ayuda en el proceso de producción de ácido clorhídrico en el estómago
- Mantiene el sistema nervioso en buen estado
- Mantiene el sistema inmune en perfecto funcionamiento



IPN

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

Determinación de Vitaminas Hidrosolubles por EC
en fármacos de uso veterinario y suplementos alimenticios



- Interviene en la formación de hemoglobina en sangre
- Es fundamental su presencia para la formación de Niacina o vitamina B3
- Ayuda a absorber la vitamina B12 o cobalamina. La piridoxina o vitamina B6 es necesaria para la absorción y el metabolismo de aminoácidos.

También actúa en la utilización de grasas del cuerpo y en la formación de glóbulos rojos o eritrocitos. La insuficiencia de piridoxina se caracteriza por alteraciones en la piel, grietas en la comisura de los labios, lengua depapilada, convulsiones, mareos, náuseas, anemia y cálculos renales (véase Litiasis).^{3,1}

medida, los detectores amperométricos, conductimétricos, radiométricos, de índice de refracción, basados en la espectrometría Raman y en la quimioluminiscencia.

La fluorescencia inducida por láser es el tipo de detección más empleado después de la detección por absorción UV-Vis y además, la que mayor sensibilidad proporciona. Sin embargo, su empleo está limitado a aquellos compuestos que contengan grupos fluoróforos o que posean grupos susceptibles de derivatización, si bien es posible su uso también en modo indirecto.



2.OBJETIVOS

2.1.Objetivo general:

Determinar y cuantificar el Ac. Pantoténico y el Ac. Nicotínico en fármacos de uso veterinario así como suplementos alimenticios.

2.2.Objetivos Específicos:

- ♣ Uso y manejo de un método analítico en la Industria Farmacéutica
- ♣ Desarrollo de un método para la determinación del Ac. Pantoténico y Nicotinamida (Ac. Nicotínico o Niacína) por electroforesis capilar.
- ♣ Cuantificar las vitaminas Ac. Pantoténico y Nicotinamida en fármacos de uso veterinario (, Deltamicín y Vermivet polivitamínico) y en suplementos alimenticios (Vitafor-A).

3. JUSTIFICACION.

En métodos analíticos, la industria farmacéutica es costosa en cuanto a los reactivos que se utilizan para la elaboración de fármacos, se pretende que la mayoría conozcan este método que ahorra tiempo, esfuerzo y dinero ya que a comparación del método que se aplica actualmente que es el HPLC, ya que este requiere de grandes cantidades de reactivos así como el tiempo para obtener resultados es mayor con respecto a los volúmenes y tiempos obtenidos con un equipo de Electroforesis Capilar.

Aplicación de un nuevo método analítico en el área de producción y control de calidad de fármacos y suplementos alimenticios (impurezas de síntesis o productos de degradación).



4. MATERIAL A EMPLEAR.

- ◆ Equipo de Electroforesis Capilar Beckman Coulter P/ACE MDQ,



- ◆ Capilar de silicagel con 60cm de largo con un diámetro interno de 75 micrómetros y un diámetro externo de 200 micrómetros
- ◆ Micro pipetas SOCOREX 100-1000 microlitos
- ◆ Viales de volumen aproximadamente de 1600 microlitos.



- ◆ Vasos p.p.
- ◆ Matraz aforado.
- ◆ Estándar de Vitaminas Hidrosolubles
 1. ac. Pantoténico
 2. ac. Nicotínico,
 3. B12, o Cobalamina
 4. B6 o Piridoxina
 5. B1 o tiamina).
- ◆ Agua HPLC (desionizada)
- ◆ Hidróxido de sodio (NaOH 1N)
- ◆ Ac. Bórico con PM de 61.4844 g/mol.



5.METODO.

Se propuso determinarlas vitaminas hidrosolubles a una longitud de onda de 214 nm , espectro PDA(Detector de diodos), con una corriente máxima de 100micro amperes, 24 KV y con un buffer de boratos a pH de 8.8, con una temperatura para mantener las vitaminas durante su manipulación de 15°C esto usando un capilar de silica de 60cm de largo .

The screenshot shows the PACEAD software interface. The title bar indicates the method is 'LORENAPDA.met' and the data file is 'AC.PANTOTENICO5 CORRECTA.dat'. The main window displays a table of events for the method '1: PDA - 214nm'.

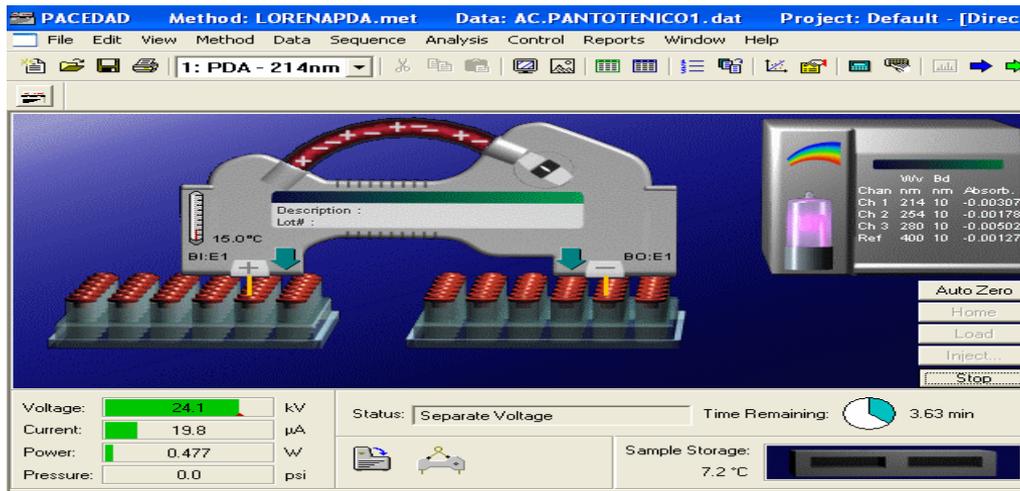
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary
1		Rinse - Pressure	35.0 psi	2.00 min	BI:D1	BO:A1	forward
2		Inject - Pressure	0.5 psi	5.0 sec	BI:F1	BO:A1	Override, forward
3	0.00	Separate - Voltage	24.0 KV	5.00 min	BI:E1	BO:E1	0.17 Min ramp, normal polarity
4	1.00	Autozero					
5	5.00	Stop data					
6							

En esta imagen se muestra la pantalla del programa del equipo de electroforesis capilar donde se propone y guarda el método a emplear para la realización de las lecturas y corridas de los fármacos a analizar.

5.1 Preparación de Soluciones Madres.

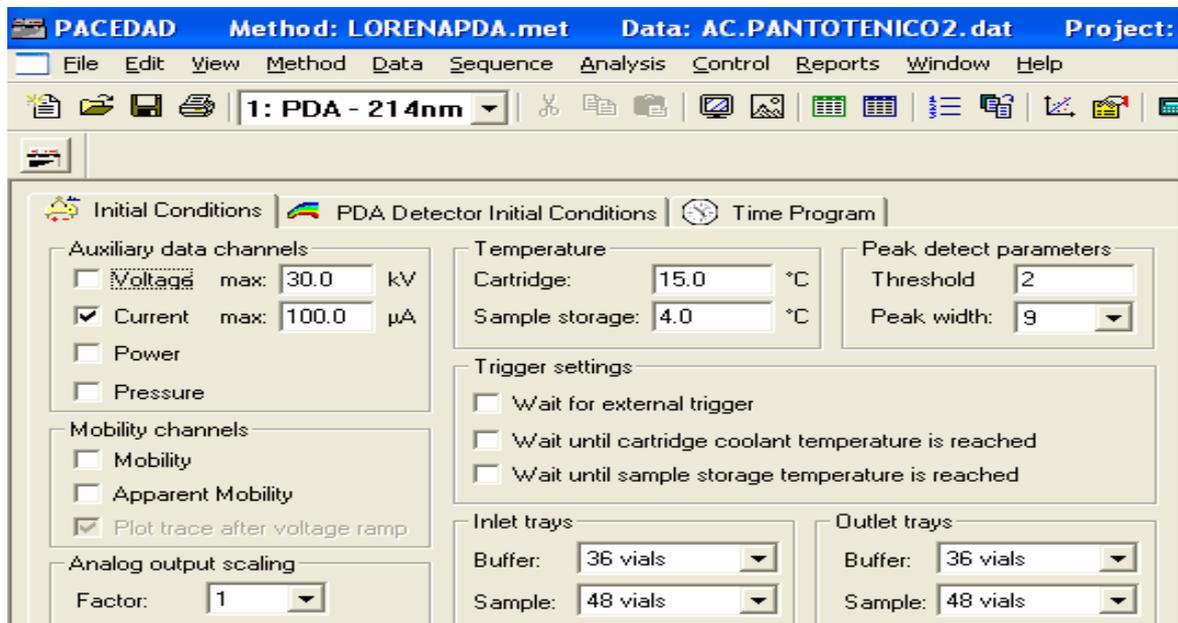
Se prepararon soluciones madres de cada una de las vitaminas con una concentración de 1mg/ml, en agua desionizada.

Para la preparación del buffer de boratos, se pesaron 0.1849g y se diluyeron en 100ml de agua tipo HPLC, este tiene un pH de 4.7 el cual se ajusta a 8.8 con una solución de NaOH 1N.



En esta imagen se muestra el cartucho, capilar lampra y la posición de los viales ; la acción que se genera en el equipo de electroforesis capilar y así como el registro que tiene durante el funcionamiento de este como es el voltaje, la corriente , la temperatura.

5.2CONDICIONES INICIALES



En esta imagen se muestra el voltaje max que se propuso para poder determinar las muestras de vitaminas hidrosolubles Ac. Pantoténico y Ac. Nicotínico que es de 30Kv, la corriente máxima de 100µA, la temperatura de 15°C .



Durante la elaboración del proyecto se ocupó un buffer de boratos con un pH de 8.8 disuelto en agua HPLC y un capilar 60cm de largo, el equipo a emplear es de Electroforesis capilar BECKMAN COULTER.

En otra serie de experimentos se realizaron barridos de ambas vitaminas hidrosolubles para poder determinar la absorbancia de cada uno de ellos y la longitud de onda de cada vitamina.



6.RESULTADOS

Para poder corroborar que la longitud de onda que se propuso en el método para poder determinar las dos vitaminas hidrosolubles de interés (Ac. Pantoténico y Ac. Nicotínico) se realizaron barridos de estas así como de las vitaminas hidrosolubles que conformarían una mezcla que serviría para observar el comportamiento de estas al interactuar con otros principios activos.

Figura 1. Barrido de vitamina B6

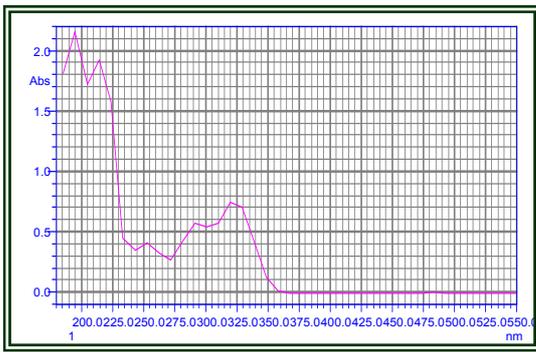
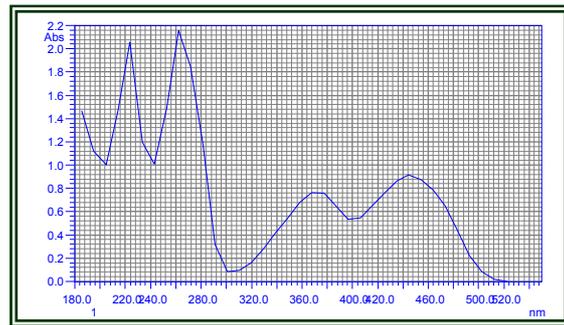


Figura 2. Barrido de vitamina B12



Como se puede observar en la *figura 1* y la *figura 2* las vitaminas B6 y B12 muestran 2 puntos máximos de absorbancia y dos mínimos lo cual permite tener un rango de longitud de onda más amplio, mientras que en la *figura 3* y la *figura 4* solo muestran un pico por lo que el rango de la longitud de onda está limitado al ancho de estos picos de absorbancia detectados en el equipo de UV.

Figura 3. Barrido de Ac. Pantoténico

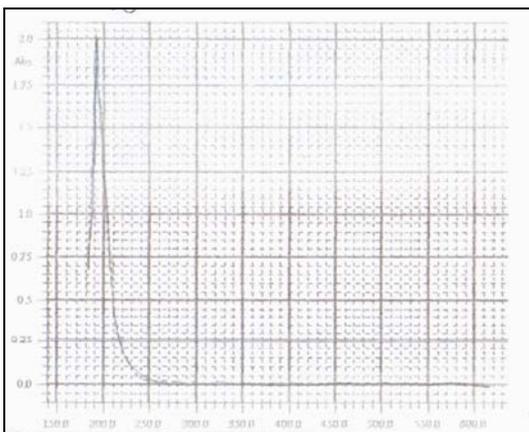
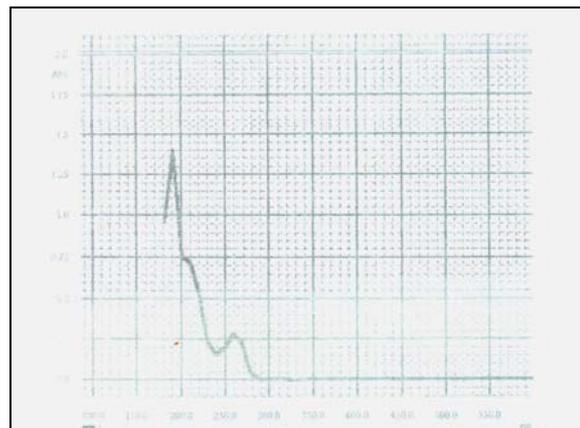


Figura 4. Barrido de Ac. Nicotínico



El realizar los barridos de las diferentes vitaminas hidrosolubles nos permitirá conocer la longitud de onda más adecuada para poder ocupar en el equipo de electroforesis capilar ya que en estos se puede observar los picos con mayor y mejor absorbancia de estas vitaminas hidrosolubles.



Para ambos barridos de las vitaminas AC. Pantoténico y Ac. Nicotínico mostraron una absorbancia de 180 a 220nm en ambos casos.

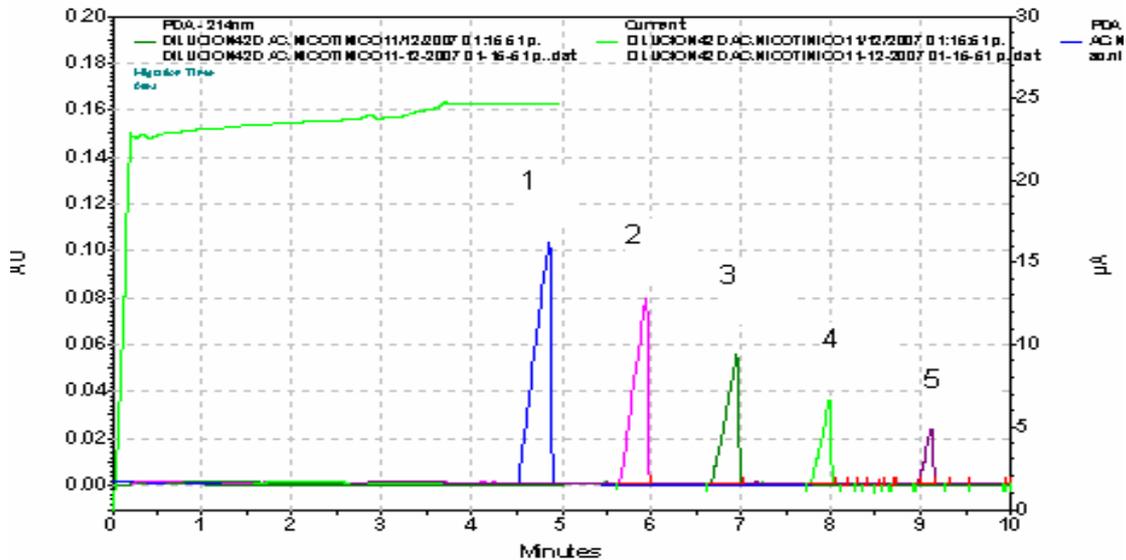


Figura 5. Electroferograma de Ac. Nicotínico y sus diluciones [mg/ml].

En la figura 5 se muestra las curvas que se obtuvieron en el equipo de EC del Ac. Nicotínico y sus diluciones con una corriente de 25 μA y una longitud de onda de 214nm la cual se considero de acuerdo al barrido que se realizo de esta vitamina .

Tabla 1. Datos del Ac. Nicotínico

Nº	Muestra	Concentración (mg/ml)	Área de la 1ª corrida (UA)	Área de la 2ª corrida (UA)	Promedio de área (UA)	Media del tiempo (min)
1	Solución madre	1	2738097.62	1228589	1983343.3	5.923
2	Dilución	0.5	786510	812329	799419.5	5.729
3	Dilución	0.25	530627	528295	529461	6.3415
4	Dilución	0.125	252252	261087	256669.5	6.425
5	Dilución	0.0625	130422	138801	134611.5	6.444

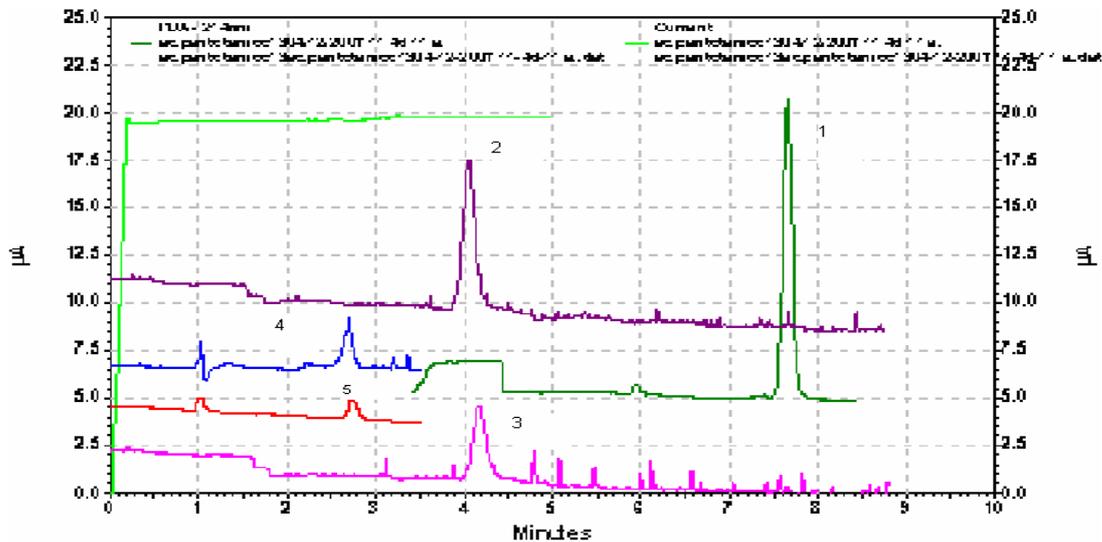


Figura 6. Electroferograma de Ac. Pantoténico y sus diluciones [mg/ml]

En la figura 6 se muestran las curvas que se obtuvieron en el equipo de EC del Ac. Pantoténico y sus diluciones con una corriente de 25 μA y una longitud de onda de 214nm la cual se considero de acuerdo al barrido que se realizo de esta vitamina.

Tabla 2. Datos del Ac. Pantoténico.

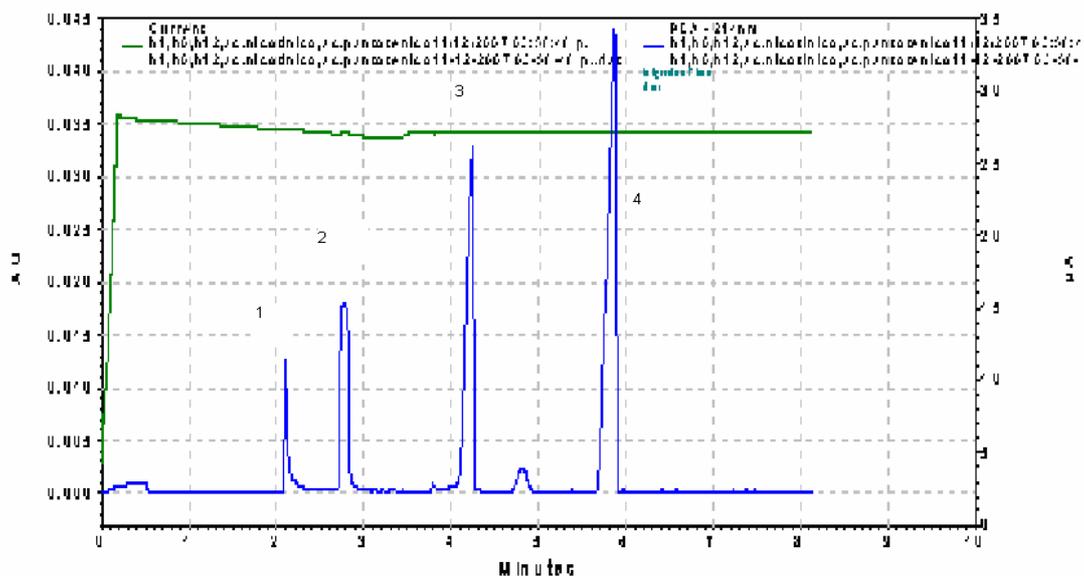
Nº	Muestra	Concentración (mg/ml)	Área de la 1ª corrida (UA)	Área de la 2ª corrida (UA)	Promedio de área (UA)	Media del tiempo (min)
1	Solución madre	1	50758	50937	50847.5	4.2365
2	Dilución	0.5	33507	31557	31117.67	5.3456
3	Dilución	0.25	22964	18045	18404.33	5.386
4	Dilución	0.125	7232	6341	6786.5	4.219
5	Dilución	0.0625	3322	3118	3220	4.2385



Puesto que el principio de separación del equipo de EC es por la carga y tamaño de la muestra o muestras a analizar se realizó una mezcla de vitaminas hidrosolubles para observar el comportamiento que tendría el Ac. Pantoténico y el Ac. Nicotínico. Las vitaminas hidrosolubles que se tomaron para la elaboración de la mezcla a analizar:

- ◆ Vitamina B6
- ◆ Vitamina B12
- ◆ Vitamina B1
- ◆ Ac. Pantoténico
- ◆ Ac. Nicotínico

Figura 7. Electroferograma de la muestra de la mezcla de vitamina Hidrosolubles.



En la figura 7 se muestra el estándar de las vitaminas B1, B6, B12, Ac. Pantoténico, Ac. Nicotínico con una corriente de 25 μA , a una longitud de onda de 214 nm en un buffer de Boratos con una concentración de 30mM y un pH de 8.8

Tabla 3. Datos de la mezcla de vitamina obtenidos del Electroferograma (figura 5).

Nº	Muestra de vitamina	Área (UA)	Tiempo de migración (min.)
1	B1	35163	2.088
2	B12	107630	2.760
3	B6	163542	4.217
4	Ac. Pantoténico	16233	4.799
5	Ac. Nicotínico	292896	5.850



El orden en que se presentan las vitaminas en la tabla 3 es de acuerdo a las corridas que se realizaron previamente para obtener los tiempos en los que se localizan, las vitaminas que conformaron la mezcla.

Grafica 1. Análisis de linealidad del Ac. Nicotínico.

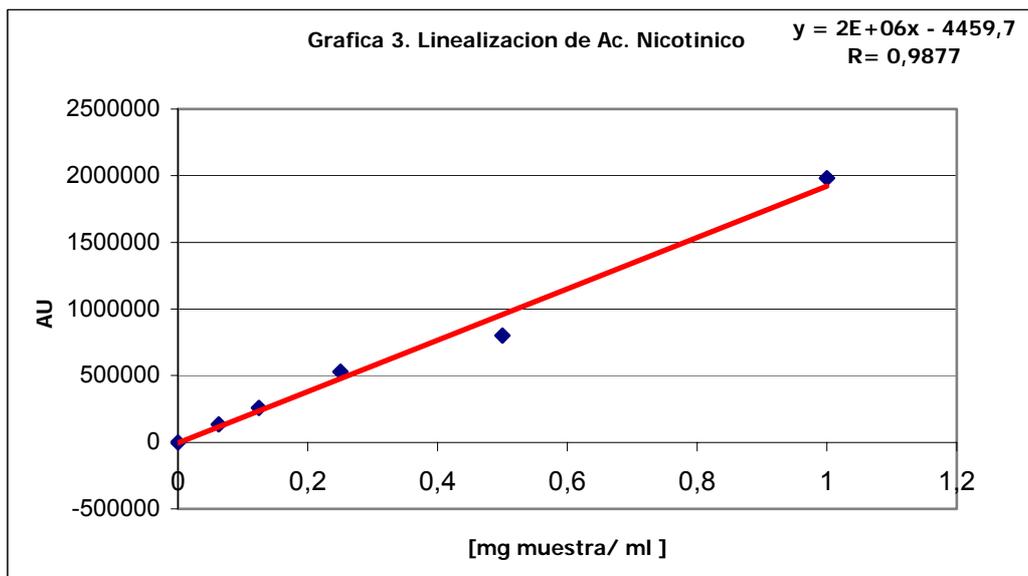


Tabla 4. Datos estadísticos sobre el Ac. Nicotínico

Nº	Muestra	Concentración (mg/ml)	Promedio de área (UA)	Promedio del tiempo de migración (min.)	Desviación estándar σ
1	Solución madre	1	50847.5	4.236	0.816
2	Dilución	0.5	31117.67	5.346	0.828
3	Dilución	0.25	18404.33	5.386	0.834
4	Dilución	0.125	6786.5	4.219	0.827
5	Dilución	0.0625	3220	4.231	0.835



Grafica 2. Análisis de linealidad del Ac. Pantoténico.

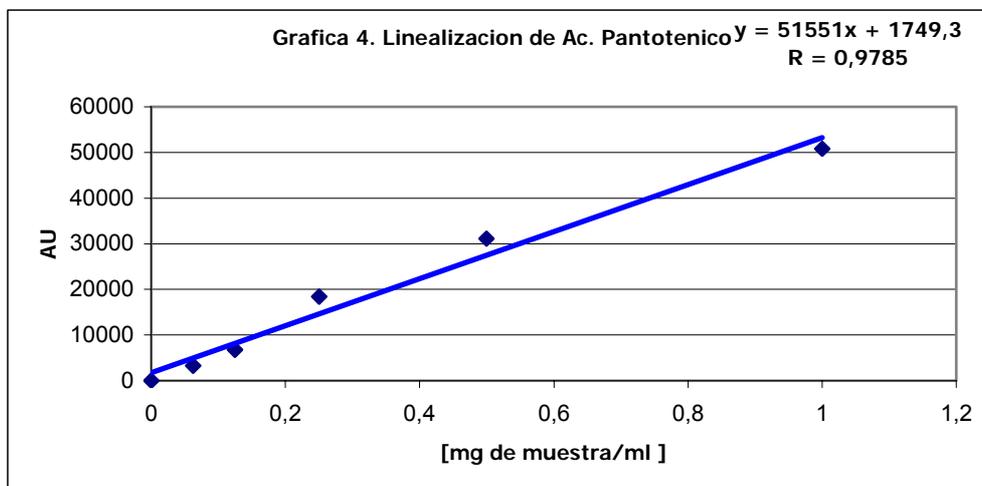


Tabla 5. Datos estadísticos sobre el Ac. Pantoténico

Nº	Muestra	Concentración (mg/ml)	Promedio de área (UA)	Promedio del tiempo de migración (min.)	Desviación estándar σ
1	Solución madre	1	50847.5	4.236	0.816
2	Dilución	0.5	31117.67	5.346	0.828
3	Dilución	0.25	18404.33	5.386	0.834
4	Dilución	0.125	6786.5	4.219	0.827
5	Dilución	0.0625	3220	4.231	0.835

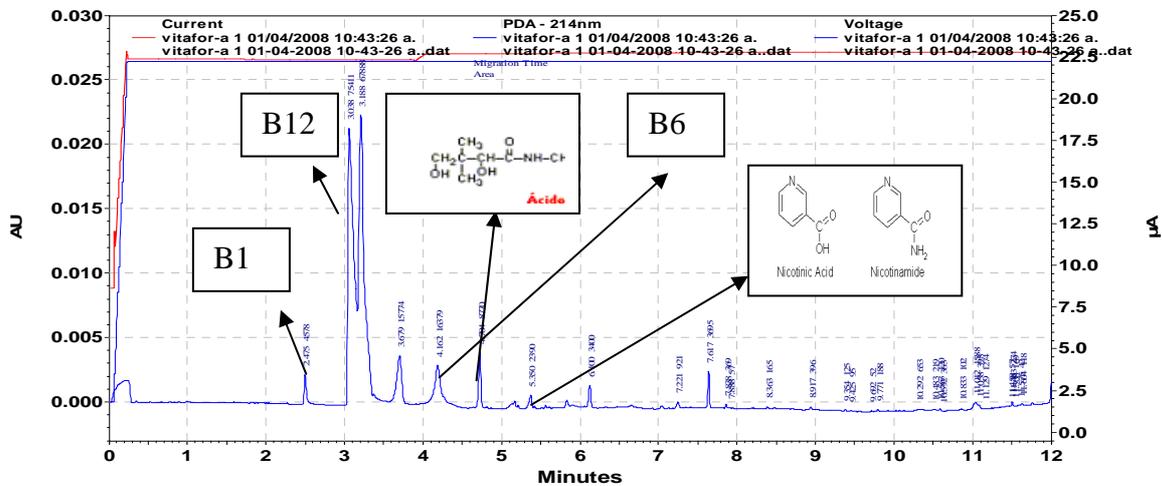


Figura 8. Electroferograma del Vitafort – A de administración oral para aves.

En la figura 8 se muestra el electroferograma del suplemento alimenticio Vitafort – A para aves de administración oral en el cual se indica con estructuras para su mejor identificación el Ac. Nicotínico y el Ac. Pantoténico así como también se señala las vitaminas B6, B1, B12.

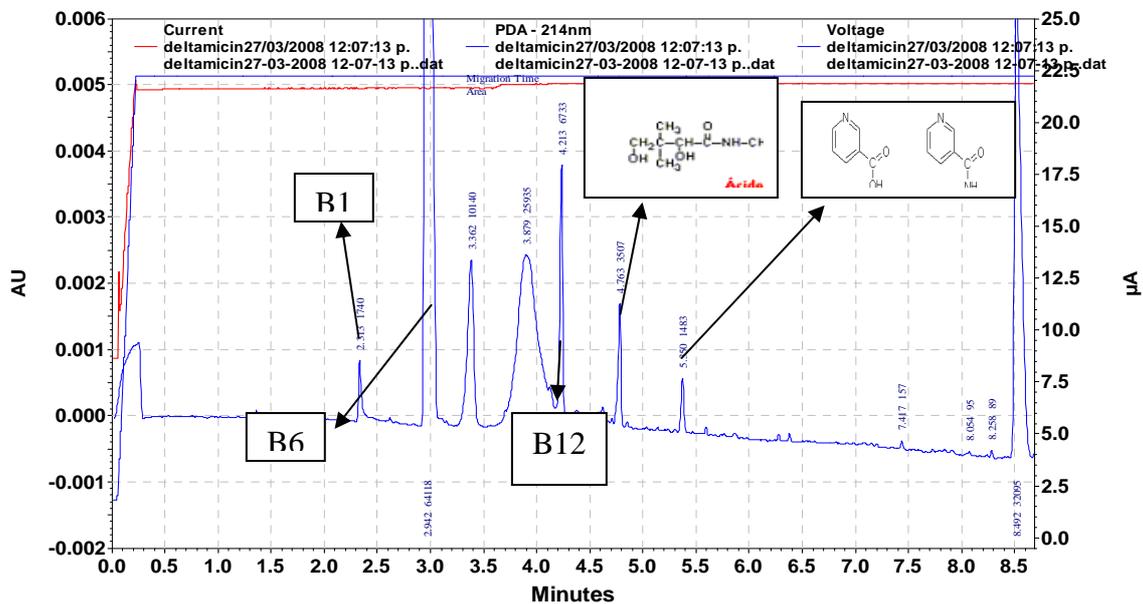


Figura 9. Electroferograma del Deltamicín de administración oral para aves.

En la figura 9 se muestra el electroferograma del fármaco de uso veterinario Deltamicín para aves de administración oral en el cual se indica con estructuras para su mejor identificación el Ac. Nicotínico y el Ac. Pantoténico así como también se señala las vitaminas B6, B1, B12.

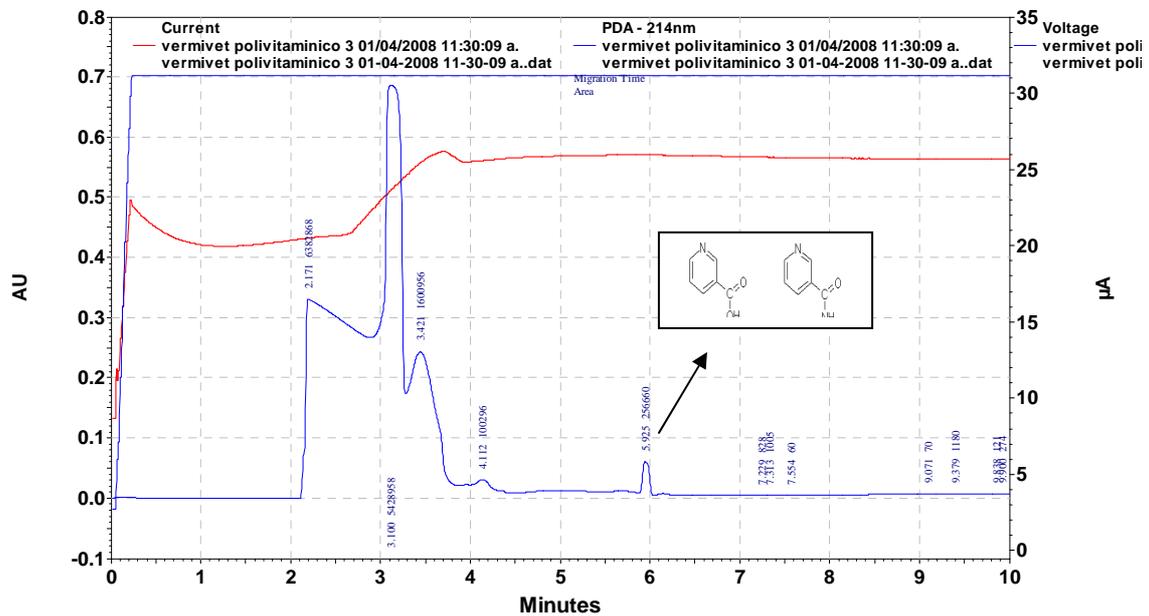


Figura 10. Electroferograma de Vermivet Polivitamínico de uso veterinario para bovinos, equinos y porcinos de administración intramuscular profunda

En la figura 10 se muestra el electroferograma del fármaco de uso veterinario Vermivet Polivitamínico en el cual solo se puede identificar con exactitud el Ac Nicotínico puesto que es el único pico bien definido.



7. Discusión de Resultados

De acuerdo con los art. investigados durante los meses de Junio- Julio el **Ac. Pantoténico y el Ac. Nicotínico** indica que estas se encuentran en un tiempo de 5.75 y 6.51 minutos respectivamente, con una longitud de onda de 200nm y un buffer de ac. Bórico. Journal of Chromatography).

Como se puede observar en la figura 10 la corriente sufrió una variación en su tendencia puesto que esta no es lineal como en los casos anteriores que fue en la figura 8 y la figura 9 esto se debe a que el fármaco como es de aplicación intramuscular profunda tiene una consistencia oleosa por lo que se tomaron 1200 microlitros de la muestra y se mezclaron con 1200 microlitros de ac. Bórico el cual se utilizó como buffer para que este generara una mejora en la tendencia de la línea de la corriente

Como se puede observar en la figura 10 la corriente muestra una curvatura ya que a pesar que se realizó una mezcla del fármaco a analizar y el buffer que permite la separación de las vitaminas para que la corriente no se cayera, esto no fue suficiente pero tuvo una tendencia a incrementar y mantenerse en 25 μ A con una longitud de onda de 214nm.

Esto nos indica que se tendría que proponer un nuevo método en el cual el buffer tendría que contener como disolvente metanol ya que de acuerdo a la bibliografía de las vitaminas liposolubles y sustancias orgánicas estas son solubles en metanol por lo que permitiría la correcta separación de todas las vitaminas que presenta el fármaco y se podría analizar con mayor detalle.

Para comprobar que las vitaminas Ac. Pantoténico , Ac. Nicotínico vitamina B1, B6, B12 son las anteriormente señaladas en las diferentes figuras, con la ecuación de la recta obtenida con las gráficas de linealidad del método para la determinación de vitaminas hidrosolubles en fármacos de uso veterinario y suplementos alimenticios obtenidas, se realizó el cálculo de estas, además que por las medias de los tiempos



mostrados en las diferentes tablas se pudo determinar a simple vista cuales de las vitaminas estaban presentes en cada fármaco.

Ecuación 1. Ac. Pantoténico

$$Y = 51551x + 1749.3$$

$$R = 0.9784$$

Ecuación 2. AC. Nicotínico

$$Y = 2E6x - 4459.7$$

$$R = 0.9877$$

Tabla 6. Datos para el cálculo de la concentración de las vitaminas AC. Pantoténico y Ac. Nicotínico.

Fármaco	Área de AC. Nicotínico	Tiempo de Ac. Nicotínico	Área de AC. Pantoténico	Tiempo de Ac. Pantoténico
Vermivet Polivitamínico	256660	5.923	No contiene	No contiene
Deltamicín	2390	5.350	3496	4.74
Vitafort- A	1501	5.350	8770	4.704

Con estos datos y las ecuaciones de las curvas de linealidad de cada una de las vitaminas (AC. Pantoténico y Ac. Nicotínico) se calculara la concentración en la que se encuentran en cada uno de los fármacos.

De la ecuación 1 se deduce que “Y” corresponderá al área bajo la curva de nuestro pico presentado en los diferentes electroferogramas obtenidos con el equipo de EC y “x” será la concentración en la que se encuentra la vitamina.

$$X = (Y - 1749.3) / 51551$$

Tabla 10. Concentración determinadas de Ac Pantoténico [mg/ml] en los fármacos y suplementos alimenticios.

Fármaco	[mg/ml] de Ac. Pantoténico
Vermivet Polivitamínico	No contiene
Deltamicín	0.03388
Vitafort – A	0.1361



Para la ecuación 2 se realiza el mismo despeje

Tabla 11. Concentración determinadas de Ac Pantoténico [mg/ml] en los fármacos y suplementos alimenticios.

Fármaco	[mg/ml] de Ac. Nicotínico
Vermivet Polivitamínico	0.1306
Deltamicín	0.00298
Vitafort – A	0.03425

Haciendo una comparación de los resultados obtenidos para cada vitamina de interés que son el Ac. Nicotínico y el Ac. Pantoténico con los datos reportados por el laboratorio de cada uno de los fármacos analizados ; se puede observar que en los datos mostrados anteriormente , la concentración de cada fármaco es la reportada por la industria farmacéutica que elaboro dichos fármacos y que estos no muestran contaminación ni excesos de sustancias puesto que los picos mostrados en los electroferogramas de cada fármaco mostraban la cantidad de picos que se podría decir que corresponden a cada sustancia que lo conforma.

Una clara comparación puesto que el suplemento alimenticio y el fármaco tienen la misma forma farmacéutica, o sea, el Vitafort – A y el Deltamicín muestran en su contenido que ambos tienen Ac. Pantoténico el primero 100mg y el segundo 10mg por ello si se observa la tabla 10 la concentración en la que se encuentran tiene una variación de 0.03127 mg / ml ya que el suplemento alimenticio lo contiene en mayor cantidad.

Lo mismo pasa para el Ac. Nicotínico ya que esta se puede comparar entre los 3 fármacos analizados ya que los 3 la contienen, el Vermivet Polivitamínico por ser de administración intramuscular no se tuvo que realizar un filtrado para retirar el exceso de excipientes y mostrar que se encuentra el Ac. Nicotínico en una concentración de



0.12 mg /ml de agua mientras que en los 2 polvos de administración de 0.03425 mg de muestra en 7ml de agua y el Deltamicín 0.000298 mg de muestra / ml de agua.

El haber incluido las vitaminas B1, B12, B6 nos permitió entender un poco mejor el principio o el fundamento del equipo de EC ya que estas al mezclarla con las dos vitaminas hidrosolubles de interés para este proyecto (AC. Pantoténico y AC. Nicotínico) cambiaran la carga parcial con la que se encuentran en su naturaleza propia así como el tamaño de cada molécula permitió ver que tanto podría variar el tiempo de migración de estas vitaminas cuando están mezcladas y cuando se encuentran solas.



8. Conclusiones.

- ◆ La metodología establecida es adecuada y optima para la determinación de las vitaminas hidrosolubles Ac. Pantoténico y AC. Nicotínico en fármacos de uso veterinario y en suplementos alimenticios.

- ◆ Se determino y cuantifico las vitaminas Ac. Pantoténico y Ac. Nicotínico por el método de Electroforesis Capilar en fármacos de uso veterinario y Suplementos alimenticios.

- ◆ El método se podrá aplicar en el área de control de calidad en la industria farmacéutica para el análisis y aseguramiento de materias primas y productos finales.

- ◆ Las condiciones iniciales (pH, Temperatura, longitud de onda, Voltaje, corriente , Pr5esion) establecidos para que la realización de corridas en el equipo de Electroforesis capilar son óptimas y podrán ser utilizados para toda aquella sustancia que se a soluble en agua ya que los tiempos de detección y áreas son muy similares a las reportadas en la bibliografía para el caso de las vitaminas hidrosolubles que se analizaron en este proyecto.

9. observaciones para el mejoramiento del método.

Ya que para fármacos con consistencias oleosas este método no es del todo efectivo se repone que las muestras así como el buffer se disuelvan en metanol ya que este es un solvente orgánico y no afectara si nuestras vitaminas son solubles en agua y permitirá que el tiempo de detección asi como el área se determinen exactamente igual y el método pueda abarcar diferentes tipos de muestras.

Es necesario evaluar los efectos que presentan la temperatura y la luz en los estándares de las vitaminas y en las muestras farmacéuticas, para determinar las condiciones de manipulación, evitando en lo posible una degradación de las vitaminas.



10. Glosario

- ◆ **Medio de soporte:** Entiéndase como medio de soporte el material del cuál está hecho el capilar; se emplean materiales relativamente inertes. La composición específica del medio ejerce varios efectos sobre la velocidad de migración de un compuesto, y la selección de un medio determinado, depende del tipo de muestra que hay que utilizar. En la Electroforesis Clásica se han utilizado como medio de soporte papel, alúmina, lana de vidrio, almidón, agar-agar, gel de sílice y tiras de acetato de celulosa, entre otros.

Actualmente se utilizan capilares hechos con sílice fundida porque posee una excelente transparencia a la radiación UV además de ser química y eléctricamente inertes, flexibles, robustos, y económicos.

Buffer o sistema amortiguado: El buffer determina y estabiliza el pH del medio de soporte, por lo que afecta a la velocidad de migración de los compuestos en diversas formas.

Intensidad de corriente: Entre los electrodos la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del buffer y de la muestra; por lo que la velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente.

La distancia recorrida por los iones será proporcional al periodo de tiempo durante el cuál se ha suministrado la corriente. Por tanto, para asegurar una reproducibilidad máxima, la corriente debe mantenerse constante durante la electroforesis, es decir, debe utilizarse corriente continua

Intensidad de corriente.

Entre los electrodos la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del buffer y de la muestra; por lo que la velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente.

La distancia recorrida por los iones será proporcional al periodo de tiempo durante el cuál se ha suministrado la corriente. Por tanto, para asegurar una reproducibilidad máxima, la corriente debe mantenerse constante durante la electroforesis, es decir, debe utilizarse corriente continua



Voltaje. El voltaje regula la corriente y, por lo tanto, la velocidad de migración es proporcional a la diferencia de potencial existente en el medio de soporte. El gradiente de voltaje generalmente es expresado como $V\text{ cm}^{-1}$ (voltaje aplicado dividido por la longitud del medio de soporte). Los voltajes que se utilizan pueden ser bajos (100-500V) o elevados (500-30,000V), con gradientes hasta de 20 y 200V cm^{-1} , respectivamente.

Los voltajes altos se utilizan, principalmente, para la separación de compuestos de bajo peso molecular.

Electro migración: La electro-migración es la migración de las moléculas bajo la acción de un campo eléctrico aplicado entre los dos electrodos situados cada uno a la extremidad del capilar. Esta migración debería hacerse hacia el cátodo para las moléculas cargadas positivamente y hacia el ánodo para las moléculas cargadas negativamente, las moléculas neutras no deberían estar influenciadas por el campo eléctrico. A este primer fenómeno se superpone el flujo electro-osmótico que se traduce por el desplazamiento del disolvente hacia el cátodo bajo el efecto de un campo eléctrico aplicado en el capilar.

Este desplazamiento se llama también electro-ósmosis. Se debe a la doble capa eléctrica creada en la interfase, superficie del capilar/"tampón", bajo la acción del campo eléctrico y de la naturaleza misma del capilar utilizado. Los grupos silanoles en la superficie del capilar de sílice se ionizan cuanto más el pH del "tampón" es más elevado: $\text{SiOH} + \text{OH}^- \rightarrow \text{SiO}^- + \text{H}_2\text{O}$

Los cationes se atraen preferiblemente, no sólo al nivel de la superficie del capilar (SiO^-), sino también de manera menos intensiva más allá de esta superficie. Resulta una configuración en doble capa a esta interfase sólido/líquido. Cuando un campo eléctrico está aplicado tangencialmente a la interfase, los cationes de la capa migran en dirección del cátodo, arrastrando con ellos las moléculas de disolvente que les rodean. Así el total de la vena líquida se desplaza de la entrada del capilar (ánodo) hacia la salida (cátodo), arrastrando todas las moléculas cualquiera que sea su carga. O sea, cualquiera que sea la carga de las moléculas, todas emigran en dirección del cátodo; pero están separadas en función de la relación carga/tamaño.



IPN

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

Determinación y Cuantificación de Vitaminas Hidrosolubles
en fármacos de uso veterinario y suplementos alimenticios por EC



Tiempo de migración: El tiempo requerido por un analito para migrar hasta el primer

momento de su detección es llamado “tiempo de migración” y esta dado por el cociente de la distancia y la velocidad de migración.

Flujo electroosmótico: El FEO afecta la cantidad de tiempo que los analitos permanecen en el capilar por la influencia del flujo sobre la movilidad del analito. El FEO puede ser alterado por cualquiera de los siguientes parámetros:

La modificación química de la pared capilar, como una alternativa para limitar la adsorción del analito.

El ajuste del pH del electrolito soporte o buffer.

Concentración del buffer.

Adición de surfactantes (a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica).

La adición de solventes orgánicos, los cuáles disminuyen la velocidad del flujo electroosmótico.

La adición de selectores quirales, principalmente ciclodextrinas.



BIBLIOGRAFIA.

1. Avendaño, C. (Coord.). Introducción a la química farmacéutica (3ª reimp.). Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, 1996.
2. Goodman y Gilman (Eds.). Las bases farmacológicas de la conducta. (9ª edición) (Vols. I y II). McGraw-Hill-Interamericana. Méjico, 1996.
3. Ligand Chemical Database, Institute for Chemical Research, Kyoto University.
4. <http://www.genome.ad.jp/>
5. Hong-Ji Liu J.Chromatography (1994)610,59,66
6. S.A. Cohen y K.M.De Antonis J. Chromatography (1994)661,25-34.
7. www.nutricion.com.mx
8. Jorgenson, J.W. & Lukacs, K.D. "Capillary Zone Electrophoresis." Science 222: 266-272 (1983).
9. Castillo-Rodriguez, M., Revilla-Vázquez, A. L., López-Arellano, R., Cervantes, A., 2005. Fundamentos de electroforesis capilar. UNAM. México
10. Artículos de Revisión Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) Rev Cubana Farm v.38 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2004.
11. H.H. Willard, L.L. Merrit Jr., Dean F.A., Settle Jr. *Metodos Instrumentales de análisis*, Grupo editorial Ibero América México D.F. 1991.
12. Artículo Electroforesis Capilar "adaptación de la Conferencia presentada en el congreso CUBRA IV, 1997, San Miguel de Tucuman, Argentina", Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Vol. XXXIII, No. 3, 297- 329, 1997.
13. Reuss F.F. Mam. Soc. Imper, Natural, Moscow, 2(1809). Tiselius A. Trans Faraday Sec. 33(1937)524
14. Heiger D. Healett Packard High Performance Capillary Electrophoresis-France 1992- No 12-5001-6199-E- Prologo J. Jorgensen, USA
15. Lukacs K.D. Jorgenson J. W. Capillary Zone Electrophoresis "Effect of physical parameters on separation efficiency and quantiation" J. High, Res. Chromatogr. 1985, 8, 407-411.



16. Castagnino J. M. Electroforesis en papel Aplicaciones Biologicas y Clinicas Eudebe, 1980."An Introduction to Capillary Electrophoresis a" Bio Rad laboratory Balletin 1701, US/EG pag1-6
17. Heiger D. High Performance Capillary Electrophoresis an Introduction Heullet Packand CMBH pag 45,46 1992
18. Artículo de Principios de Electroforesis Capilar-Espectrometría de Masas:Aplicación al Análisis de Pesticidas *Javier Hernández Borges, Carolina Simó, Alejandro Cifuentes Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid.pag 1-3, 6-9*
19. artículo Métodos de preconcentración *on-line* en electroforesis capilarOscar Núñez¹, Sònia Sentellas²Departamento de Química Analítica. Universidad de BarcelonaMartí i Franquès, 1-11 08028 Barcelonaoscar@apolo.qui.ub.es, 2sonia.sentellas@apolo.qui.ub.es CTA,Vol. 23 (2), 2002 pag 5-12
20. artículo Fundamentos de la Cromatografía de Fluidos Supercríticos y su aplicación en la Tecnología de los AlimentosPilar Ramírez Calvo, Alejandro Ruiz RodríguezÁrea de Tecnología de los AlimentosFacultad de Ciencias. Universidad Autónoma de MadridCarretera Colmenar Km 15, 28049 Madrid pag 4-9
21. artículo **"Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Electroforesis Capilar.Aplicación a Alimentos"** Profesora Doctora Helena Texeira Godoy proveniente del Departamento de Ciencias de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Campinas, FEA-UNICAMP; Doctor Héctor José Boggetti y Doctora Mónica Azucena Nazareno, ambos Profesores Adjuntos de esta Facultad. Pag1,2,3
22. artículo **Análisis de aminoácidos quirales por electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser** *Carolina Simó Ruiz Instituto de Fermentaciones Industriales (C.S.I.C.) Juan de la Cierva, 3 28006 Madrid pag. 2,5,6,8*
23. artículo **"Algo más sobre la palabra "Cromatografía""**J. M. Bueno Marco pag 1,2



24. Merck-Luengo, J. G. Cromatografía y Técnicas Afines (1987) Vol. 8, nº 1 pp. 21-26
25. Bueno, J. M., Modenés, J.; Cromatografía y Técnicas Afines (2000) Vol. 21, nº 2 pp. 43-5
26. Amini, A. Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis. *Electrophoresis*, 2001, 22, 3107-3130 Issaq, H.J. y Chan, K.C. Separation and detection of amino acids and their enantiomers by capillary electrophoresis: A review.
27. *Electrophoresis*, 1995, 16, 467-480. Wan, H. y Blomerg, L.G. Chiral separation of amino acids and peptides by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 43-
28. Capillary electrophoresis in chiral analysis. Chankvetadze. John Wiley & Sons. 1997. Capítulo 2. Krull, I.S., Deyl, Z. y Lingeman, H. General strategies and selection of derivatization reactions for liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, 1994, 659, 1-17 Cromatografía y electroforesis en columna. Dabrio, M.V., Blanch,
29. G.P., Cifuentes, A., Díez-Masa, J.C., de Frutos, M., Herraiz, M., Martínez Castro, I y Sanz Perucha, J. Springer. 2000. Pag. 227