



**Universidad Autónoma de Baja California**

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

**Aplicación de Método Fluorométrico para la  
Cuantificación de Vitamina B1 en un  
Producto Lácteo**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

Presenta

**Michelle Aline Espíndola Ordóñez**

Directora de tesis

**Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo**

Tijuana, B.C.

Junio 2019

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

FOLIO No. 277

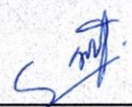
Tijuana, B. C., a 07 de Junio 2019


**C. Michelle Aline Espindola Ordoñez**  
**Pasante de: Maestro en Ciencias**  
**Presente**


El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS

Es propuesto, por la C. Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo,  
Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al  
tema Aplicación de método fluorométrico para la cuantificación de vitamina B1  
en producto lácteo  
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCION
- II.- ANTECEDENTES
- III.- JUSTIFICACION
- IV.- HIPOTESIS
- V.- OBJETIVOS
- VI.- METODOLOGIA
- VII.- RESULTADOS Y DISCUSION
- VIII.- CONCLUSIONES
- IX.- REFERENCIAS
- XI.- ANEXOS

  
Dra. Rocio Alejandra Chávez Santoscoy  
**Sub-Directora**

  
Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo  
**Director de Tesis**

  
Dr. José Luis Vázquez González  
**Director**

## Símbolos y abreviaturas

- ANOVA** Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
- %CV** Porcentaje de coeficiente de variación
- IC** Cromatografía iónica (por sus siglas en inglés)
- IR** Infrarrojo
- FIA** Análisis por inyección en flujo (por sus siglas en inglés)
- gl** Grados de libertad
- IC** Intervalo de confianza
- LC** Límite de cuantificación
- LD** Límite de detección
- n**Tamaño de muestra
- r<sup>2</sup>** Coeficiente de regresión lineal
- r** Coeficiente de correlación lineal
- σ<sup>2</sup>** Varianza
- s** Desviación estándar
- SC** Suma de términos cuadráticos
- UV** Ultravioleta
- UV-Vis** Ultravioleta-visible
- HPLC** Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés)
- μL** Microlitros
- μg** Microgramo
- GC** Cromatografía de gases
- AOAC** Association Of Official Analytical Chemists (Asociación Oficial de Química Analítica)
- pH** Potencial de hidrógeno
- CPS** Cuentas por segundo
- FIU** Intensidad de fluorescencia (por sus siglas en inglés)
- UHT** Temperatura ultra alta (por sus siglas en inglés)

# Contenido de Tesis

## Contenido

Símbolos y abreviaturas .....	2
Contenido de Tesis .....	3
AGRADECIMIENTOS.....	5
DEDICATORIA .....	7
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE ECUACIONES.....	10
RESUMEN.....	11
Resumen.....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1 Vitaminas.....	14
1.2 Función de las vitaminas .....	14
1.3 Clasificación de las vitaminas .....	15
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Tiamina.....	19
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de la tiamina.....	19
2.1.2 Estabilidad .....	20
2.1.4 Recomendaciones de ingesta para tiamina. ....	21
2.1.5 Metabolismo de la tiamina .....	22
2.1.6 Deficiencia de tiamina.....	22
2.1.7 Toxicidad.....	23
2.1.8 Métodos de determinación de Tiamina .....	23
2.2 Leche .....	25
2.3 Contenido de micronutrientes de la leche.....	25
2.4 Estabilidad de los micronutrientes .....	26
2.5 Control de calidad.....	27
2.6 Legislación .....	27
2.7 Fórmula láctea.....	27
2.8 Suero de leche .....	28

2.9 Luminiscencia.....	29
2.9.1 Fluorescencia.....	30
2.9.2 Equipo .....	31
3. JUSTIFICACIÓN .....	35
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivos.....	38
5.1 Objetivo general.....	38
5.2 Objetivos específicos .....	38
6. METODOLOGÍA.....	39
6.1 Método de tiocromo.....	40
6.2 Elaboración de curva de calibración de clorhidrato de tiamina para determinar la estabilidad de la disolución.....	44
6.3 Pretratamiento de muestra.....	44
6.4 Optimización de la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino .....	46
6.5 Determinación de tiamina en muestra de suero de leche (Nutrileche) .....	46
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
7.1 Validación del método.....	61
7.2 Porcentaje de recobro.....	61
7.3 Determinación de la linealidad del método.....	62
6.4 Límite de detección del método (LD) y límite de cuantificación (LC) .....	63
7.4 Determinación de exactitud y repetibilidad del método .....	64
8. CONCLUSIONES .....	65
9.REFERENCIAS .....	69
Referencias.....	70
10. ANEXOS .....	73
10.1MOVILIDAD NACIONAL ESTANCIA .....	74
10.2 XXXI CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA 2018 .....	75

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi mamá por su paciencia y apoyo y por ser mi guía, por no dejarme rendirme, porque siempre me ha apoyado en lo que sea que quiera hacer incondicionalmente, por darme esas palabras de aliento cuando las necesite, cuando llegaba enojada o cansada a la casa, por creer en mí y en mis conocimientos, espero poder hacerte sentir orgullosa de mí, te amo mami.

Agradezco a mi familia a Conchis, Patico, Almis por siempre impulsarme a seguir adelante y apoyarme siempre en mis proyectos, por estar siempre pendiente de mis estudios o lo que sea que decida hacer, a mis sobrinos Fernanda, Miguelito, Alex, y Dieguito por darme inspiración para ser mejor cada día y seguirme esforzando todos los días.

Agradezco a José por haberme apoyado tanto desde que inició este viaje, desde el primer día cuando hice el examen de admisión y use la moneda de la suerte, por ayudarme a no rendirme cuando sentía que no podía más, por ayudarme a levantarme cuando pensaba que no avanzaba, por darme inspiración para ser mejor persona cada día, por escucharme reír y llorar, por ayudarme a dejar mis miedos atrás y por estar siempre para mí.

Agradezco a mi directora de tesis la Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo por todo el apoyo que me ha brindado desde los inicios de mi licenciatura y por haberme aceptado en su laboratorio para poder desarrollar una maestría, gracias por confiar en mí y en mis conocimientos, le agradezco su paciencia cuando tenía que explicarme algo muchas veces, le agradezco por haberme dado esta oportunidad de seguir avanzando profesionalmente, por su confianza y amistad.

Agradezco a la Dra. María del Pilar Haro Vázquez por haber estado a mi lado durante este todo este tiempo, por su paciencia y la confianza, aprendí mucho con usted durante estos dos años y espero poder seguir aprendiendo cada vez más, encontré en usted una gran amiga y una gran maestra tanto profesional como de vida, gracias por la luz que nos brinda todos los días y por ayudarnos con pensamientos positivos siempre. Le doy las gracias por eso y mucho más.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California por haberme aceptado desde que todo esto inicio, por permitirme usar sus instalaciones y por haberme dado a los mejores maestros y amigos.

Agradezco al Director Luis Enrique Palafox Maestre por el apoyo económico para la movilidad estudiantil a la Universidad Nacional Autónoma de México y para el XXXI Congreso Nacional de Química Analítica en el estado de Pachuca, Hidalgo.

Agradezco a CONACYT por el apoyo mensual brindado durante estos dos años sin ustedes no hubiera sido esto posible.

## DEDICATORIA

*Le dedico este trabajo a todas las personas mencionadas en los agradecimientos, los quiero mucho a todos, les doy las gracias por todo lo que han hecho por mí y por ayudarme a seguir creciendo tanto profesional como personalmente, sin todos ustedes esto no hubiera sido posible.*

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.-Cantidad diaria recomendada de las distintas vitaminas de 0-9 años .....	16
Tabla 2.-Cantidad diaria recomendada de vitaminas en adultos.....	16
Tabla 3.- Cantidad diaria recomendada de vitaminas en mayoresde 60 años .....	17
Tabla 4.-Vitamina B1 en mg, expresada en 100g de porción comestible en distintos alimentos (Pérez Ríos y Ruano 2004). .....	21
Tabla 5.- Metodologías sobre cuantificación de vitamina B1 .....	24
Tabla 6.- Reactivos, Materiales y Equipo para la Cuantificación de Tiamina.....	41
Tabla 7.- Descripción de preparación de disoluciones para curva de calibración .....	42
Tabla 8.- Optimización de la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino .....	46
Tabla 9.- Resultados de cuantificación de tiamina en suero de leche utilizando ácido tricloroacético. ....	49
Tabla 10.- Diseño Factorial Mixto 3X2 Con 3 Puntos Centrales .....	51
Tabla 11.- Análisis de varianza (ANOVA) .....	51
Tabla 12.- Resultados de cuantificación de tiamina en suero de leche precipitando con alcohol isopropílico y sales. ....	54
Tabla 13.- Variación de Ferricianuro de potasio alcalino para encontrar el valor mínimo necesario en la cuantificación de tiamina. ....	55
Tabla 14.- Resultados obtenidos de la cuantificación de tiamina utilizando 150 µL de ferricianuro de potasio alcalino y ácido cítrico. ....	57
Tabla 15.- Porcentaje de recobro para la curva estándar utilizada para muestras tratadas con ácido cítrico. ....	61
Tabla 16.- Linealidad del método para curva estándar y muestra tratadas con ácido cítrico .....	62
Tabla 17.- Valores para LD y LC para curva y muestras tratadas con ácido cítrico.....	63
Tabla 18.- Resultados de exactitud y repetibilidad del método .....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vitaminas .....	14
Figura 2. Vitamina A (Retinol) .....	15
Figura 3. Vitamina D .....	15
Figura 4. Estructura química tiamina.....	19
Figura 5. Leche .....	25
Figura 6. Fotoluminiscencia .....	29
Figura 7. Diagrama de fluorescencia .....	30
Figura 8. Diagrama de energía parcial para un sistema fotoluminiscente .....	31
Figura 9. Componentes del espectrofluorómetro .....	32
Figura 10. Componentes del fluorómetro .....	32
Figura 11. Disoluciones de suero de leche fluorescentes .....	39
Figura 12. Reacción de tiamina a tiocromo.....	40
Figura 13. Equipo utilizado para la cuantificación de tiamina .....	42
Figura 14. Reactivos y disoluciones para la cuantificación de tiamina .....	44
Figura 15. Precipitación de proteínas.....	45
Figura 16. Precipitación de proteínas a diferentes temperaturas .....	45
Figura 17. Diagrama de fluorescencia de tiocromo .....	46
Figura 18. Fluorescencia.....	47
Figura 19. Curva Estándar de Tiamina .....	48
Figura 20. Precipitación con ácido tricloroacético.....	49
Figura 21. Resultados de cuantificación de tiamina a diferentes volúmenes de leche.....	50
Figura 22. Precipitación de proteínas con acetonitrilo.....	50
Figura 23. Gráfico de Efectos principales de FIU.....	52
Figura 24. Gráfico de superficie de respuesta.....	52
Figura 25. Precipitación de proteínas con alcohol isopropílico y sales. ....	53
Figura 26. Curva estándar de tiamina sin adición de ácido fosfórico.....	53
Figura 27. Resultados de cuantificación de tiamina a diferentes volúmenes de suero de leche.....	54
Figura 28. Precipitación de proteínas con ácido cítrico.....	55
Figura 29. Efecto de la cantidad de ferricianuro añadido en el cálculo de la concentración de tiamina. ....	56
Figura 30. Curva estándar de tiamina con adición de ácido cítrico.....	56
Figura 31. Resultados de cuantificación de tiamina a diferentes volúmenes de suero de leche .....	57
Figura 32. Espectrofluorómetro Horiba JOBINIVON Modelo NanoLog.....	58
Figura 33. Curva estándar de tiamina utilizando espectrofluorómetro Horiba. ....	59
Figura 34. Espectro de fluorescencia de estándar de clorhidrato de tiamina con ácido cítrico .....	59
Figura 35. Espectro de fluorescencia de muestra de nutrileche.....	60
Figura 36. Espectro de emisión en 3D del producto de oxidación de la tiamina el tiocromo .....	60

## **LISTA DE ECUACIONES**

Ecuación 1 Ecuación de Regresión Lineal Múltiple .....	52
Ecuación 2. Límite de detección .....	63
Ecuación 3. Límite de cuantificación .....	63

# RESUMEN

## Resumen

Esta investigación fue realizada en la Universidad Autónoma de Baja California UABC en el laboratorio de análisis de agua de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

En el presente trabajo se presenta el método de tiocromo para la cuantificación de tiamina, partiendo de una modificación al método descrito en la NOM-247-SSA1-2008 para cereales y sus productos por fluorescencia eliminando el uso de calor, los disolventes o el uso de equipos como HPLC.

Se estandarizaron las condiciones óptimas para la cuantificación de tiamina mediante la formación del tiocromo utilizando ferricianuro alcalino de potasio y un agente precipitante para el pretratamiento de muestras.

El método fue aplicado al suero obtenido del producto lácteo de marca comercial “Nutrileche”, el pretratamiento consistió en precipitar las proteínas utilizando diversos métodos (ácido tricloroacético, alcohol isopropílico y ácido cítrico agregándolo de forma sólida y también en disolución; encontrando a este último como el óptimo, posteriormente se realizó una curva estándar en un intervalo de concentraciones de 100 a 320  $\mu\text{g/L}$ , utilizando 150  $\mu\text{L}$  de ferricianuro de potasio preparado en medio alcalino con el fin de oxidar la tiamina y formar el tiocromo; el producto de reacción obtenido se midió en un fluorómetro modelo Turner Quantech a la longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 430 nm. Los límites de detección y cuantificación para este método son 9.9 y 30  $\mu\text{g/L}$  respectivamente.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Vitaminas

Las vitaminas (Figura 1) son sustancias orgánicas complejas, biológicamente activas y con diversa estructura molecular, que se hallan en pequeñas cantidades en los alimentos y son necesarias para el hombre en pequeñas cantidades, los cuales son llamados micronutrientes. Siendo indispensables para el desarrollo, mantenimiento y el buen funcionamiento del organismo. La mayoría de las vitaminas, con excepción de la D, K, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y el ácido fólico, no son sintetizadas por el organismo, y si lo hacen, las cantidades son insuficientes; por tanto, es necesario su aporte externo (Pérez Ríos y Ruano 2004) (Moliendo Patzi y Carrillo Larico 2014).

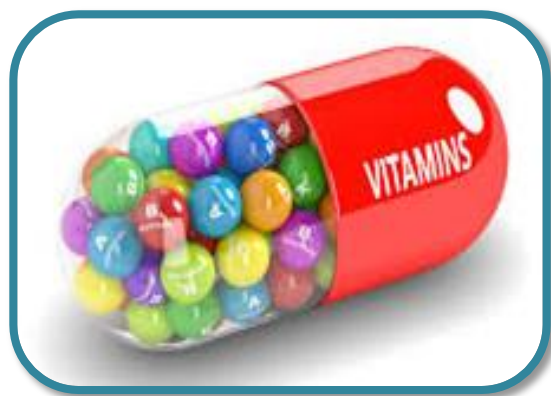


Figura 1. Vitaminas

Cada una de las vitaminas ejerce una función que es única e insustituible en los procesos metabólicos del organismo. Si una de ellas falta, todo el organismo se resiente. Cuando la dieta sea deficitaria de forma regular o cuando se coma menos de lo recomendable, cabe la posibilidad de que el aporte vitamínico sea insuficiente y puedan producirse enfermedades carenciales que sólo se curarán cuando se consuma de nuevo la vitamina implicada. Así, en los países en vías de desarrollo las deficiencias vitamínicas siguen siendo un importante problema de salud (Pérez Ríos y Ruano 2004).

## 1.2 Función de las vitaminas

En las últimas décadas, diferentes pruebas científicas han mostrado que las vitaminas tienen múltiples funciones o actividades biológicas que, además de mantener el funcionamiento normal de nuestro organismo, pueden ser muy útiles para la prevención de determinadas enfermedades (Torrades 2005).

Las vitaminas integradas en el complejo B intervienen como coenzimas de numerosos procesos metabólicos. La B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B6 (piridoxal), B3 (niacina), B5 (ácido pantoteico) y B12 (cobalamina) actúan como coenzimas de

las vías glucolíticas y de oxidación de los ácidos grasos, así como en la respiración mitocondrial (Torrades 2005).

### 1.3 Clasificación de las vitaminas

Generalmente la clasificación de las vitaminas se realiza en función de la solubilidad, y así las dividimos en:

**Liposolubles:** Como su nombre indica son solubles en lípidos (no en agua) y son vehiculizadas, en la mayoría de los casos, en la grasa de los alimentos. Debido a su solubilidad pueden acumularse en los depósitos grasos de los animales y si se consumen en grandes cantidades, pueden alcanzar valores tóxicos, sobre todo la A y la D, por tanto, su ingestión como suplemento al margen de la dieta debe ser recomendada por un médico. En este grupo, aparte de las vitaminas A y D, también se incluyen las vitaminas E y K (Pérez Ríos y Ruano 2004).

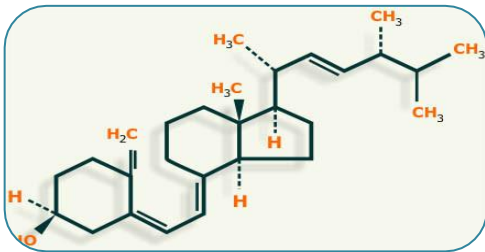


Figura 3. Vitamina D

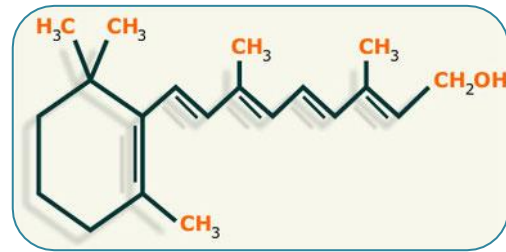


Figura 2. Vitamina A (Retinol)

**Hidrosolubles:** Al contrario de las anteriores, las hidrosolubles son solubles en agua. Aquí se incluyen las vitaminas del grupo B y la vitamina C. Este grupo de vitaminas pierde pronto su valor nutritivo, ya que son destruidas en los procesos de cocción o por acción de la luz solar. Son termolábiles, por eso se pierden parcialmente con los procesos de cocción o elaboración de los alimentos. Para su absorción requieren la intervención de transportadores específicos, por lo que presentan, en general, un máximo de absorción y no suelen mostrar problemas de hiperdosificación (Pérez Ríos y Ruano 2004) (Torrades 2005).

La dosis diaria recomendada de las distintas vitaminas es diferente y está en función de la edad y el sexo. Por tanto, vamos a dividir la población en 3 grupos para así poder reflejar de manera detallada las dosis recomendadas al día.

La dosis diaria recomendada de las distintas vitaminas en edad infantil: de 0 a 9 años (ver tabla 1) (Pérez Ríos y Ruano 2004).

Tabla 1.-Cantidad diaria recomendada de las distintas vitaminas de 0-9 años

<b>Vitamina µg</b>	<b>0-1 Años</b>	<b>1-5 Años</b>	<b>6-9 Años</b>
Vitamina A	450.0	300.0	400.0
Vitamina D	10.0	10.0	5.0
Vitamina E	6.0	6.0-7.0	8.0
<b>Vitamina B1</b>	<b>0.3-0.4</b>	<b>0.5-0.7</b>	<b>0.8</b>
Vitamina B2	0.4-0.6	0.8-1.0	1.2
Vitamina B3	4.0-6.0	8.0-11.0	13.0
Vitamina B6	0.3-0.5	0.7-1.1	1.4
Vitamina B9	40.0-60.0	100.0	100.0
Vitamina B12	0.3	0.9-1.5	1.5
Vitamina C	50.0	55.0	55.0

La dosis diaria recomendada de las distintas vitaminas para la edad adulta: de 10 a 60 años (ver tabla 2) (Pérez Ríos y Ruano 2004).

Tabla 2.-Cantidad diaria recomendada de vitaminas en adultos

<b>Vitamina µg</b>	<b>10-15 Años</b>		<b>16-40 Años</b>		<b>41-60 Años</b>	
	Varón	Mujer	Varón	Mujer	Varón	Mujer
Vitamina A	1000.0	800.0	1000.0	800.0	1000.0	800.0
Vitamina D	5.0	5.0	5.0	5.0	10.0	10.0
Vitamina E	10.0-11.0	10.0-11.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Vitamina k	1 µg por Kg de peso					
<b>Vitamina B1</b>	<b>1.0-1.1</b>	<b>0.9-1.0</b>	<b>1.2</b>	<b>0.9</b>	<b>1.1</b>	<b>0.9-0.8</b>
Vitamina B2	1.5-1.7	1.4-1.5	1.8	1.4	1.7-1.6	1.3-1.2
Vitamina B3	16.0-18.0	15.0-17.0	20	15	19.0-18.0	14.0
Vitamina B6	1.6-2.1	1.6-2.1	2.1-1.8	1.7-1.6	1.8	1.6
Vitamina B9	300.0-400.0	300.0-400.0	400.0	400.0	400.0	400.0
Vitamina B12	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Vitamina C	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0

La dosis diaria recomendada de las distintas vitaminas para la edad para adultos Mayores: de 60 años en adelante (ver tabla 3) (Pérez Ríos y Ruano 2004).

Tabla 3.- Cantidad diaria recomendada de vitaminas en mayoresde 60 años

Vitamina $\mu\text{g}$	60-70 Años		Más de 70 Años	
	Varón	Mujer	Varón	Mujer
Vitamina A	1000.0	900.0	800.0	700.0
Vitamina D	10.0	15.0	10.0	15.0
Vitamina E	10.0	12.0	8.0	10.0
Vitamina k	1 $\mu\text{g}$ por Kg de peso			
<b>Vitamina B1</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>1.1</b>	<b>1.1</b>
Vitamina B2	1.3	1.4	1.2	1.3
Vitamina B3	16.0	16.0	15.0	15.0
Vitamina B6	1.7	1.9	1.7	1.9
Vitamina B9	400.0	400.0	400.0	400.0
Vitamina B12	2.4	3.0	2.4	3.0
Vitamina C	60.0-100.0	60.0-100.0	60.0-100.0	60.0-100.0

## **2. ANTECEDENTES**

## 2.1 Tiamina

En 1926 se aisló la vitamina B1 en forma cristalina. Se sintetizó diez años más tarde, y ahora se utiliza el término tiamina en vez de vitamina B1.

La estructura química de la tiamina fue establecida por J. Williams y colaboradores en 1936 que también la sintetizaron químicamente, aunque había sido aislada inicialmente una década antes por Jansen y Donath. Posteriormente, en 1937, Lohman y Schuster descubrieron que la forma biológicamente activa era el difosfato de tiamina (Deulofeu Piquet 2014)

### 2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de la tiamina

La fórmula química empírica de la tiamina es:  $C_{12}H_{18}N_4OS$ , que siguiendo las normas de nomenclatura química recibe el nombre de 3-(4'-amino-2'-metil-5-pirimidinil-metil)-5-(2-hidroxietil)-4-metiltiazol cloruro monohidrocloruro y su estructura se puede observar en la figura 4. La vitamina en forma libre es una base pero normalmente se aísla y sintetiza como cloruro o mononitrato (Deulofeu Piquet 2013).

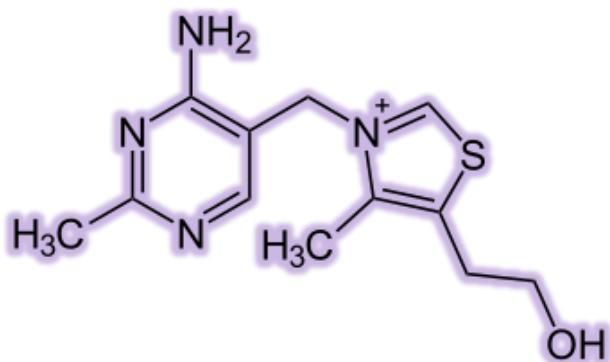


Figura 4. Estructura química tiamina

Es una sustancia cristalina e incolora que recibe los nombres de: vitamina B1, vitamina anti beriberi y neurina (Moliendo Patzi y Carrillo Larico 2014).

La tiamina es una vitamina altamente soluble en agua con solubilidad reducida en alcoholes y una solubilidad insignificante en orgánicos menos polares disolventes como éter, benceno, hexano y cloroformo (Solano 2006).

Comercialmente, está disponible en forma de mononitrato de tiamina o tiamina hidrociorada, con este último marcadamente menos soluble en agua y menos higroscópica.

### **2.1.2 Estabilidad**

La tiamina es una de las vitaminas más inestables. Tiene una estructura de uniones débiles, se descompone con facilidad en un medio alcalino. Se destruye fácilmente por acción del calor, resiste temperaturas de hasta 100°C, pero tiende a destruirse si se calienta en exceso. Es relativamente estable a bajas temperaturas en estado seco y en oscuridad. En solución, son generalmente inestables a temperaturas elevadas o bajo condiciones alcalinas. La tiamina es estable a pH entre 2 y 4 (Pérez Ríos y Ruano 2004).

La tiamina es estable en condiciones ácidas, pero es lábil en condiciones alcalinas con la apertura del anillo de tiazol para producir la forma de tiol. A pH bajo, la tiamina está presente con una carga positiva en el nitrógeno de pirimidina N1  $pK_a = 1$  y 4.8 para el nitrógeno de tiazol N3. A pH fisiológico, la tiamina es un catión con una carga positiva en el tiazol Nitrógeno N3. Con un aumento en el pH, su comportamiento es complejo, pasando a través de una pseudobase intermedia sin carga para producir su forma de tiol cargada negativamente ( $pK_a = 2$  y 9.2) (Edwards, y otros 2017).

Dentro de las funciones atribuidas a esta vitamina destacamos:

- Funcionamiento correcto de los músculos y del sistema nervioso.
- Forma parte de una coenzima que interviene en el metabolismo energético de los hidratos de carbono, las grasas y proteínas (Pérez Ríos y Ruano 2004).

### 2.1.3 Fuentes de tiamina

En la tabla 4 se pueden observar algunos de los alimentos que proporcionan tiamina y su concentración en mg/100g.

Tabla 4.-Vitamina B1 en mg, expresada en 100g de porción comestible en distintos alimentos (Pérez Ríos y Ruano 2004).

Alimentos	Cantidad
Arroz integral	0.3
Avellanas	0.6
Besugo	0.8
Cacahuates	0.6
Castaña	0.2
Chorizo	0.8
Garbanzos	0.4
Guisantes	0.3
Lentejas	0.5
Lomo embuchado	0.8
Lubina	0.8
Naranja	0.1
Nueces	0.48
Pistacho	0.069
Sojaengrano	0.85

### 2.1.4 Recomendaciones de ingesta para tiamina.

Al hablar de las necesidades y recomendaciones de ingesta de tiamina debemos considerar el contenido calórico, carbohidratos y aminoácidos ramificados de la dieta, por ello, en muchas referencias bibliográficas y en las recomendaciones internacionales, se refiere el consumo de tiamina en relación a las calorías ingeridas, si bien, deberían aumentar si aumentamos los aportes en carbohidratos. En Estados Unidos las recomendaciones de ingesta diaria para adultos y niños son de 1.9  $\mu\text{mol}/1000 \text{ Kcal}$ , (0.5 mg/1000 Kcal) mientras que para niños de edad inferior a 6 años, es de 1.5  $\mu\text{Mol}/1000 \text{ Kcal}$ , mientras que la OMS y la FAO

recomiendan consumir 0.4 mg por cada 1000 kcal de ingesta, para la mayoría de las personas. En el embarazo se recomienda un aporte extra de 1.5  $\mu\text{mol}/\text{día}$ , (0.5 mg/día). Aporte extra que se recomienda mantener también durante la lactancia para garantizar un buen contenido en tiamina de la leche. En personas de edad avanzada, de 65 años en adelante, se consideran cumplidas sus necesidades con aportes de 1.2 mg/día en hombres y de 1.0 mg/día en mujeres, pues no se ha observado disminución de la eficacia de la absorción de esta vitamina al contrario de lo que ocurre con otras (Deulofeu Piquet 2014).

### **2.1.5 Metabolismo de la tiamina**

La tiamina es absorbida a nivel del intestino delgado mediante un proceso de transporte activo cuando la ingesta es mínima. La vida media de la tiamina en el cuerpo es de 9 a 18 días. La falta de almacenamiento y la relativamente corta vida media hace que sean necesarios los aportes nutricionales continuos para mantener un buen estatus en esta vitamina especialmente en ancianos, por el contrario cuando el consumo de alimentos que contienen esta vitamina es mayor, la absorción se produce por transporte pasivo. Se metaboliza por un proceso de fosforilación en la mucosa yeyunal, llega al hígado a través de la vena porta. Estudios recientes demuestran que las formas liposolubles de la vitamina son más fácilmente absorbibles que las formas clásicas hidrosolubles como los hidroclouros. Se almacena principalmente en el músculo esquelético, también en el corazón, riñones, hígado y tejido nervioso. La tiamina se degrada a pirimidina y tiazol, y se elimina por medio de la orina. Además en la orina se identifican entre 25 y 30 productos de su degradación (Moliendo Patzi y Carrillo Larico 2014) (Deulofeu Piquet 2014).

### **2.1.6 Deficiencia de tiamina**

La deficiencia de esta vitamina es poco frecuente en los países subdesarrollados, si bien aún existen casos en el mundo desarrollado de una afección conocida con el nombre de Beri-beri. Ésta es una enfermedad que provoca alteraciones

neurológicas, debilidad muscular y trastornos cardíacos que pueden conducir a la muerte.

La encefalopatía Wernicke-Korsakoff es una enfermedad provocada por la carencia de tiamina cuya causa principal es el alcoholismo crónico, a pesar de que pueden producirlo deficiencias vitamínicas secundarias a otras causas. Se caracteriza por la triada clínica de oftalmoplejía, confusión y ataxia (Saad Lapka y Llorens 2015). Su deficiencia en la población de los países desarrollados está ligada al alcoholismo crónico, ya que en este caso está aumentada la excreción urinaria de esta vitamina, y al tabaquismo, ya que se produce una reducción en la capacidad de asimilación de esta vitamina (Pérez Ríos y Ruano 2004). La escasez de esta vitamina produce irritabilidad, falta de concentración y de memoria, y puede ser causa de depresión (Vilaplana i Batalla 2016).

### **2.1.7 Toxicidad**

Efecto colateral por exceso de ingesta de tiamina es de trastornos gástricos (Torrades 2005). Un consumo excesivo de alimentos dulces (azúcar, chocolate, bollería, repostería) puede reducir las reservas de vitaminas B1, y esta es una de las razones por la que conviene moderar el consumo de estos alimentos. El exceso del consumo de alimentos que contienen esta vitamina no suele ser tóxico, y tiene un requerimiento mínimo diario de 0.5mg/1000 Kcal (Moliendo Patzi y Carrillo Larico 2014).

### **2.1.8 Métodos de determinación de Tiamina**

Métodos analíticos basados en la química de la tiamina toman ventaja de la carga cationica a través del intercambio de iones para la detección de técnicas de aislamiento y separación que dependen de su actividad en el rango de UV capacidad de ser oxidado y detectado a través de fluorescencia, quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia, aunque la tiamina intacta es altamente soluble en agua, la división química o bioquímica en el puente de metileno permite una posterior extracción del 4-metil-5- (2-hidroxietil) tiazol menos polar fragmentar en disolventes orgánicos antes del análisis GC o cuantificación

por centelleo contando si el fragmento de tiazol está radiomarcado. Algunos de estos metodos se puede observar en la tabla 5. Los métodos basados en la biología se aprovechan de la papel de la tiamina como una vitamina esencial para el crecimiento de muchos microorganismos (Edwards, y otros 2017).

Tabla 5.- Metodologías sobre cuantificación de vitamina B1

Año de publicación	Metodología	Matriz	Reacción	Referencia
1998	Reacción fotoquímica en línea de inyección de flujo acoplada a espectrofluorimetría	Suero y farmacos	Oxidación con ferricianuro	(Chen, y otros 1998)
2007	Espectrofluorometría	Extracto de <i>Brassicaoleraceagongylodes</i>	Tiocromo enzimatico	(Amjadi, Manzoori y Orooji 2007)
2008	HPLC/detector de fluorescencia	Muestras alimenticias	Oxidación con ferricianuro	(Rubaj, y otros 2008)
2008	Espectrofluorometría	Tabletas	Oxidación catalítica enzimática	(Khan, y otros 2008)
2012	DLLME/ detector de fluorescencia	Alimentos	Oxidación con ferricianuro	(Viñas, y otros 2011)
2015	Método fluorométrico	Estándar de H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub>	Oxidación con oro	(Yu, Ching y Tan 2015)

La elección del método usualmente depende de la sensibilidad y la interferencia que se encuentre en la muestra. En años recientes se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de varios componentes incluyendo las vitaminas (Bueno Solano 2006).

Actualmente, la síntesis de las vitaminas se realiza sin problemas partiendo de sustancias químicas puras, sometidas a reacciones particulares y bajo la acción de agentes físicos y químicos. El manual de la AOAC, usado para la estimación de vitaminas hidrosolubles emplea procedimientos de extracción y reacciones químicas, seguidos de métodos fluorométricos, espectrofotométricos y

microbiológicos, Swan-Choo (1996) y Li (2006) mencionan otros métodos de identificación como son de absorción atómica, electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta resolución.

Siong (1996) mencionan que los métodos empleados por la AOAC con tediosos y requieren de mucho tiempo, además, pueden ser no satisfactorios por la interferencia causada por otros componentes de la muestra (Bueno Solano 2006).

## 2.2 Leche



Figura 5. Leche

La leche, figura 5, es uno de los alimentos más nutritivos, contribuye a la ingesta calórica diaria total. Tal como sale de la vaca la leche, es un alimento compuesto principalmente de agua (entre 85 y 89%) y sólidos como los ácidos grasos esenciales, inmunoglobulinas, proteínas de alta calidad que proporcionan los diez aminoácidos esenciales, lactosa y minerales (calcio, fósforo, zinc y magnesio, entre otros). Contiene también vitaminas A, D y del grupo B, especialmente B2, B1, B6 y B12. La leche se comercializa en dos formas principales: leche líquida y leche en polvo o deshidratada, (PROFECO 2004), (USAID 1997-1999)

## 2.3 Contenido de micronutrientes de la leche

El perfil de micronutrientes de la leche entera muestra que ésta es una fuente excelente de calcio y vitamina B2, una buena fuente de vitamina A, y una fuente aceptable de vitamina D, proporcionando 26 a 40%, 23 a 52%, 10 a 24%, y alrededor del 5% de la ingesta diaria recomendada (IDR) de los Estados Unidos, respectivamente, por porción de 250 mL.

La mayor parte de la leche para consumo humano es tratada con calor para prevenir riesgos de salud pública causados por microorganismos patógenos presentes en la leche cruda. Los tratamientos industriales con calor habituales para la leche líquida incluyen la pasteurización, tratamiento ultra térmico o con temperatura ultra alta conocido por su sigla en inglés, UHT, y la esterilización.

Estos procesos industriales destruyen algunos nutrientes, especialmente las vitaminas que están presentes naturalmente en la leche, y la magnitud de las pérdidas depende del nutriente y el método de procesamiento usado. Sin embargo, los nutrientes destruidos durante el procesamiento se pueden reemplazar mediante la fortificación de la leche. Los niveles a los cuales se agregan los nutrientes a la leche dependen de muchos factores, incluidos los niveles de consumo de leche y los requerimientos nutricionales de la población objetivo; el efecto de los nutrientes que se agregan sobre las propiedades organolépticas (olor, sabor y color) de la leche; y la estabilidad de los nutrientes durante el procesamiento y almacenamiento de la leche. La leche líquida, especialmente la leche descremada, debería ser fortificada por lo menos con las vitaminas A y D, en cantidades de 5.000  $\mu\text{L}$  y 500  $\mu\text{L}$ , respectivamente. A esos niveles de fortificación, una porción de 100 ml de leche proporcionará 21 a 38% de la IDR en los Estados Unidos para la vitamina A (1330 a 2330 UI) y 13% de la IDR de Estados Unidos para la vitamina D (400  $\mu\text{L}$ ) para niños de entre 1 y 10 años. Se pueden agregar además otros nutrientes según sea necesario (Fortification Basics USAID 1963).

## **2.4 Estabilidad de los micronutrientes**

Las vitaminas presentan diferentes grados de sensibilidad al calor, la luz y la humedad, como también, a los agentes oxidantes y reductores. La mayoría de las vitaminas y de los minerales presentan una retención de entre 70 y 100% después de un único tratamiento térmico industrial común. Sin embargo, la repetición de los tratamientos con calor puede producir una pérdida considerable. Además, la mayoría de los nutrientes contenidos en la leche líquida permanecen estables durante el almacenamiento. La leche en polvo entera, fortificada, almacenada a temperatura ambiente por 24 meses conserva entre el 90 y 100% de las vitaminas B1, B2, B6, C, E y niacina agregadas, durante dicho período de almacenamiento. Sin embargo, se puede producir una pérdida significativa de vitamina A, con niveles de retención de entre 55 y 75% después de 5 meses y sólo 35 a 45% después de 24 meses de almacenamiento. Por lo tanto, los micronutrientes

agregados a la leche se pueden destruir durante el procesamiento térmico normal y el almacenamiento de la leche. Para compensar estas pérdidas, se debe agregar un exceso de cada micronutriente durante la fortificación. Las pérdidas que sufre la leche durante el almacenamiento varían con el tiempo, la temperatura, humedad y exposición a la luz, y deberían ser determinadas en forma local (USAID 1997-1999).

## **2.5 Control de calidad**

En leche los métodos cuantitativos para otros micronutrientes incluyen el método fluorométrico para las vitaminas B1 y B2, y el método espectrofotométrico para los minerales, incluidos el hierro y el calcio (USAID 1997-1999)

## **2.6 Legislación**

Varios países han establecido la fortificación obligatoria de la leche desde principios de siglo. Además, varios otros países voluntariamente agregan micronutrientes a la leche, particularmente a la leche líquida semidescremada o descremada, y a las leches en polvo (USAID 1997-1999).

## **2.7 Fórmula láctea**

Para evitar que los consumidores confundan los productos que son propiamente leche con los que no lo son, la NOM -155- SCFI-2003 incluye las características de las fórmulas lácteas y de los productos lácteos combinados. Su diferencia principal con la leche es la menor cantidad de proteínas propias de leche que contienen. Para su correcta identificación, estos productos deben señalar claramente su denominación en el envase, y desde luego no pueden denominarse leche ni sugerir que lo son. Si adicionan grasa vegetal, deben usar la denominación “formula láctea con grasa vegetal” o “producto lácteo combinado con grasa vegetal”, además de declarar sus contenidos de grasa y proteína. La clasificación de “entera”, “parcialmente descremada” o “descremada” no está considerada para ellos.

De acuerdo con la normatividad, la fórmula láctea es un producto que debe elaborarse a partir de los ingredientes propios de la leche (caseína, lacto sueros, grasa y agua). A diferencia de la leche, que debe contener al menos 30 gramos por litro de proteína de la leche, una fórmula láctea puede tener tan sólo 22 gramos por litro. Asimismo, el contenido de lactosa debe ser no menor a 55 gramos por litro. Por otro lado, el producto lácteo combinado puede tener un contenido proteínico aún más bajo: un mínimo de 15 gramos por litro de proteína propia de la leche. En todos los casos, al menos el 70% de estas proteínas deben ser caseína (PROFECO 2004).

## **2.8 Suero de leche**

El suero de leche es el líquido claro de color amarillo verdoso, color debido al pigmento de la lactoflavina o vitamina B2, que resulta de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Otro mecanismo de precipitación de proteínas es mediante la adición de ácidos como clorhídrico, sulfúrico o acético. Tiene una densidad un poco superior a la densidad del agua. Algunas aplicaciones del suero de leche en alimentos son: en panadería, quesos, bebidas, postres, confitería, productos cárnicos entre otros utilizado para incrementar el valor nutricional del alimento, funciona como emulgente, gelificante, mejora la consistencia de los alimentos, mejora solubilidad, mejora viscosidad, mejora estabilidad coloidal etc. (Saad Lapka y Llorens 2015) (Herdandez-Rojas y Vélez-Ruiz 2014) .Frecuentemente posee todos los componentes de la leche con excepción de la caseína y un poco menos de grasa, posee un sabor ligeramente ácido. Contiene entre el 6% y el 6.4% del extracto seco, es decir, la mitad de la materia seca de la leche. La composición del suero de leche varía dependiendo de las características de la leche, pero en términos generales se puede decir que el suero contiene 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas, 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y 93.1% de agua. Aproximadamente el 70% del nitrógeno total (proteína cruda) corresponde a proteína verdadera, la cual tiene un valor nutritivo superior al de la caseína, y está compuesta por la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactoalbumina, las inmunoglobulinas, la proteosa-peptona y las enzimas

nativas; el resto lo forman aminoácidos, urea, creatina, amoniaco y ácidos nucleicos (Herdandez-Rojas y Vélez-Ruiz 2014).

## 2.9 Luminiscencia

La emisión luminiscente ocurre como resultado de una transición electrónica radiactiva, en la cual un electrón pasa de un nivel de energía mayor a uno más bajo. La diferencia en energía es emitida en forma de un fotón. Previamente a la emisión, el electrón fue excitado a un nivel de energía mayor por algún método de excitación. La luz emitida por el material es de una longitud de onda mayor a la incidente (ley de Stokes). La longitud de onda de la luz emitida es característica de cada material.

Existen distintos fenómenos de luminiscencia, los cuales reciben nombres dependiendo del tipo de excitación de la que se absorbe energía. Algunos ejemplos de estos son la bioluminiscente (reacciones bioquímicas), catodoluminiscencia (catódicos), quimioluminiscencia (reacciones químicas), electroluminiscencia (campo eléctrico), piezoluminiscencia (presión), radioluminiscencia (radiación ionizante), fotoluminiscencia (por medio de luz visible o ultravioleta), termoluminiscencia (por la liberación térmica de energía almacenada en un sólido previamente excitado con radiación ionizante).

De acuerdo al tiempo característico que transcurra entre la excitación y la luminiscencia, esta se clasifica en fluorescencia o fosforescencia.

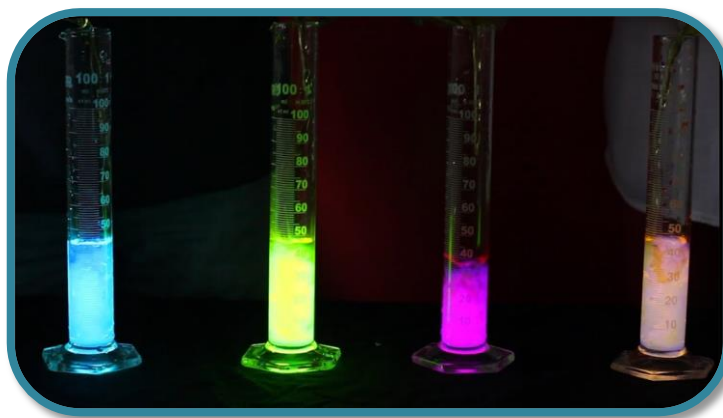


Figura 6. Fotoluminiscencia

## 2.9.1 Fluorescencia

La fluorescencia es un método analítico relacionado con la espectrofotometría donde se da el fenómeno luminiscente en el cual una molécula es capaz de emitir energía por radiación en periodos de tiempo menores a  $10^{-8}$ s después de la excitación previa y se detiene inmediatamente cuando esta cesa, como se muestra en la figura 6. El tiempo de decaimiento de la fluorescencia es independiente de la temperatura. El mecanismo de la fluorescencia está determinado por la probabilidad de la transición electrónica de un nivel excitado  $E_e$  a su estado base  $E_0$  (Diana 2013).

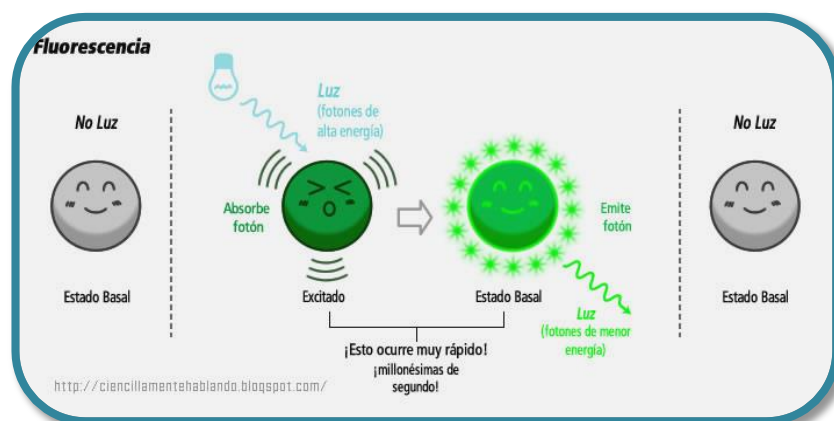


Figura 7. Diagrama de fluorescencia

La medición de la intensidad de la fluorescencia permite determinar cuantitativamente vestigios de muchas especies inorgánicas y orgánicas.

Una de las características más atractivas es su sensibilidad inherente. Los límites inferiores del método con frecuencia son menores que los de un método de absorción por un factor de 0.1 o mayor y varían entre unas pocas milésimas o quizá centésima de parte por millón.

Casi todos los sistemas fluorescentes que son útiles para cuantificación son compuestos orgánicos complejos que tienen uno o más grupos funcionales aromáticos, además el proceso de absorción que conduce a la fluorescencia más intensa en estos compuestos generalmente representa una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  aunque son de interés ocasionalmente otras transiciones como  $n \rightarrow \pi^*$ . En la figura

8 se observa el diagrama de energía de absorción y emisión para los sistemas fluorescentes y fosforescentes.

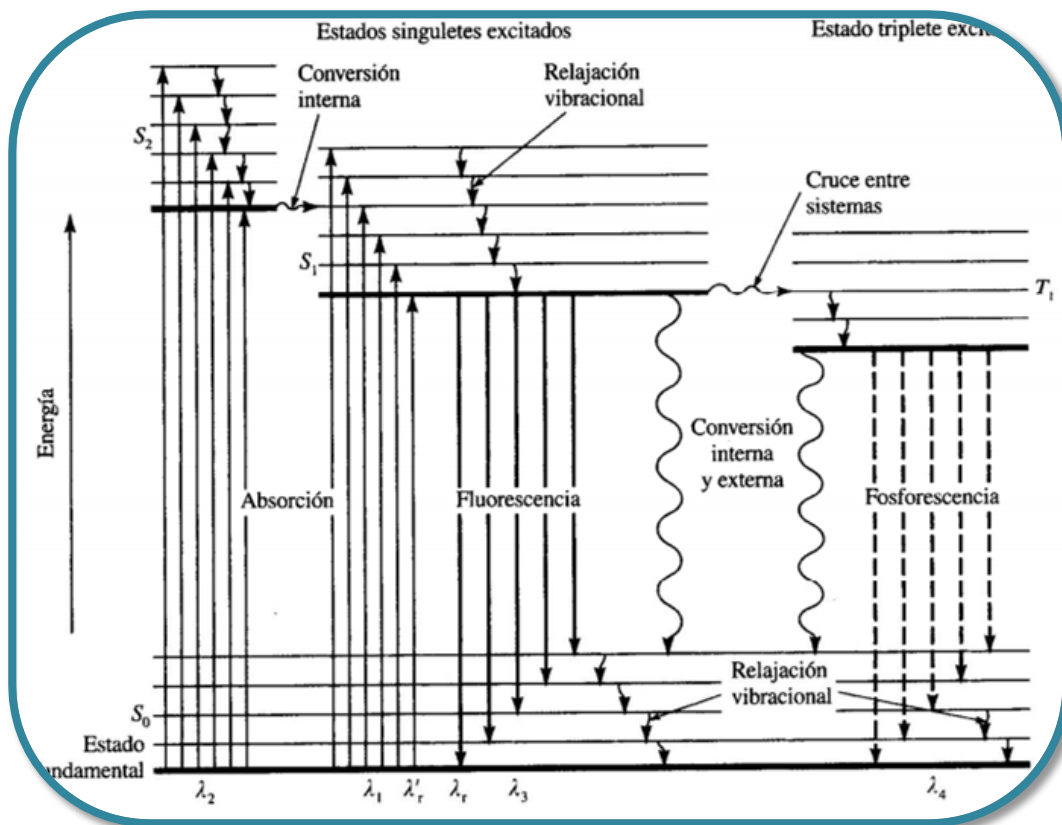


Figura 8. Diagrama de energía parcial para un sistema fotoluminiscente.

Sin embargo, los métodos de fluorescencia tienen menos aplicaciones que los métodos de absorción, dado el número relativamente limitado de sistemas químicos que presentan fluorescencia apreciable, lo cual, los hace selectivos. Además, esta última se ve sujeta a muchos más efectos de interferencia ambiental que los métodos de absorción UV-VIS (Diana 2013).

### 2.9.2 Equipo

El espectrofluorómetro utiliza monocromadores lo cual permite realizar barridos midiendo la intensidad de fluorescencia a diferentes longitudes de onda proporcionando espectros de emisión o lecturas puntuales y sus componentes se muestran en la figura 9.

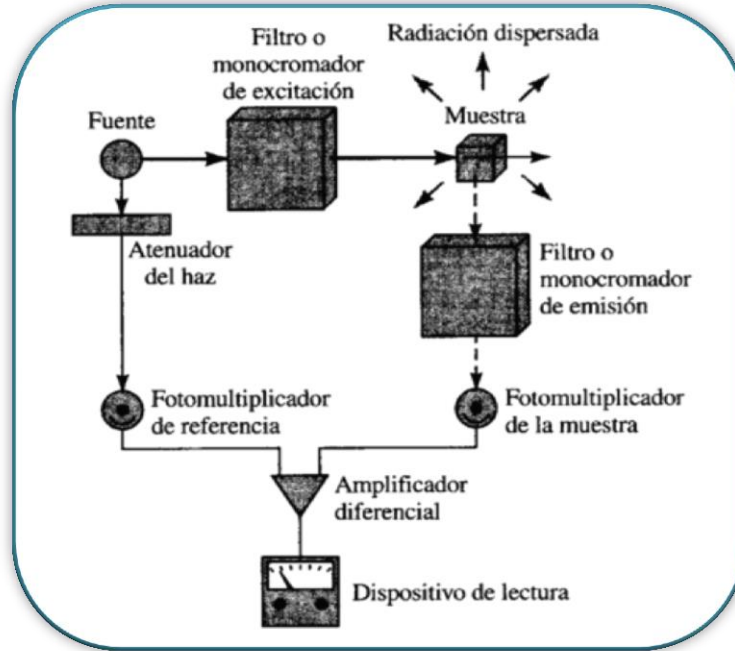


Figura 9. Componentes del espectrofluorómetro

El fluorómetro solo presenta un compartimento para celda (un solo haz) y se pueden realizar únicamente lecturas puntuales y generalmente utiliza filtros para pulir la longitud de onda de excitación y emisión como se pueden observar en la figura 9.

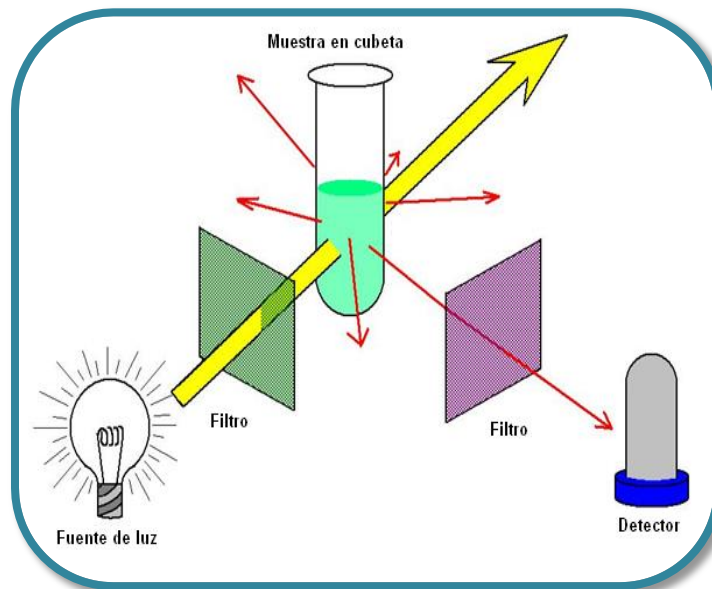


Figura 10. Componentes del fluorómetro

- **Fuente de luz:** Se emplea comúnmente una lámpara de arco de mercurio o xenón. La lámpara de xenón produce intensa radiación por el paso de corriente por una atmosfera de xenón. El espectro continuo en la gama comprendida entre 250 nm y 600 nm estando la intensidad pico en 470 nm. Las lámparas de arco de mercurio producen un intenso espectro de líneas. Las lámparas de alta presión (aproximadamente 8 atm) dan líneas en 365, 398, 436, 546, 579, 690, y 734 nm. Las lámparas de baja presión equipadas con una cubierta de sílice proporcionan intensa radiación adicional en 254 nm.
- **Filtros y monocomrades:** se utilizan frecuentemente filtros de absorción y filtros de interferencia, la mayor parte de los fluorómetros usan monocomrades de red. Las redes tienen la ventaja de dar dispersiones lineales, una mejor dispersión en la región visible y tienen menor pérdida de luz en comparación con los prismas. Los prismas de cuarzo dan mejor dispersión en la región ultravioleta y no poseen espectros de segundo y tercer orden.

Los filtros se utilizan para realizar dos funciones:

El primero es permitir que solamente una luz de una longitud de onda específica pueda pasar a la celda de muestra y excitar una molécula específica. Los filtros de excitación son siempre de Banda Corta (NB).

Los filtros de emisión son generalmente agudos de corte (SC) que permiten que sólo la luz emitida por encima de la longitud de onda específica pueda pasar en el tubo fotomultiplicador. Puesto que el tubo fotomultiplicador es sensible a una amplia gama de longitudes de onda, un filtro permite al usuario elegir el intervalo de longitud de onda detectada por el tubo fotomultiplicador, para reducir el ruido de fondo y así aumentar la sensibilidad.

***Filtro de paso de banda estrecha (NB)*** Este filtro se utiliza cuando las longitudes de onda de excitación y emisión están muy juntas, los anchos de banda típicos están en el rango de 8 a 10 nm. Se requieren técnicas de

fabricación de precisión y cuestan más que los otros tipos de filtros. El filtro consiste en un interferómetro miniatura en conjunción con los vidrios de bloqueo. Algunos filtros de paso de banda estrecha se componen de unas gafas especiales ópticas, o una combinación de vidrio o materiales de gelatina y tienen anchos de banda de 50 a 100 nm. Estos filtros son particularmente útiles cuando se requiere una alta sensibilidad y una resolución más baja no es un factor para distinguir entre los diferentes restos fluorescentes presentes en la solución.

***Filtros Agudos de Corte (SC).*** En este tipo de filtro pasa toda la luz de una longitud de onda a un valor dado y bloquea toda la luz de longitudes de onda más cortas. La transición de cero a la transmitancia total (aproximadamente 80-90 por ciento), por lo general tiene lugar en una región de alrededor de 40 nm. La longitud de onda característica de un filtro de Agudo de Corte SC se define como la longitud de onda a la que el filtro tiene una transmitancia de 37 por ciento. Con la mayoría de los fabricantes de filtros, no se trata de una tolerancia de 10 nm en la ubicación de las más largas longitudes de onda de la luz emitida que se puede medir.

- **Celdas:** celdas cilíndricas y rectangulares construidas de vidrio o sílice (Diana 2013).
- **Detectores:** debido a que la señal de fluorescencia es de baja intensidad se requiere de un potente sistema de amplificación. Por esto son preferidos los tubos fotomultiplicadores, aunque también se usan comúnmente los fototubos. Estos han llegado a generalizarse como detectores en instrumentos de fluorescencia sensibles.

# **3. JUSTIFICACIÒN**

### 3. Justificación

Las deficiencias vitamínicas o de micronutrientes tienen un impacto negativo en la salud infantil (Beaton, y otros 1993), (Rosaldo, y otros 1997), (Maulen-Radovan, y otros 1999). Varios informes muestran la asociación de deficiencias vitamínicas y de micronutrientes con una menor respuesta inmune, con el aumento de la frecuencia de infecciones respiratorias y digestivas, y con alteraciones en las habilidades cognitivas (Munson, y otros 1974), (Schlesinger y Stekel 1997) (Black, Lanata y Lazo 1989), (Green y Heyworth 1980).

La adición de vitaminas y minerales a los alimentos comunes es la mejor estrategia para corregir el nivel de micronutrientes de grandes sectores de la población, pues no se requiere de modificar la dieta habitual ni de insistir en el cumplimiento individual de un programa nuevo; es un método que se puede seguir por periodos prolongados. Por lo anterior, la adición de vitaminas y minerales a los alimentos puede ser puesta en práctica de forma más económica para superar la desnutrición por deficiencia de minerales y vitaminas (Rosaldo, y otros 1997).

Algunos autores recomiendan la suplementación con múltiples micronutrientes, ya que en la mayoría de las ocasiones los niños presentan deficiencia de más de dos micronutrientes y porque se logra un mayor impacto nutricional (Rosado, Bourges y Saint 1995). La OMS promueve la fortificación con micronutrientes en alimentos de consumo masivo, de bajo costo y aplicación de método fluorométrico para la cuantificación de vitamina B1 en productos lácteos disponibles en el mercado para que lleguen de forma suficiente a los grupos de población en riesgo (Rosaldo, y otros 1997).

Fortificación de la leche líquida: Las vitaminas liposolubles se pueden agregar en polvo o en forma líquida, mientras que las vitaminas hidrosolubles y los minerales se agregan en polvo directamente a la leche líquida. La leche líquida se fortifica justo antes de su pasteurización o tratamiento ultratérmico, y es fundamental asegurarse que haya una buena distribución de los nutrientes en la leche antes de efectuar cualquier tratamiento de calor. Las vitaminas presentan diferentes grados de sensibilidad al calor, la luz y la humedad, como también, a los agentes oxidantes y reductores. Los avances recientes de la tecnología han permitido

producir formas comerciales de vitaminas con mayor estabilidad y compatibilidad con otras formas de nutrientes. Un programa de fortificación con vitaminas y minerales necesita que se realicen pruebas en forma periódica para asegurar la cantidad deseada de micronutrientes en el producto final antes de su uso. Por consiguiente, se necesitan instalaciones, procedimientos, y personal debidamente entrenado (USAID 1997-1999).

La importancia de la cuantificación de tiamina se debe al papel que juega en nuestro organismo para la conversión de carbohidratos en energía, y a los efectos que ocasiona por su deficiencia o por alta ingesta en el ser humano.

## **4. Hipótesis**

La tiamina presente en productos lácteos puede ser cuantificada mediante un método fluorométrico basado en la oxidación de tiamina para formar el tiocromo.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Aplicar el método fluorométrico para la cuantificación de vitamina B1 en productos lácteos mediante la oxidación de la tiamina para formar el tiocromo.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Establecer un protocolo estándar de determinación de tiamina en disoluciones acuosas mediante el análisis de variables críticas aplicando un diseño de experimentos.
2. Establecer el límite de detección y cuantificación del método analítico en la determinación de tiamina en productos lácteos mediante la formación del tiocromo como resultado de la oxidación de la tiamina presente en el medio, acoplado a un detector de fluorescencia.
3. Aplicar el método para la determinación de tiamina en muestras comerciales de productos lácteos con el fin de contrastar el contenido reportado por el fabricante.

# 6. METODOLOGÍA

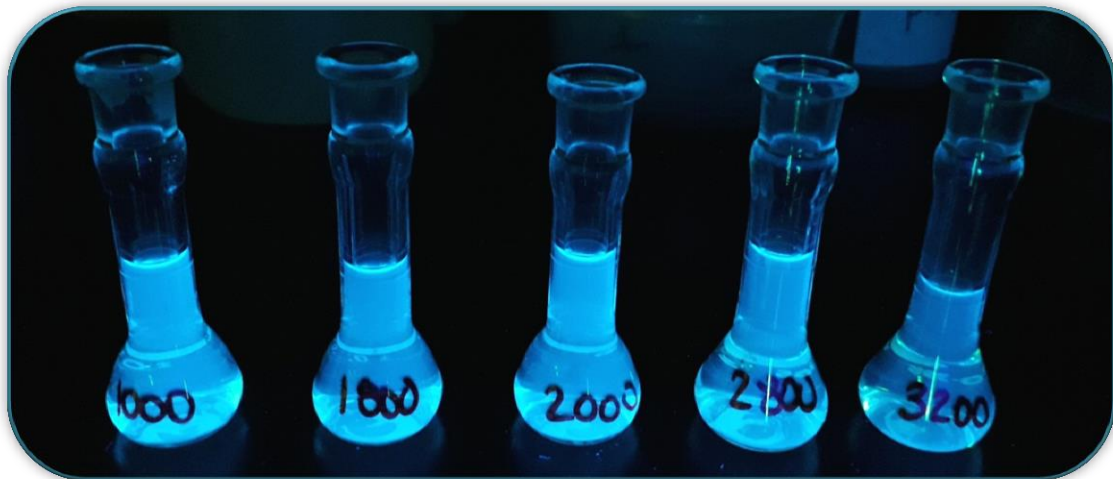


Figura 11. Disoluciones de suero de leche fluorescentes

## 6.1 Método de tiocromo

Los métodos químicos más utilizados implican la reacción entre la vitamina y ferricianuro de potasio en solución alcalina para formar tiocromo el cual presenta una fluorescencia azul característica ( $\lambda$  excitación 365-375 nm y  $\lambda$  emisión a 425-435 nm) que se usa como base para los procedimientos de medida más frecuentemente usados fluorométricamente; este procedimiento es el oficial de EE.UU. y ha sido automatizado por inyección de flujo con fluorimetría y detección de quimioluminiscencia.

En disolución básica, la tiamina en presencia de agentes oxidantes como el  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-2}$ ,  $\text{HgCl}_2$ , bromuro de cianógeno entre otros forman tiocromo, como se observa en la figura 11. Por otro lado la tiamina se destruye por la radiación gamma, los rayos X y la radiación UV, aspectos importantes en la industria farmacéutica y alimentaria pues son métodos de esterilización ampliamente utilizados y que por tanto pueden reducir su aporte nutricional (Deulofeu Piquet 2014).

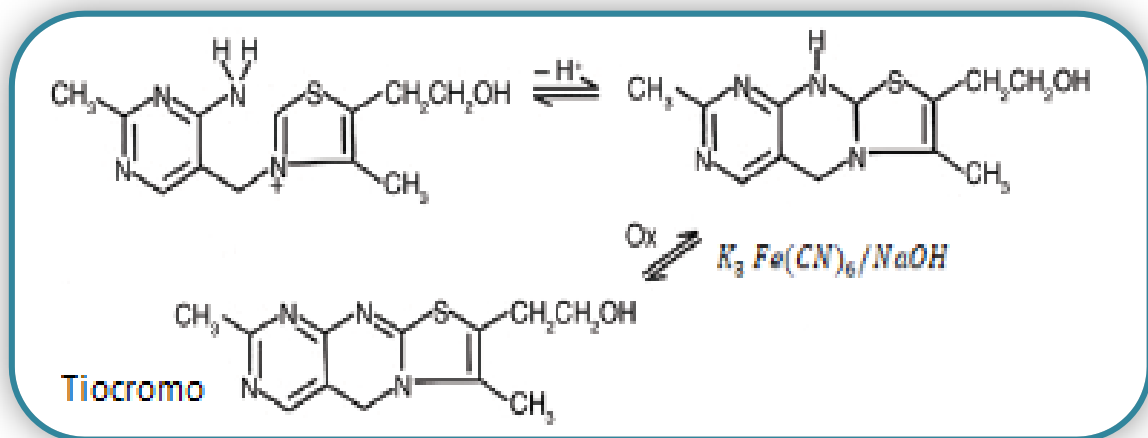


Figura 12. Reacción de tiamina a tiocromo

Para la cuantificación de tiamina se partió modificando el método descrito en la NOM-247-SSA1-2008 para cereales y sus productos, el cual utiliza HPLC con detector de fluorescencia e hidrólisis ácida para la extracción de la tiamina. El método propuesto para la determinación de tiamina en leche se basa en la

precipitación de proteínas en medio ácido y utiliza el únicamente el fluorómetro como detector. En la tabla 6 se muestran los reactivos, materiales y equipo necesarios para la cuantificación de tiamina.

Tabla 6.- Reactivos, Materiales y Equipo para la Cuantificación de Tiamina

<b>REACTIVOS</b>
Agua destilada.
Ácido clorhídrico HCl (J.T. Baker)
Clorhidrato de tiamina : $C_{12}H_{18}C_{12}N_4OS$ (Eastman kodak CO) grado USP
Ferricianuro de potasio $K_3Fe(CN)_6$ (J.T. Baker)
Hidróxido de sodio NaOH (Productos químicos de Monterrey S.A de C.V)
Ácido tricloroacético $C_2HCl_3O_2$ (Mallinckrodt)
Ácido fosfórico $H_3PO_4$ (J.T. Baker)
Alcohol isopropílico $C_3H_8O$ grado HPLC
Ácido cítrico $C_6H_8O_7$ (J.T. Baker)
<b>MATERIALES</b>
Papel filtro
Vidriería de laboratorio
<b>EQUIPO</b>
Balanza analítica PB 303-5 Mettler Toledo
Equipo Turner Quantech Fluorometer con filtros
Filtros para fluorómetro de NB360 nm (absorción) y SC430 nm (emisión) Sharp cut off filter
Celda para fluorómetro de 3mL SIGMA C-9167 LOT 35H0865 sílica (quartz), light path 10 mm recomendado para UV/Vis, espectrometría desde 200nm
Micro pipeta Epperndorf de 10- 100 $\mu$ L y de 100-1000 $\mu$ L

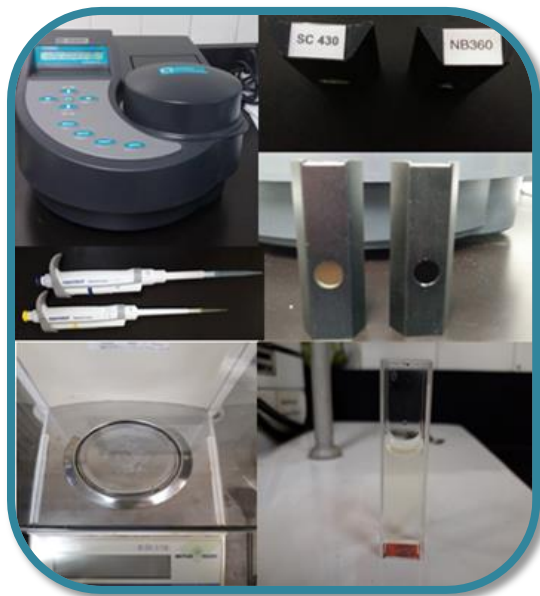


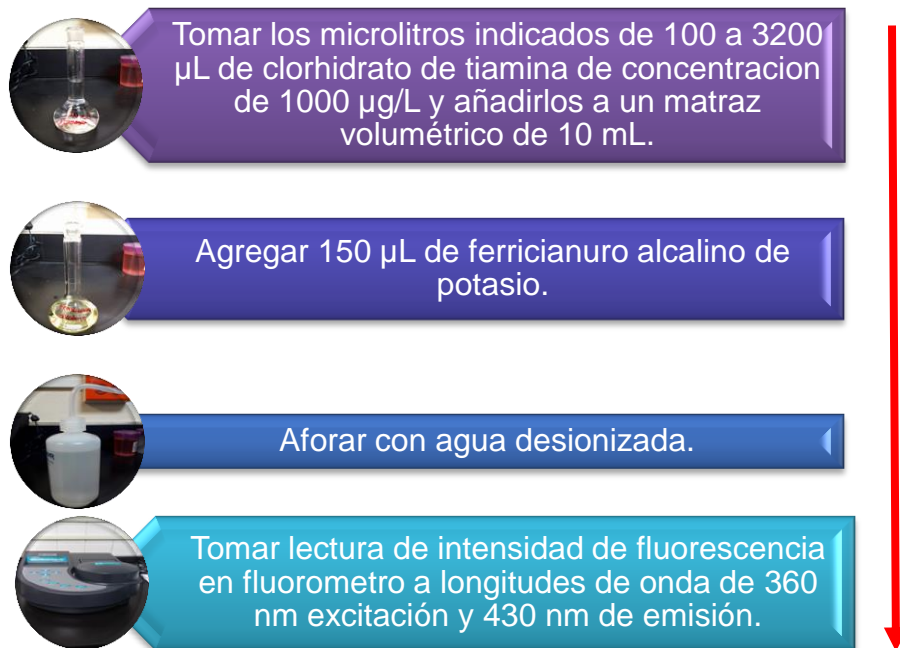
Figura 13. Equipo utilizado para la cuantificación de tiamina

Se preparan las disoluciones a utilizar como se describe en la tabla 7, utilizando agua desionizada como medio de disolución. La disolución estándar de tiamina debe prepararse el mismo día que se utiliza, mientras que Las disoluciones de ferricianuro de potasio alcalino son preparadas con un día de anticipación.

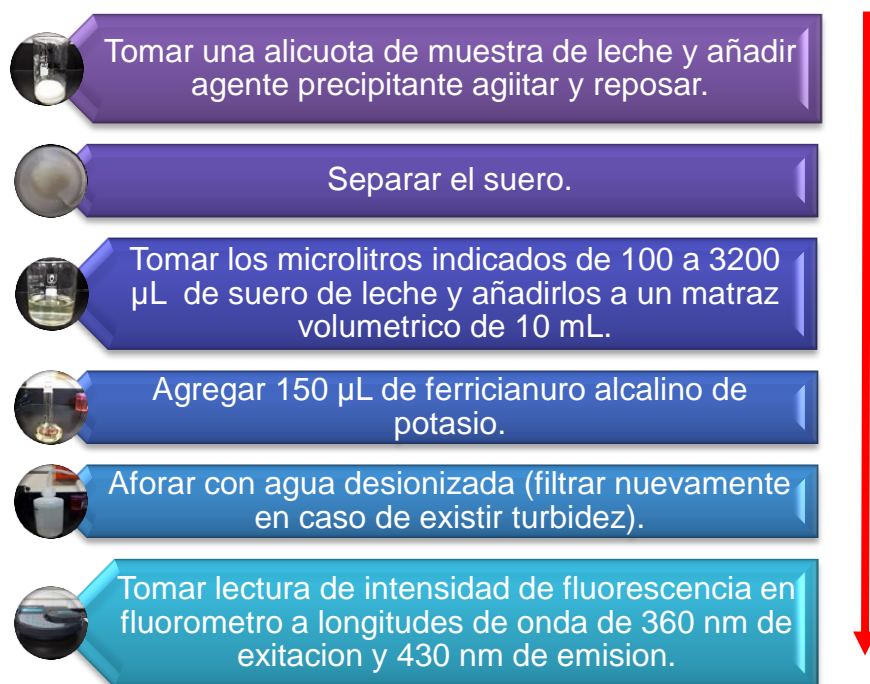
Tabla 7.- Descripción de preparación de disoluciones para curva de calibración

DISOLUCIONES	PREPARACIÓN
Ferricianuro de potasio	Pesar 50 mg de ferricianuro de potasio, disolver y aforar a 5 mL con agua.
Ferricianuro de potasio alcalino al 1%	Pesar 7.5 g de NaOH, agregar 2 0mL de agua y 2 mL de ferricianuro de potasio, agitar y aforar con agua a 50 mL.
Disolución madre de clorhidrato de tiamina	Pesar 50 mg de clorhidrato de tiamina, agregar 20 mL de agua, 5 mL de HCl 1N y aforar a 50mL.
Disolución estándar de clorhidrato de tiamina (1000 µg/L)	Colocar 50 µL de la disolución madre de clorhidrato de tiamina y aforar a 50 mL con agua.

## Diagrama de flujo para preparación de curva estándar de tiamina



## Diagrama de flujo para determinación de tiamina en la muestra



## 6.2 Elaboración de curva de calibración de clorhidrato de tiamina para determinar la estabilidad de la disolución.

Se prepararon por quintuplicado disoluciones de tiamina en un intervalo de concentración de 10 a 320  $\mu\text{g/L}$ , para medir su intensidad de fluorescencia (FIU) en un fluorómetro (Turner QuantechFluorometer) utilizando longitudes de onda de 360 nm excitación y 430 nm de emisión, con los datos obtenidos elaborar la curva estándar, estas mismas disoluciones fueron analizadas diario durante un mes, para observar la estabilidad de la disolución estándar de tiamina utilizando el método para la formación del tiocromo.



Figura 14. Reactivos y disoluciones para la cuantificación de tiamina

## 6.3 Pretratamiento de muestra

La muestra de 25 mL de leche (Nutri-leche) es tratada con el agente precipitante para eliminar las proteínas presentes, con este fin se utilizó:

- Ácido tricloroacético sólido (4 g)
- Acetonitrilo (200  $\mu\text{L}$  a 5000  $\mu\text{L}$ )
- Alcohol isopropílico, sulfato de sodio anhidro y cloruro de sodio (1.5 mL:  
0.052 g: 0.128 g)
- Ácido cítrico sólido (40 mg)
- Disolución de ácido cítrico (140 mg/mL)

Una vez adicionando el agente precipitante se realizó la separación en las cuales con a y b se requirió centrifugación. El acetonitrilo se descartó como agente precipitante por la turbidez y separación de fases que presentaba.

Al utilizar los agentes precipitantes c y d se requirió únicamente filtración por gravedad utilizando papel filtro cualitativo. Al utilizar ácido cítrico sólido se observó buena coagulación de proteínas, por lo cual, se optó por preparar una disolución del mismo, para obtener una adición del mismo más sencilla y uniforme, y posteriormente buscar la cantidad óptima necesaria para la coagulación de proteínas, resultando esta última opción ser más conveniente que su forma sólida. La figura 15 muestra el proceso de separación de proteínas utilizando como agente precipitante, 420  $\mu$ L de una disolución de ácido cítrico a una concentración de 141.8 mg/mL, por último, se filtró por gravedad con papel filtro cualitativo y posteriormente se procede a la cuantificación de la tiamina formando el tiocromo.

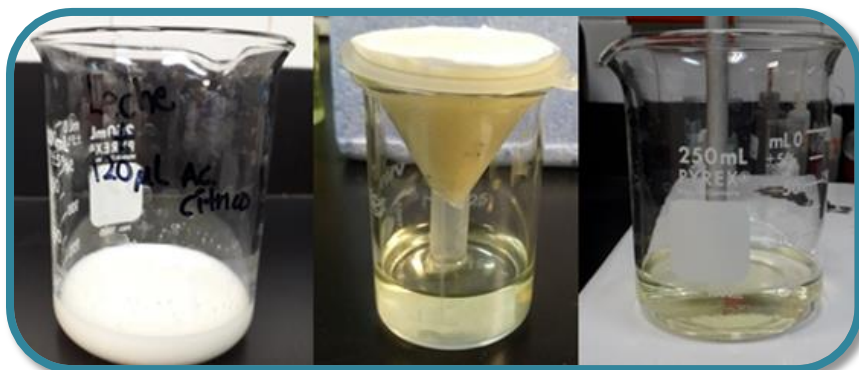


Figura 15. Precipitación de proteínas

Se realizó la precipitación de proteínas a diferentes temperaturas 8, 22 y 36  $^{\circ}$ C (figura 16) obteniéndose el suero con diferente turbidez encontrando que se favorece la precipitación a temperaturas bajas.

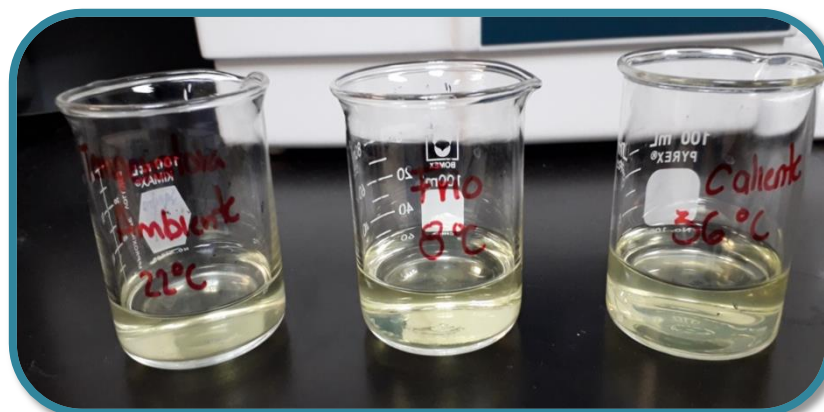


Figura 16. Precipitación de proteínas a diferentes temperaturas

## 6.4 Optimización de la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino

Con la finalidad de optimizar la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino necesaria para obtener intensidad de fluorescencia más alta se utilizó un diseño factorial mixto 3x2 con tres puntos centrales, con 4 grados de libertad y resolución V, los experimentos a realizar se muestran en la tabla 8.

Tabla 8.- Optimización de la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino

Muestra procesada $\mu\text{L}$	Ferricianuro alcalino (Fa) $\mu\text{L}$
200	200
1700	600
3200	1000
1700	600
1700	600
1700	1000
1700	200
200	1000
3200	200

De los resultados obtenidos con este diseño de experimentos realizado en muestra se optó por trabajar con disolución estándar de tiamina de 100  $\mu\text{g/L}$  variando únicamente el volumen de ferricianuro de potasio alcalino con el fin de encontrar la cantidad mínima necesaria de ferricianuro de potasio alcalino para formar el tiocromo producto de la oxidación de la tiamina.

## 6.5 Determinación de tiamina en muestra de suero de leche (Nutralche)

Tomar alícuotas en un intervalo de 100 a 3200  $\mu\text{L}$  de una muestra de suero de leche, adicionarla a un matraz volumétrico de 10 mL y agregar 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  alcalino, aforar con agua desionizada (filtrar si presenta de turbidez) y leer en un fluorómetro a longitudes de onda excitación de 360 nm y 430 nm de emisión.

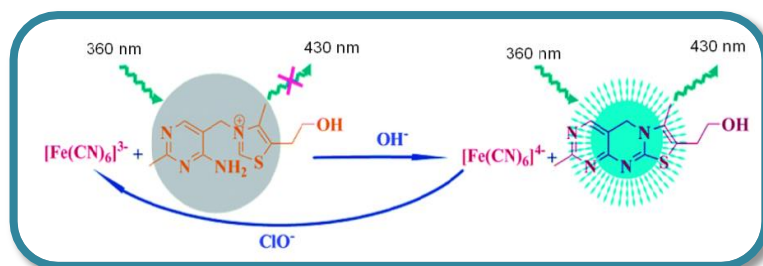


Figura 17. Diagrama de fluorescencia de tiocromo

# 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 18. Fluorescencia

La secuencia de los ensayos se realizó con el propósito de encontrar las condiciones óptimas para la cuantificación de la tiamina, para lograrlo se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones y se midió a dos diferentes longitudes de onda de emisión 430 nm y 440 nm y en ambos casos se utilizó la misma onda de excitación de 360 nm, se observó que 430 nm presenta mejor linealidad. Se determinó la estabilidad de la tiamina haciendo mediciones diarias de las mismas soluciones, lo cual mostró que esta se mantenía estable durante un mes a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se eliminó la adición de ácido fosfórico, ya que la intensidad de fluorescencia mostrada en las soluciones de tiamina era la misma con y sin su presencia.

La figura 19 se muestra la curva estándar de una disolución de clorhidrato de tiamina 1000 µg/L, utilizando de 100 a 3200 µL con 2 mL de ferricianuro alcalino y 0.5 mL de ácido fosfórico aforados a 10 mL con agua.

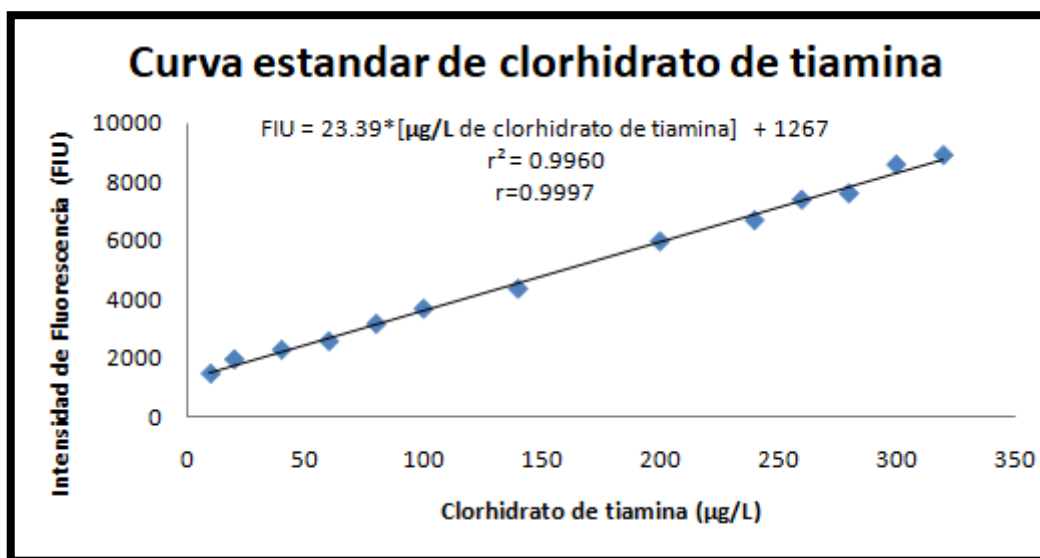


Figura 19. Curva Estándar de Tiamina

Para la muestra de leche se optimizó el método para la precipitación de proteínas, utilizando diferentes agentes precipitantes como fueron: ácido tricloroacético (ver figura 20) del cual se añadieron 4 g por cada 25 mL de muestra requiriendo 30 minutos de centrifugación a 3000 rpm y no se logró separar completamente el suero ya que,

quedaban partículas de la proteína coagulada suspendida en el mismo.

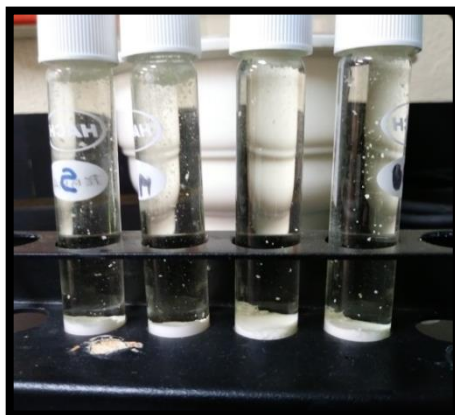


Figura 20. Precipitación con ácido tricloroacético

Se observa en la tabla 9 los valores obtenidos de tiamina en la muestra se encuentran muy por encima del valor reportado en el empaque de Nutrileche que es de 230  $\mu\text{g}$  en 250 mL de leche, mismos que se pueden observar en la figura 21; por lo que se optó por cambiar el agente precipitante y disminuir la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino ya que la intensidad de fluorescencia se veía afectada a altas concentraciones de ferricianuro alcalino.

Tabla 9.- Resultados de cuantificación de tiamina en suero de leche utilizando ácido tricloroacético.

Muestra	$\mu\text{L}$ de suero	FIU	$\mu\text{g}$ de tiamina/250mL
1	200	158	1183
2	400	303	994
3	600	383	811
4	800	510	784
5	1000	752	896
6	1400	912	767
7	1800	1102	714
8	2000	1230	714
9	2800	1658	679
10	3000	1773	677
11	3200	1852	662

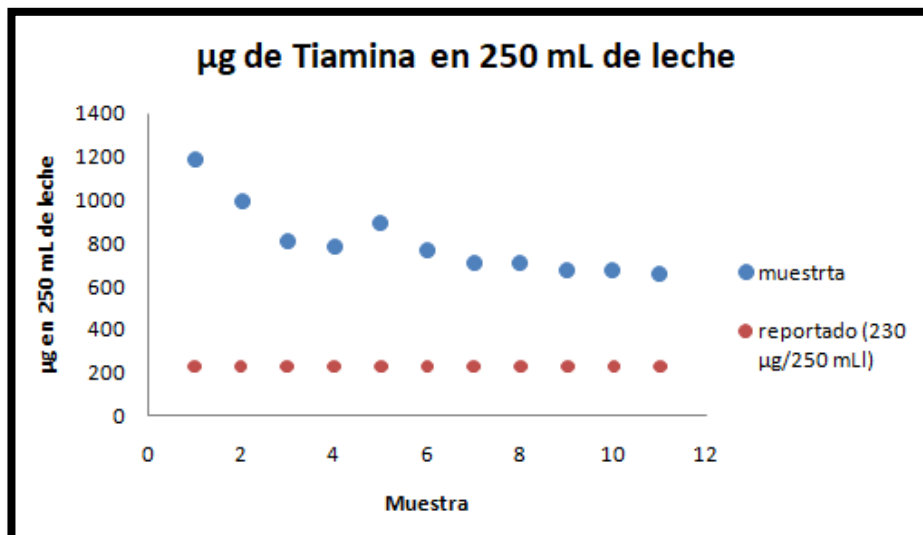


Figura 21. Resultados de cuantificación de tiamina a diferentes volúmenes de leche

Se observó que este proceso no era reproducible ya que en las múltiples pruebas que se realizaron se obtenían resultados diferentes.

Con la adición de acetonitrilo a la leche como agente precipitante (ver figura 22), en un intervalo de 200 µL hasta 5000 µL, se obtenía precipitación, pero mostró separación de fases y turbidez por lo cual se optó por trabajar con otros agentes precipitantes.

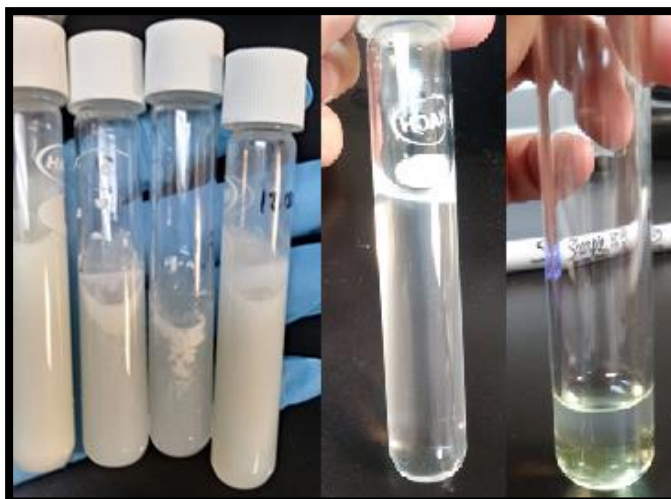


Figura 22. Precipitación de proteínas con acetonitrilo

El siguiente agente precipitante fue una mezcla de 1.5 mL de alcohol isopropílico, 0.052 g cloruro de sodio y 0.128 g sulfato de sodio anhidro, el cual si precipito proteínas, aunque presento ligera turbidez en el suero, con este se realizó el diseño de experimentos diseño factorial mixto 3x2 con tres puntos centrales, con 4 grados de libertad y resolución V utilizado para optimizar la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino mostró los siguientes resultados (ver tabla 10):

Tabla 10.- Diseño Factorial Mixto 3X2 Con 3 Puntos Centrales

Muestra procesada $\mu\text{L}$	Ferricianuro alcalino (Fa) $\mu\text{L}$	FIU
200	200	158
1700	600	1104
3200	1000	1852
1700	600	1100
1700	600	1107
1700	1000	1230
1700	200	380
200	1000	180
3200	200	510

Al realizar el análisis estadístico de los resultados del diseño de experimentos utilizando el software Statgraphics arroja los datos mostrados en la tabla 11.

Tabla 11.- Análisis de varianza (ANOVA)

Analysis of Variance for FIU					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>A:Muestra</b>	1.02E+06	1	1.02E+06	35.17	<b>0.0041</b>
<b>B:Ferricianuro</b>	816966	1	816966	28.06	<b>0.0061</b>
<b>AA</b>	212455	1	212455	7.3	0.054
<b>AB</b>	435600	1	435600	14.96	<b>0.018</b>
<b>Total error</b>	116475	4	29118.7		
<b>Total (corr.)</b>	2.61E+06	8			

En la figura 23 se muestra el efecto que tiene el volumen adicionado de ferricianuro de potasio alcalino en el volumen de muestra procesada, a mayor volumen de ferricianuro de potasio alcalino mayor señal fluorescente (FIU).

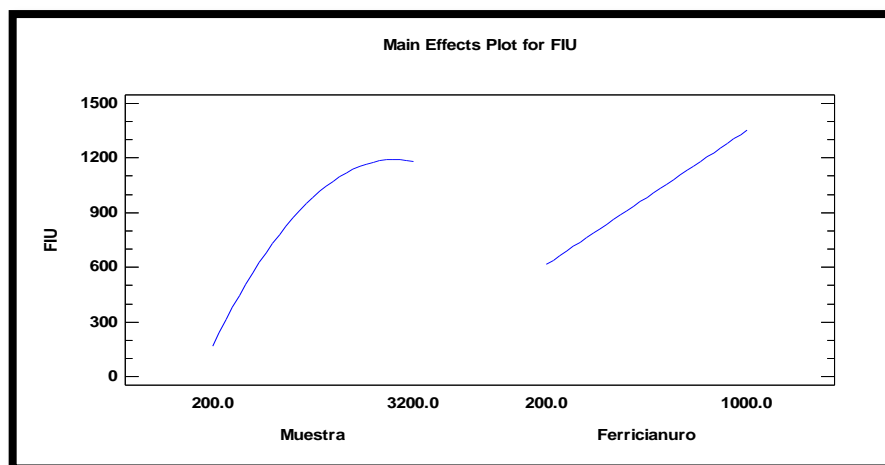


Figura 23. Gráfico de Efectos principales de FIU

Con el diseño factorial se obtiene la ecuación 1 de regresión lineal múltiple con la cual se puede predecir la intensidad de fluorescencia si se cambia el volumen adicionado de ferricianuro de potasio alcalino con un coeficiente de determinación de  $r^2 = 0.9552$ .

$$\text{FIU} = 21.0831 + 0.474569 \cdot \text{Muestra} - 0.0125 \cdot \text{Fa} - 0.000137422 \cdot \text{Muestra}^2 + 0.00055 \cdot \text{Muestra} \cdot \text{Fa}$$

#### Ecuación 1 Ecuación de Regresión Lineal Múltiple

En la figura 24 se muestra el gráfico de superficie de respuesta que predice el cambio de intensidad de fluorescencia en función de la muestra y cantidad de ferricianuro de potasio alcalino añadido.

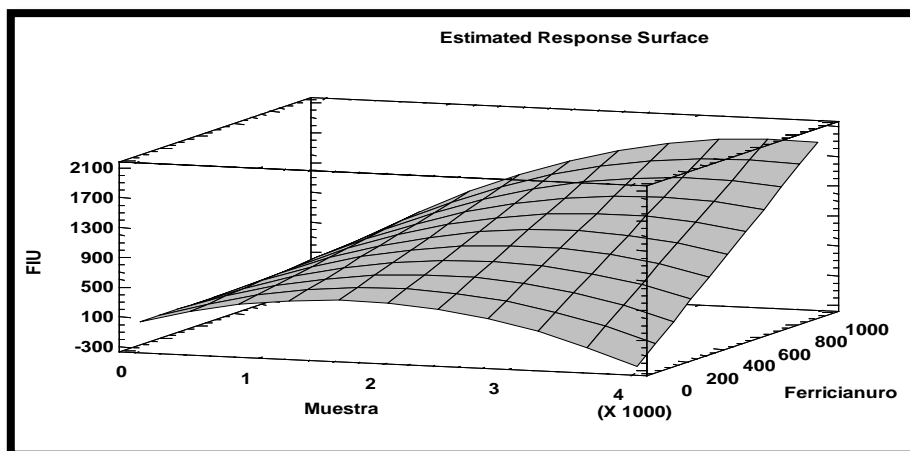


Figura 24. Gráfico de superficie de respuesta

Estos resultados muestran que a mayor volumen de ferricianuro de potasio alcalino añadido mayor fluorescencia.

Al usar una mezcla de 1.5 mL de alcohol isopropílico, 0.052 g cloruro de sodio y 0.128 g sulfato de sodio anhidro como agente precipitante, observando el suero presentaba turbidez como se observa en la figura 25 y no fue reproducible, ya que variaban los tiempos de coagulación y el tamaño del mismo. En la cuantificación de tiamina se encontró que el alcohol isopropílico abatía la fluorescencia.



Figura 25. Precipitación de proteínas con alcohol isopropílico y sales.

En la figura 26 se muestra la curva estándar de clorhidrato de tiamina utilizando 200  $\mu$ L de ferricianuro de potasio alcalino, sin adición de ácido fosfórico.

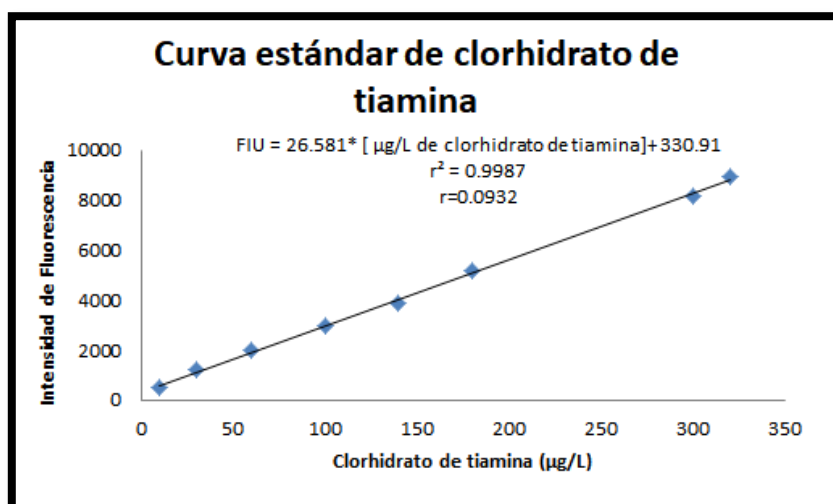


Figura 26. Curva estándar de tiamina sin adición de ácido fosfórico

En la tabla 12 se muestra la concentración calculada en  $\mu\text{g}$  de tiamina en 250 mL de leche al analizar diferentes volúmenes de suero de leche, encontrando que las concentraciones no tienen tanta dispersión entre los volúmenes analizados, las fluorescencias obtenidas en la curva estándar eran bajas comparadas con la anterior.

Tabla 12.- Resultados de cuantificación de tiamina en suero de leche precipitando con alcohol isopropílico y sales.

Muestra	$\mu\text{L}$	FIU	$\mu\text{g}$ de tiamina/250mL
1	100	792	433.66
2	300	2009	526.09
3	600	3738	534.18
4	1000	5936	527.17
5	1400	7520	482.99
6	1800	9572	482.85
7	2200	11354	471.24
8	2600	12398	436.51
9	3000	13878	424.71
10	3200	15997	393.27

En comparación con el método anterior en la figura 27 se observa que la concentración de tiamina obtenida es más cercana al valor reportado, por lo cual se decide cambiar a otro agente precipitante y reducir la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino.

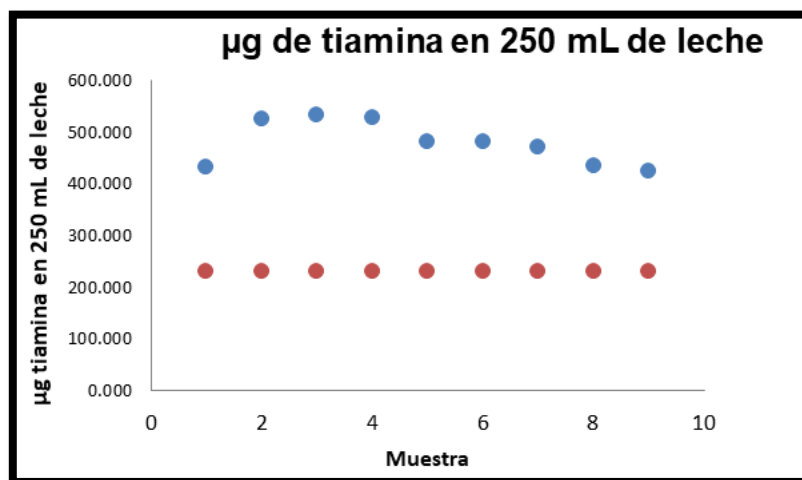


Figura 27. Resultados de cuantificación de tiamina a diferentes volúmenes de suero de leche.

Finalmente, ácido cítrico el cual se probó como sólido mostrando buena precipitación y fácil separación si se agitaba lentamente, para disminuir tiempos y uniformizar el pretratamiento de la muestra se optó por trabajar con una disolución de ácido cítrico 141.8 mg/mL presentando mejores resultados al adicionar 420  $\mu$ L a 25 mL de muestra a 8 °C (ver figura 28). Con este proceso se obtuvo una concentración de tiamina más cercana a la reportada en el empaque de la muestra, pero estando aun por encima del valor reportado por lo cual se realizó un nuevo análisis usando una solución estándar de tiamina de 100  $\mu$ g/L y variando solamente la cantidad de volumen de ferricianuro de potasio alcalino adicionada (ver tabla 13).

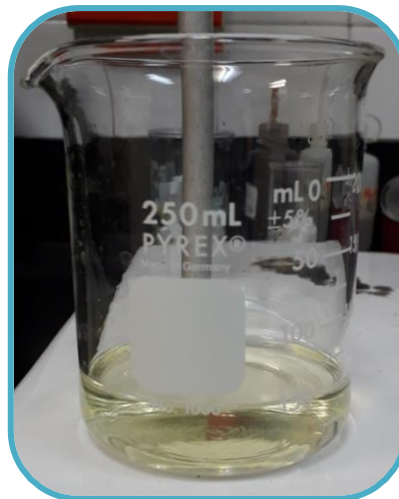


Figura 28. Precipitación de proteínas con ácido cítrico

Tabla 13.- Variación de Ferricianuro de potasio alcalino para encontrar el valor mínimo necesario en la cuantificación de tiamina.

$\mu$ g/L de tiamina	$k_3Fe(CN)_6$	Intensidad
100	100	2965
100	150	3226
100	200	3298
100	300	3554
100	400	3771
100	600	4148
100	800	4476
100	1000	4204

En la figura 29 se observa el resultado de graficar los  $\mu$ L de ferricianuro de potasio alcalino añadidos a un estándar de tiamina de 100  $\mu$ g/L, se recalculó la concentración de tiamina para cada volumen a partir de la ecuación obtenida al graficar los  $\mu$ L de ferricianuro de potasio alcalino y la intensidad de fluorescencia (FIU= 28.881\*[ $\mu$ g/L Tiamina] + 274.1) donde encontramos que la cantidad optima

mínima necesaria es de 150 µL de ferricianuro ya que a 150 µg/L la concentración calculada se acerca más a la concentración real del estándar; mostrando también que añadiendo más de 800 µL de ferricianuro de potasio alcalino se abate la intensidad de fluorescencia.

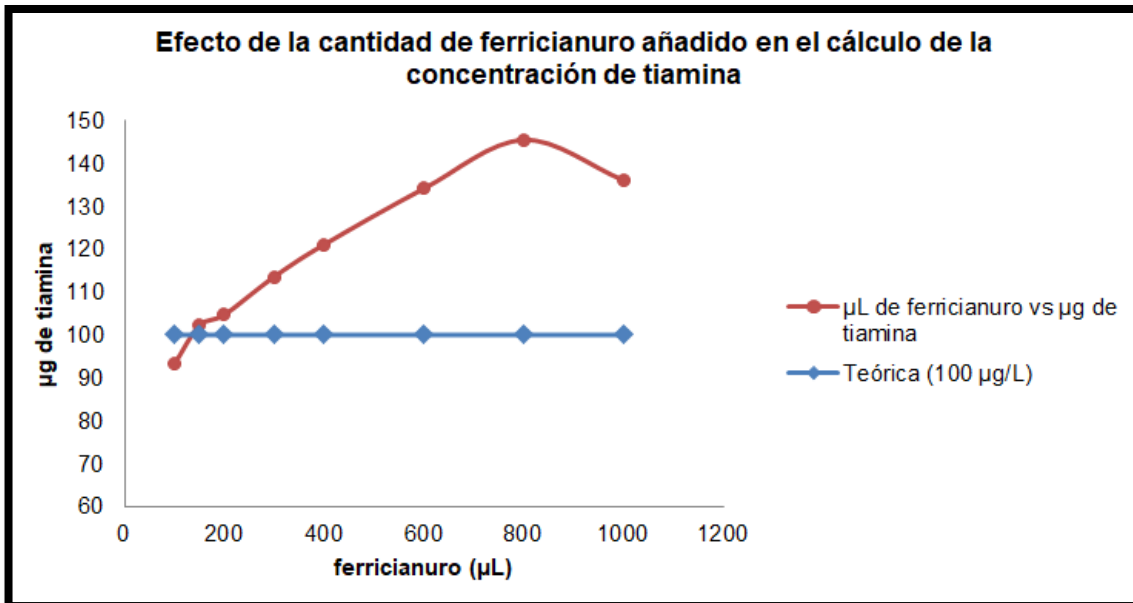


Figura 29. Efecto de la cantidad de ferricianuro añadido en el cálculo de la concentración de tiamina.

En la figura 30 se muestra la curva estándar de clorhidrato de tiamina de 1000 µg/L añadiéndole a esta 840 µL de la solución de ácido cítrico aforando a 50 mL, utilizando 150 µL de ferricianuro alcalino observando una buena correlación lineal.

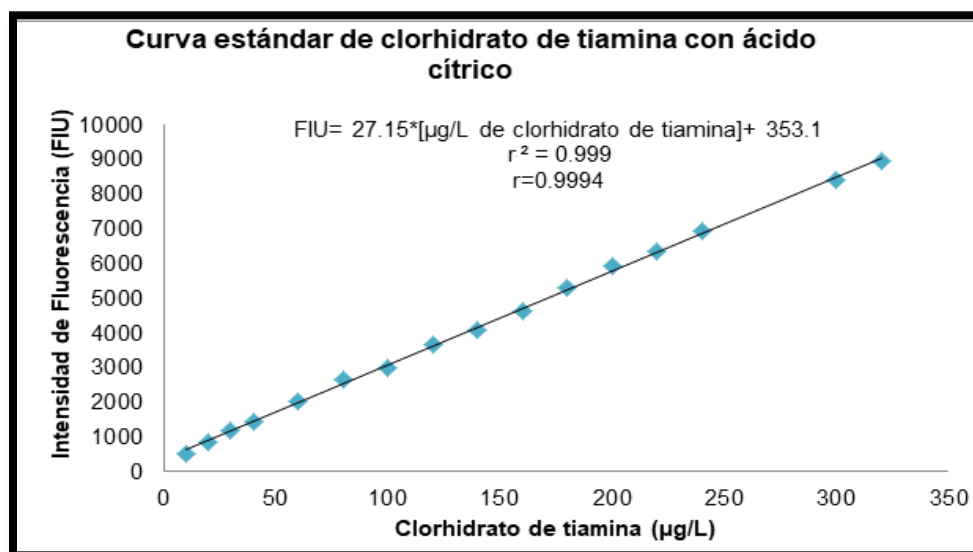


Figura 30. Curva estándar de tiamina con adición de ácido cítrico

Las condiciones óptimas de precipitación fueron utilizando 420  $\mu\text{L}$  de la disolución de ácido cítrico 141.8  $\text{mg}/\text{mL}$  a 25  $\text{mL}$  de la muestra de leche a 8  $^{\circ}\text{C}$  con agitación muy suave, los resultados se pueden observar en la tabla 14.

Tabla 14.- Resultados obtenidos de la cuantificación de tiamina utilizando 150  $\mu\text{L}$  de ferricianuro de potasio alcalino y ácido cítrico.

$\mu\text{L}$	FIU	$\mu\text{g}$ de tiamina/250 $\text{mL}$
100	3913	3278.05
200	5149	2207.67
300	4626	1310.71
400	4348	918.54
600	5594	802.51
800	6686	726.54
1000	6234	538.45
1200	5445	387.10
1400	5603	341.05
1600	6652	357.60
1800	7840	377.50
2000	6478	275.89
2200	6562	253.14
2400	7510	267.24
2600	8245	271.51
2800	7755	234.84
3000	7673	215.46
3200	7885	206.92

Se observa en figura 31 que los valores se encuentran más cercanos al valor reportado en el empaque de la Nutri leche.

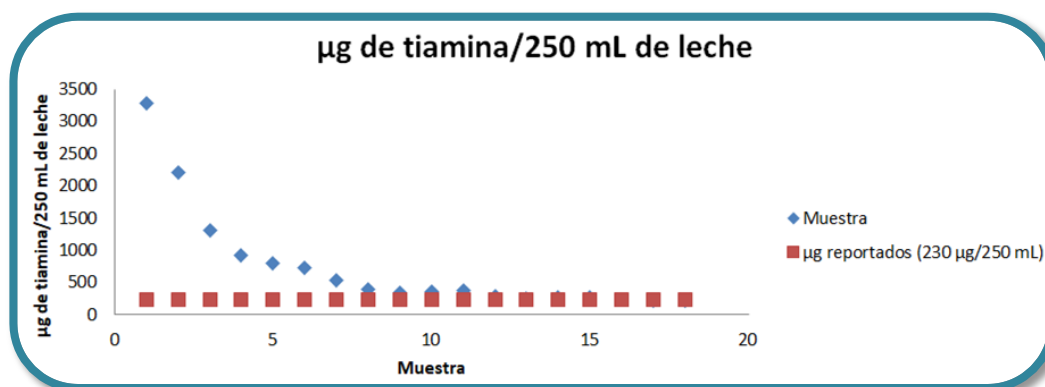


Figura 31. Resultados de cuantificación de tiamina a diferentes volúmenes de suero de leche

Se nos permitió en el centro de graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana utilizar un espectrofluorómetro Horiba JOBINIVON modelo NanoLog (figura 32) solicitando el apoyo a la Dra. Georgina Pina Luis y del Dr. Antonio Tirado Guizar para realizar las mediciones de fluorescencia tanto de una curva estándar como de la muestra, se hizo un barrido para saber que longitudes de emisión y excitación tiene la muestra el cual nos mostró una longitud de onda de excitación de 375 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm, el software procesa las señales obtenidas utilizando el programa ORIGIN.



Figura 32. Espectrofluorómetro Horiba JOBINIVON Modelo NanoLog

La curva estándar se preparó bajo las mismas condiciones anteriores, obteniendo el suero de la leche mediante la precipitación con disolución de ácido cítrico previamente descrita, obteniendo la curva estándar con un coeficiente de regresión de 0.9990 (figura 33).

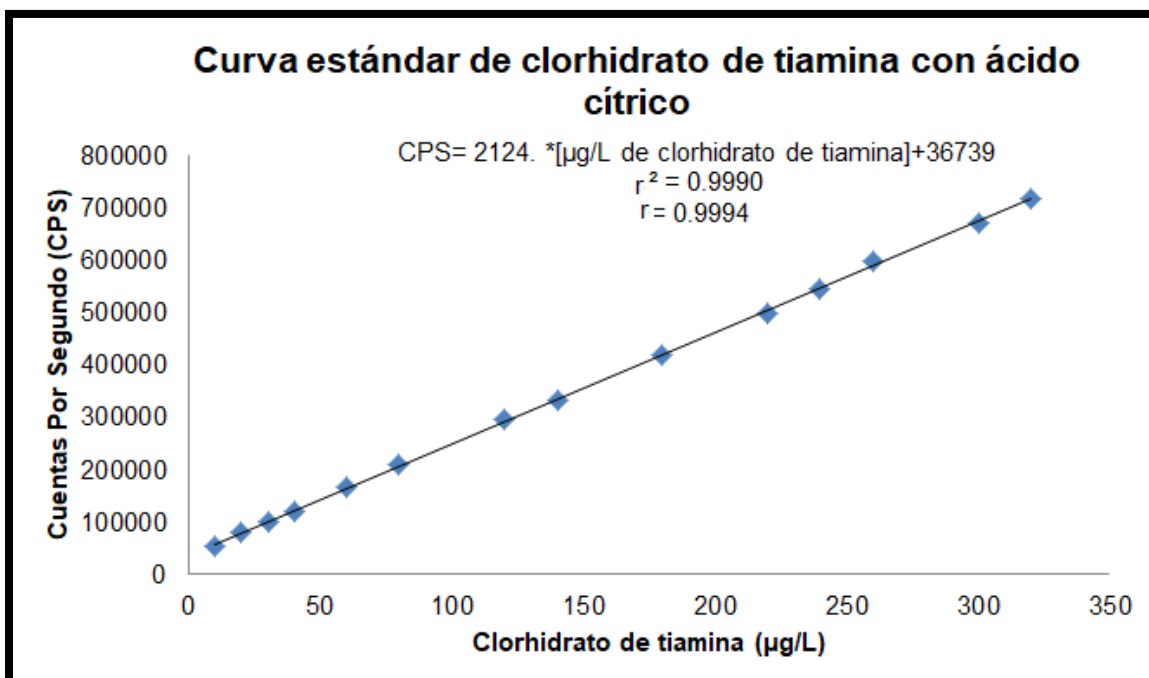


Figura 33. Curva estándar de tiamina utilizando espectrofluorómetro Horiba.

El programa ORIGIN mostró los valores de CPS (cuentas por segundo) a diferentes longitudes de onda con lo anterior se obtienen los espectros para fluorescencia tanto de excitación como de emisión lo cual ayudó para obtener la longitud de onda máxima a la cual emite la mayor fluorescencia de la oxidación de la tiamina como tiocromo, la cual fue de 440 nm; tanto para la curva como para la muestra de Nutrileche (ver figuras 34 y 35).

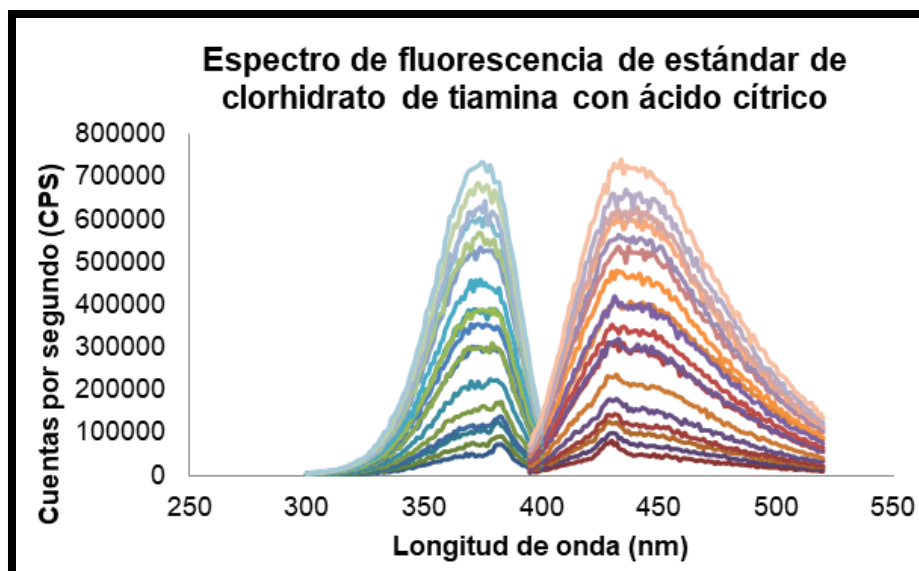


Figura 34. Espectro de fluorescencia de estándar de cloridrato de tiamina con ácido cítrico

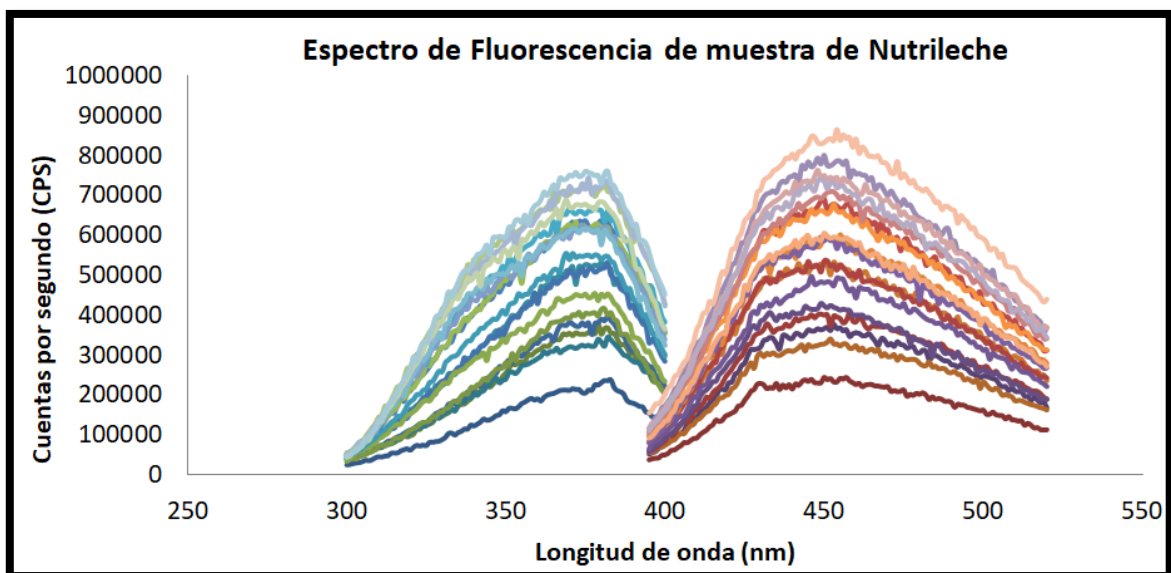


Figura 35. Espectro de fluorescencia de muestra de nutrileche

El programa ORIGIN también proporcionó un espectro de fluorescencia de emisión en 3D donde se puede observar en la figura 36 el punto central de la zona roja más intensa corresponde a la longitud de onda de excitación de 375 nm y la longitud de onda de emisión en los 440 nm, lo cual concuerda con el espectro de fluorescencia mostrado previamente.

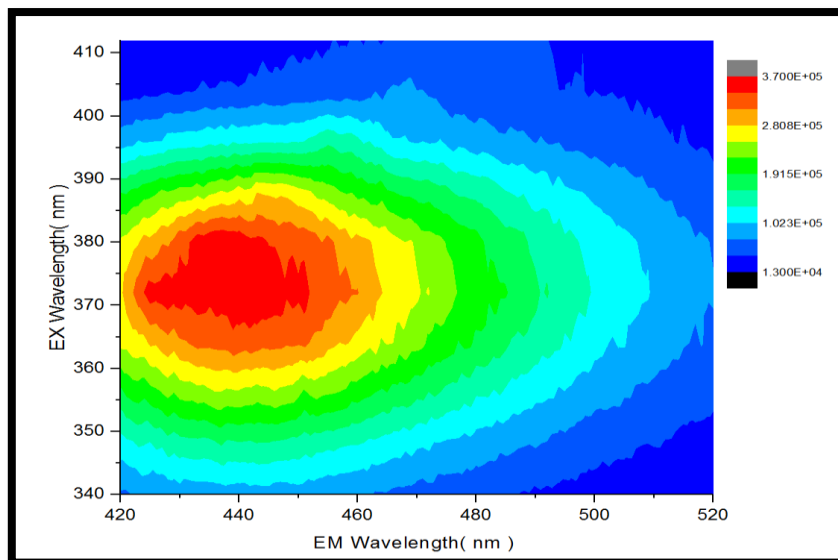


Figura 36. Espectro de emisión en 3D del producto de oxidación de la tiamina el tiocromo

## 7.1 Validación del método

La validación del método analítico propuesto para la cuantificación de tiamina comprende establecer las condiciones óptimas para su cuantificación y posteriormente realizar los cálculos de recobro, linealidad del método, límites de detección y cuantificación, exactitud y repetitividad del método.

## 7.2 Porcentaje de recobro

En la Tabla 15 se muestran los valores obtenidos para el porcentaje de recobro para las determinaciones con las que se elaboró la curva de calibración para la cuantificación de tiamina

Criterios de aceptación:

*El  $CV_{y/x}$  del porcentaje de recobro:*

- no debe de ser mayor al 2% para métodos cromatográficos o volumétricos
- no debe de ser mayor al 3% para método espectrofotométricos
- no debe de ser mayor al 5% para método microbiológico.

Tabla 15.- Porcentaje de recobro para la curva estándar utilizada para muestras tratadas con ácido cítrico.

ppb Adicionada	FIU	Pendiente	Intercepto	Recuperada ppb	% de recobro
20	587	27.99415042	-56.0188022	22.97	87.071
20	583	27.99415042	-56.0188022	22.83	87.616
40	1090	27.99415042	-56.0188022	40.94	97.709
40	1094	27.99415042	-56.0188022	41.08	97.369
60	1644	27.99415042	-56.0188022	60.73	98.801
60	1641	27.99415042	-56.0188022	60.62	98.976
80	2148	27.99415042	-56.0188022	78.73	101.611
80	2144	27.99415042	-56.0188022	78.59	101.796
100	2661	27.99415042	-56.0188022	97.06	103.032
100	2658	27.99415042	-56.0188022	96.95	103.146
180	4870	27.99415042	-56.0188022	175.97	102.292
180	4873	27.99415042	-56.0188022	176.07	102.230
200	5590	27.99415042	-56.0188022	201.69	99.164
200	5594	27.99415042	-56.0188022	201.83	99.094
320	8959	27.99415042	-56.0188022	322.03	99.368
320	8956	27.99415042	-56.0188022	321.93	99.402

### 7.3 Determinación de la linealidad del método

Para la determinación de la linealidad del método se debe de reportar la cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación de mínimos cuadrados se calcula el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada en el origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación  $r^2$ , el intervalo de confianza para la pendiente  $IC_{\beta_1}$ , el intervalo de confianza para la ordenada al origen  $IC_{\beta_0}$  y el coeficiente de variación de la regresión  $CV_{y/x}$  (ver figura ).

#### Criterios de aceptación:

➤ *Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:*

- $r^2 \geq 0.98$
- $IC_{\beta_1}$  debe de incluir la unidad

$IC_{\beta_0}$  debe de incluir el cero

Tabla 16.- Linealidad del método para curva estándar y muestra tratadas con ácido cítrico

<b>Pendiente (<math>b_1</math>)</b>	27.172
<b>Ordenada en el origen (<math>b_0</math>)</b>	352.651
<b>Coeficiente de determinación lineal (<math>r^2</math>)</b>	0.9991
<b>Coeficiente de correlación lineal (r)</b>	0.9995
<b>Intervalo de confianza para la pendiente (<math>IC_{\beta_1}</math>)</b>	27.420-26.923
<b>Coeficiente de variación de la regresión (<math>CV_{y/x}</math>)</b>	1.977

## 6.4 Límite de detección del método (LD) y límite de cuantificación (LC)

LD con base en la curva de calibración y desviación estándar de la regresión

$$LD = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b_1}$$

**Ecuación 2.** Límite de detección

LC con base en la curva de calibración y desviación estándar de la regresión

$$LC = \frac{10 * S_{y/x}}{b_1}$$

**Ecuación 3.** Límite de cuantificación

Los valores obtenidos para el LC y LD se resumen en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 17.- Valores para LD y LC para curva y muestras tratadas con ácido cítrico

Parámetro	Valor obtenido $\mu\text{g/L}$
Límite de detección	9.9
Límite de cuantificación	30.0

## 7.4 Determinación de exactitud y repetibilidad del método

Se debe preparar el placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado los cuales deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones y determinar la cantidad recuperada del analito. Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo analítico o muestra adicionada al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. La exactitud y repetibilidad del método se muestra en la tabla.

Tabla 18.- Resultados de exactitud y repetibilidad del método

Cantidad adicionada (ppb)	Cantidad recuperada (ppb)	% de Recobro
130	130.0	100.0
130	129.8	99.9
130	129.9	99.9
130	130.1	99.9
130	129.8	99.9
130	129.7	99.7
130	129.7	99.8
<b>Promedio</b>		99.9
<b>Desviación estándar</b>		0.089
<b>% CV</b>		0.089
<b>Intervalo de confianza para recobro</b>		99.8-99.9

# **8. CONCLUSIONES**

## Conclusiones

1. Se partió de un método modificado de la NOM-247-SSA1. Cereales y sus productos donde la tiamina es extraída de la muestra por hidrólisis ácida y oxidada a tiocromo, su contenido es determinado por HPLC en fase inversa con detección fluorométrica.
2. Se eliminó el uso de disoluciones buffer usadas como fase móvil y la cuantificación se realizó utilizando directamente el fluorómetro.
3. Para corroborar que la determinación directa del tiocromo formado en la oxidación de la tiamina en el fluorómetro era factible, se estableció la longitud de onda máxima de excitación y emisión, y se realizaron curvas estándar para determinar la linealidad del método propuesto, y posteriormente se determinó la estabilidad de la disolución estándar de tiamina el cual es de un mes.
4. En el caso de la disolución de ferricianuro de potasio alcalino se observó que existían variaciones en las lecturas de fluorescencia en la misma muestra al ser analizada por lo que se optó por prepararse con un día de anticipación al análisis, después de esto las lecturas se mantuvieron estables.
5. La precipitación de proteínas de la muestra se realizó mediante diferentes agentes precipitantes los cuales fueron ácido tricloroacético, acetonitrilo, alcohol isopropílico-mezcla de sales y finalmente ácido cítrico sólido y en disolución 141.8 mg/mL.
6. Para optimizar la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino se empleó un diseño de experimentos mixto 3x2 con tres puntos centrales, con 4 grados de libertad y resolución V, observando que a mayor volumen de ferricianuro de potasio alcalino (1000  $\mu$ L) presentaba mayor intensidad de fluorescencia.
7. Se concluye que la turbidez en el suero es una interferencia en el análisis porque aumenta la intensidad de fluorescencia.
8. Con cantidades altas de ferricianuro de potasio alcalino se observa precipitación en la solución, por lo cual, requiere filtrarse antes de tomar

lectura de fluorescencia por esta razón se reduce la cantidad de ferricianuro añadido a 200  $\mu\text{L}$ .

9. Al precipitar las proteínas en la muestra con ácido tricloroacético, acetonitrilo, alcohol isopropílico-mezcla de sales no se observa el mismo comportamiento al reproducir los experimentos.
10. Para asegurarse que las altas concentraciones de ferricianuro de potasio alcalino no influyeran en la intensidad de fluorescencia, se realizó una serie de experimentos utilizando una concentración fija de un estándar de tiamina y se modificó la cantidad de ferricianuro de potasio alcalino, esto nos llevó a determinar que, si hay un efecto positivo y que después de 800  $\mu\text{L}$  la fluorescencia disminuye, además de concluir que la concentración óptima es de 150  $\mu\text{L}$ .
11. Al adicionar 420  $\mu\text{L}$  de una disolución de ácido cítrico con una concentración de 141.8 mg/mL a una muestra de 25 mL de leche se obtuvo una mejor precipitación a una temperatura de 8 °C.
12. La disolución estándar de tiamina (1000  $\mu\text{g/L}$ ) fue preparada con una concentración equivalente de ácido cítrico añadida a la muestra, y se elaboraron curvas estándar con esta solución (100-3200  $\mu\text{L}$  en 10 mL). Se obtuvieron buenas correlaciones determinando que el método es reproducible.
13. Al cuantificar la concentración de tiamina en Nutrileche utilizando los mismos volúmenes que los usados en la disolución estándar se encuentra que a partir de 2000  $\mu\text{L}$  de leche, el valor calculado en promedio es 246  $\mu\text{g}/250\text{ mL}$ , lo cual corresponde a un 107 % del reportado en el empaque (230  $\mu\text{g}/250\text{ mL}$ ).
14. El método es reproducible con una linealidad de 0.9991
15. Se obtuvieron límites de detección y cuantificación de 9.9 y 30  $\mu\text{g/L}$  respectivamente.
16. Para la exactitud y repetibilidad se obtuvo un intervalo de confianza de 99.8-99.9 %

17. Con este método se redujeron los tiempos de análisis, menor consumo de reactivos y generación de residuos, lo cual conlleva a una disminución de costos.

# **9.REFERENCIAS**

## Referencias

- Vilaplana i Batalla, Montse. «Alimentacion y neuronas.» *Elsevier* 30, nº 6 (noviembre 2016): 17-20.
- Amjadi, Mohammad, Jamshid L. Manzoori, y Maghsoud Orooji. «The use of crude extract of kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*) as a source of peroxidase in the spectrofluorimetric determination of thiamine.» *Bull. Korean Chem* 28, nº 2 (2007).
- Beaton, G.H, y otros. «Effectiveness of Vitamin A Supplementation in the Control of Young Child Morbidity and Mortality in Developing Countries.» *ADMINISTRATIVE COMMITTEE ON COORDINATION/SUBCOMMITTEE ON NUTRITION*, 1993.
- Black, R., F. Lanata, y F. Lazo. «Delayed cutaneous hypersensitivity: epidemiologic factors affecting and usefulness in predicting diarrheal incidence in young Peruvian children.» *The Pediatric Infectious Disease Journal* 8, nº 4 (April 1989): 210-215.
- Bueno Solano, Carolina. «Optimización de las condiciones cromatográficas para la identificación y separación de tiamina (B1) y niacina (B3).» junio 2006: 1-53.
- Chen, Hengwu, Jingping Zhu, Xiaoxia Cao, y Qiongjun Fang. «Flow injection on-line photochemical reaction coupled to spectrofluorimetry for the determination of thiamine in pharmaceuticals and serum.» *The analyst*, 1998: 1017-1021.
- Claudio González Pérez, Dr. Eladio J. Martín Mateos, Dr<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Jesús Almendral Parra. «Análisis aplicado a la Ingeniería Química, Metodos Voltamperometricos.» salamanca, 2008-09.
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogo. *Guía de validación de métodos analíticos*. 2002.
- Deulofeu Piquet, Ramón. «Tiamina, aspectos actuales y utilidad clinica.» *Educación continuada en el laboratorio clínico*, septiembre 2014: 78-91.
- Edwards, Katie A, Nicole Tu-Maung, Krystal Cheng, Binbin Wang, Antje J. Baeumner, y Clifford E. Kraft. «Thiamine Assays—Advances, Challenges, and Caveats.» *Chemistry Open Reviews*, 2017: 178-191.
- Green, F., y B. Heyworth. «Immunoglobulin-containing cells in jejunal mucosa of children with protein-energy malnutrition.» *Archives of Disease in Childhood* 55 (1980): 380-383.
- Herdandez-Rojas, M., y J.F. Vélez-Ruíz. «Suero de leche y su aplicación en la elaboracion de alimentos funcionales.» *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2014: 13-22.

- Khan, Mir Azam, Seung Oh Jin, Sang Hak Lee, y Hye Young Chung. «Spectrofluorimetric determination of vitamin B1 using horseradish peroxidase as catalyst in the presence of hydrogen peroxide.» *The journal of biological chemical luminescence*, 2008: 73-78.
- Litter M. I, Armienta M. A, Farías S. S. *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. CYTED, 2010.
- Lopez, Enedina Benitez. «Determinacion polarografica de vitamina B12 en preparados multivitaminicos.» Mexico, D.F: UNAM, 1991.
- Maulen-Radovan, I., S. Villagómez, E. Soler, R. Villacaña, L. Hernández-Ronquillo, y J.L. Rosado. «Impacto nutricio del consumo de una leche entera adicionada con vitaminas y minerales en niños.» *Salud Pública de México* 41, nº 5 (1999): 1-9.
- Moliendo Patzi, Marcela Andrea, y Katerin Jhuly Carrillo Larico. «Absorción, excreción y metabolismo de las vitaminas hidrosolubles.» *Revista de actualizacion clínica* 41 (2014): 2146-2150.
- Munson, D., D. Franco, A Arbeter, H. Velez, y J. Vitale. «Serum levels of immunoglobulins, cell-mediated immunity, and phagocytosis in protein-calorie malnutrition.» *The American Journal of Clinical Nutrition* 27 (January 1974): 625-628.
- Pérez Ríos, Mónica, y Alberto Ruano. «Vitaminas y salud. Aportacion vitamínica al organismo.» *Elsevier* 23, nº 8 (septiembre 2004): 11-159.
- PROFECO. «leche, formulas lacteas y productos lacteos combinados.» *el laboratorio profeco reporta*, 2004: 19-29.
- Rosado, J.L, H. Bourges, y B. Saint. «Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información.» *Salud Pública de México* 37, nº 2 (1995): 130-139.
- Rosaldo, J.L., P. López, E. Muñóz, H. Martinez, y L.H Allen. «Zinc supplementation reduced morbidity, but neither zinc nor iron supplementation affected growth or body composition of Mexican preschoolers.» *The American Journal of Clinical Nutrition* 65, nº 1 (january 1997): 9-13.
- Rubaj, Jolanta, Waldemar Korol, Bielecka Grazyna, y Krzysztof Kwiatek. «Determination of thiamine in premixture and compound feed by liquid chromatography method.» *National Feed Laboratory, National Research Institute of Animal Production*, 2008.
- Saad Lapka, Y., y M. Llorens. «Encefalopatía Wernicke-Korsakoff: Revision de un caso clínico.» *Revista de patología dual*, 2015: 1-4.
- Schlesinger, L., y L. Stekel. «Impaired cellular immunity in marasmic infants.» *The American Society for Clinical Nutrition* 27, nº 6 (1997): 615-620.

- Torrades, Sandra. «Aportes extras de vitaminas ¿ son realmente necesarios?» *elsevier* 24, nº 6 (junio 2005): 96-102.
- USAID, Fortification Basics. «Contenido de Macronutrientes de la Leche.» *Fortification Basics is a joint effort of the USAID Micronutrient Programs (OMNI, MOST) and DSM Nutritional Products* 125 (1997-1999): 1-4.
- Viñas, Pilar, Ignacio López García, María Bravo Bravo, Marisol Briceño, y Manuel Hernández Córdoba. «Dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid.» *Springer-Verlag*, 2011: 1061-1066.
- Y. Saad Lapka, M. Llorens. «Encefalopatía Wernicke-korsakoff revisión de un caso clínico.» *revista de patologia dual*, 2015: 1-4.
- Yu, Y, YJ Ching, y YN Tan. «A Simple and Fast Fluorimetric Method for Thiamine (Vitamin B1) Detection by Au<sup>3+</sup>-Mediated Formation of Thiochrome.» *Austin Journal of Biosensors & Bioelectronics* 1 (2015): 1-4.

# **10. ANEXOS**

## **10.1 MOVILIDAD NACIONAL ESTANCIA**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



## **CONVENIO DE MOVILIDAD NACIONAL EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Química de la UNAM Laboratorio 114  
de Electroquímica bajo la supervisión del**

**Dr. Octavio Reyes Salas.**



Dr. José David Ledezma Torres  
Coordinador de Cooperación Internacional  
e Intercambio Académico.  
Universidad Autónoma de Baja California  
PRESENTE.

Me permito hacer de su conocimiento que la **QI. Espíndola Ordoñez Michelle Aline** (Matrícula: **295930**), alumna de maestría en la Universidad Autónoma de Baja California, ha sido **aceptada** en nuestro grupo de investigación para realizar una estancia en relación con su trabajo de tesis.

La señorita Espíndola Ordoñez trabajará en estudios electroquímicos preliminares para la determinación química y electroquímica de la vitamina B1.

La estancia de quince días está prevista del 22 de abril al 06 de mayo de 2018, de acuerdo también con su directora de tesis, la **Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo** de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

Le felicito por el apoyo que la Coordinación a su digno cargo ofrece a sus estudiantes en el marco de la movilidad estudiantil entre universidades hermanadas.

Para cualquier duda o aclaración que fuese necesaria, quedo a su disposición.

Atentamente

“Por mi raza hablará el espíritu”

Ciudad Universitaria a 9 de abril del 2018.

Dr. Octavio Reyes Salas  
Depto Química Analítica Pg.  
Fac. de Química. UNAM  
Tel. 56 22 37 87  
Correo electrónico: [Octavio\\_reyessalas@yahoo.de](mailto:Octavio_reyessalas@yahoo.de)

Ccp: Dr. Luis Enrique Palafox Maestre Director, FCQI. UABC

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

## Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

### Determinación de Tiamina por Polarografía Formando un Complejo con Pb

Reporte de la estancia de investigación realizada por **Q.I Michelle Aline Espíndola Ordóñez con matrícula 295930 y con la Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo como directora de tesis**, durante el periodo del 22 de abril al 5 de mayo de 2018 en la **Facultad de Química de la UNAM** dentro del **laboratorio 114 de Electroquímica** supervisada por el **Dr. Octavio Reyes Salas**.

El objetivo principal de esta estancia es contribuir a la tesis "Cuantificación de Tiamina en Leche por Fluorescencia", para esto se empleó la polarografía como método de análisis, se considera que es posible debido a que la tiamina presenta señales de oxidación y reducción. Los primeros días de la estancia se realizaron búsquedas de referencias sobre análisis polarográficos tanto en base de datos de la UNAM como en artículos externos.

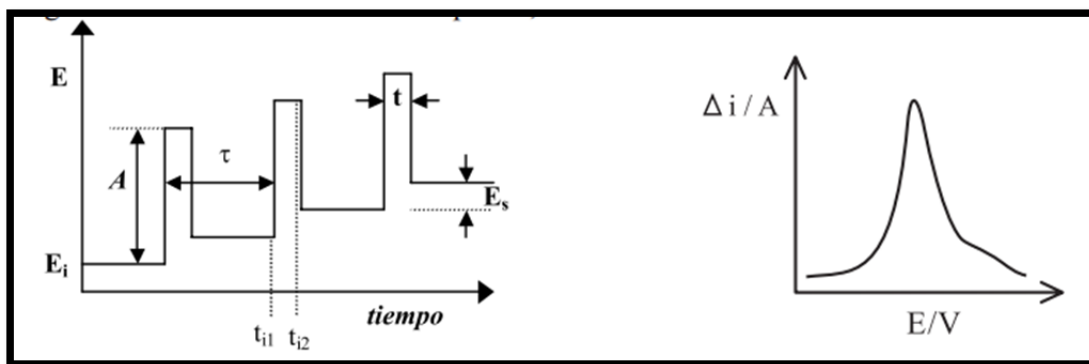
Se realizaron pruebas a la gota con el clorhidrato de tiamina donde se observó que la tiamina podía acomplejarse con plomo, hierro y cobre en medio básico.

Posteriormente se hicieron los análisis por polarografía clásica y diferencial de impulsos para cuantificar el complejo de Pb-tiamina encontrando que se puede encontrar el complejo Pb-tiamina-Pb  $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  y tiamina-Pb-tiamina a concentraciones de  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

La **polarografía** es una técnica utilizada para la determinación de la concentración de la especie electro-activa a partir de la medida de la intensidad de corriente. Esta técnica utiliza normalmente un electrodo indicador de gota de mercurio [1].

**Voltametría Diferencial de Impulsos:** En la voltametría diferencial de impulsos (DPV), el potencial inicial aplicado durante la mayor parte del tiempo de vida de la gota aumenta de gota en gota, en pequeños incrementos de amplitud constante, es un poco antes de la caída de la gota se aplica un impulso de potencial de valor constante durante un tiempo corto. Se miden dos intensidades de corriente en la misma gota: una inmediatamente antes de la aplicación del impulso, al tiempo  $t_1$ ,

y otra inmediatamente antes de la caída de la gota, al tiempo  $t_{i2}$ . El registro se efectúa como la diferencia entre estas dos intensidades de corriente,  $i_2 - i_1$ , en función del potencial, dando origen a voltagramas en forma de "pico" como se puede ver en la Figura 1. El aumento de sensibilidad en esta técnica se debe a la disminución de la contribución de la componente de intensidad capacitiva, una vez que se procede a la sustracción de dos valores relativamente próximos, permitiendo alcanzar límites de detección, para la generalidad de los elementos o



especies, del orden de los  $10^{-7}$  hasta  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>.

Figura 1. Técnica DPV: a la izquierda, la forma de la modulación del potencial con el tiempo y a la derecha, el correspondiente tipo de voltograma  $\Delta i = i_2 - i_1$  vs. V.

En la descripción de la polarografía clásica, las corrientes polarográficas difieren sustancialmente acerca de la dependencia del tiempo. La corriente de difusión ( $i_d$ ) aumenta monótonamente con el tiempo ( $t$ ) según la ecuación de Ilkovic,

$$i_d = K t^{1/6} \quad (1)$$

Donde K es una constante contrariamente, la corriente de carga ( $i_c$ ) disminuye continuamente con el tiempo ( $t$ ) según ecuación de Ilkovic,

$$i_c = K' t^{-1/3} \quad (2)$$

Donde  $K'$  es una constante. Utilizando el tiempo de medida grande, es posible optimizar la relación  $i_c/i_d$ . Por lo que la sensibilidad es mayor si la corriente se

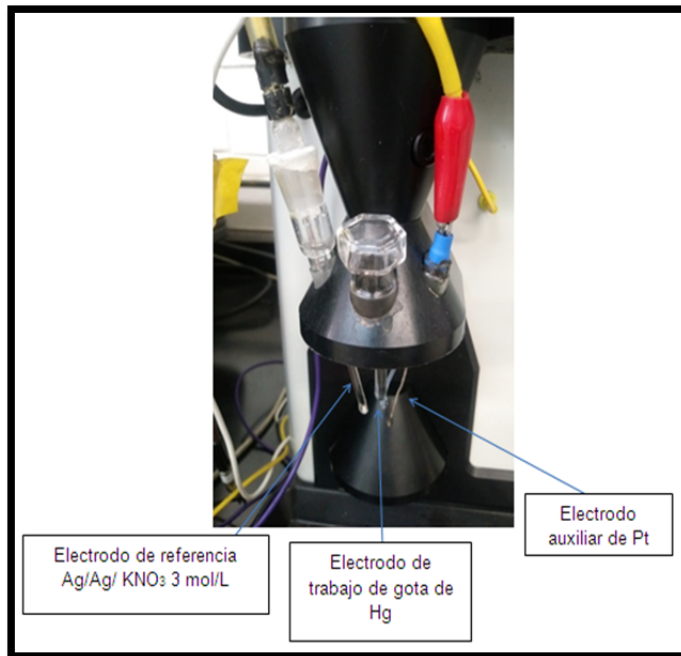
mide inmediatamente antes de la caída de la gota. En polarografía Tast, se mide el valor medio de la corriente en la última fase de la vida de la gota; eliminándose las agudas oscilaciones de la componente no farádica de la corriente. La polarografía Tast tiene un límite de detección hasta  $10^{-6}$  mol/L, lo que representa una mejora en comparación con la polarografía clásica. Cuando se emplea un electrodo estático, se produce una disminución significativa de la corriente capacitiva [2].

Según la literatura se han desarrollado muchos métodos polarográficos para el ensayo de la tiamina. Probablemente el más usado es la oxidación anódica con el electrodo de gota de mercurio en el cual se forma una sal de mercurio y tiene un  $E_{1/2}$  DE -0.40 V/ESC. El límite de detección por ese método es de 20 mg/L [3].

Para este análisis se utilizó un equipo MDE 150 polarographic stand (Figura 2) con un sistema TraceMaster 5 que consta de:

$$E = f (E_o , n, [Ox]/[Red]) \quad (3)$$

- **Electrodo auxiliar de pt:** La corriente fluye entre el electrodo auxiliar y el electrodo de trabajo.
- **Electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 mol/L:** Proporciona un potencial de referencia estable.
- **Celda electrolítica**
- **Potenciostato:** sirve para controlar el potencial (E), pueden hacerse barridos y medir la intensidad de corriente.
- **Capilar de 5 micras**
- **Utilizando una presión de 5 Bar con nitrógeno (liq).**



**Figura 2 Stand MDE 150**

### **Experimentación**

- Los electrodos y la celda electrolítica se enjuagan cuidadosamente con agua destilada antes y después cada análisis.
- Se añaden 10 mL de electrolito soporte con una mosca magnética ( $\text{LiClO}_4$  0.2 mol/L,  $\text{KNO}_3/\text{HNO}_3$  0.5,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ /acetatos 0.5 a pH 4 Y 0.2 mol/L y pH 5.8)
- Se prepara el sistema operativo del equipo
- Se van haciendo pequeñas adiciones en  $\mu\text{L}$  del analito a investigar (clorhidrato de tiamina)

### **Resultados y discusión**

Se realizaron pruebas a la gota para observar si se podía formar algún complejo con la tiamina se probaron cationes tales como  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  añadiendo gotas de NaOH.

Observándose que la tiamina forma complejos con plomo y cobre. Tomando esto como base se hizo una prueba del complejo Fe-Tiamina, Cu-Tiamina y finalmente Pb-Tiamina por polarografía.

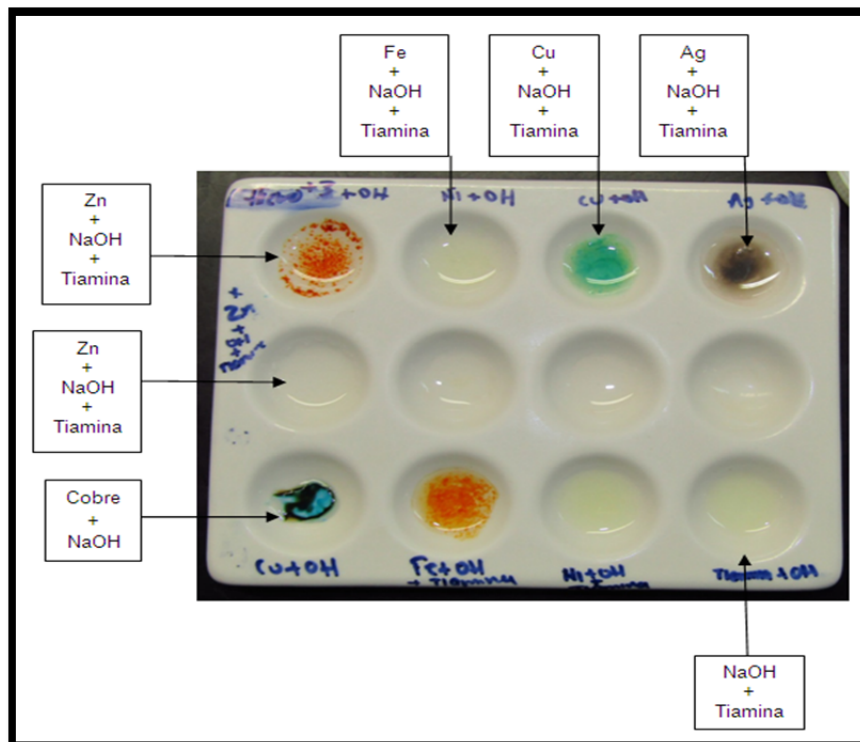


Figura 3. Pruebas a la gota.

### Polarografía clásica y diferencial de impulsos para el estándar de clorhidrato de tiamina $1 \times 10^{-1}$ (0.1 mol/L) en $\text{LiClO}_4$ 0.2 mol/L

Se analizó un estándar de clorhidrato de tiamina pesando 0.337 g de clorhidrato de tiamina aforando a 10 mL (concentración real 0.0999 mol/L) añadiendo 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, y 300  $\mu\text{L}$ . teniendo una concentración final en disolución en la celda electrolítica de  $1 \times 10^{-1}$  mol/L

#### Polarografía clásica

Se observan 3 señales de reducción a potenciales de pico  $E = -1850$  mV,  $E = -1200$  mV y  $E = -1050$  mV y 2 en la oxidación a potenciales de pico de  $E = 315$  mV y  $E = 400$  mV en medio  $\text{LiClO}_4$  0.2 mol/L

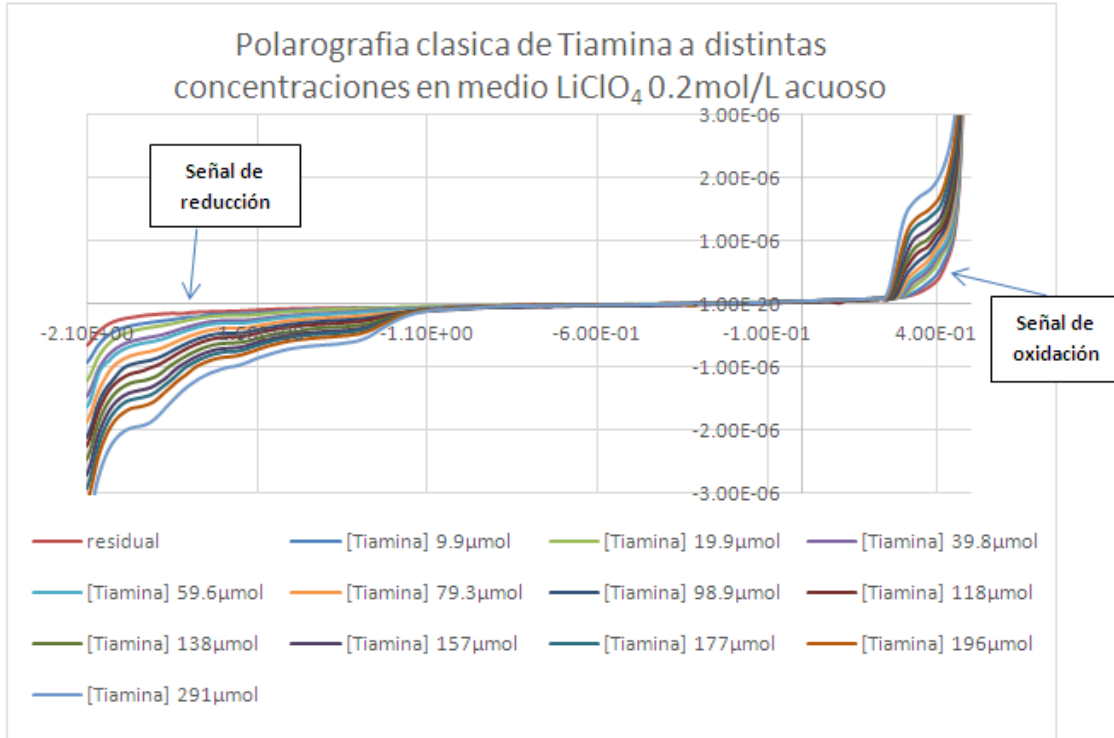


Figura 4 Polarografía clásica de Tiamina en medio  $\text{LiClO}_4$

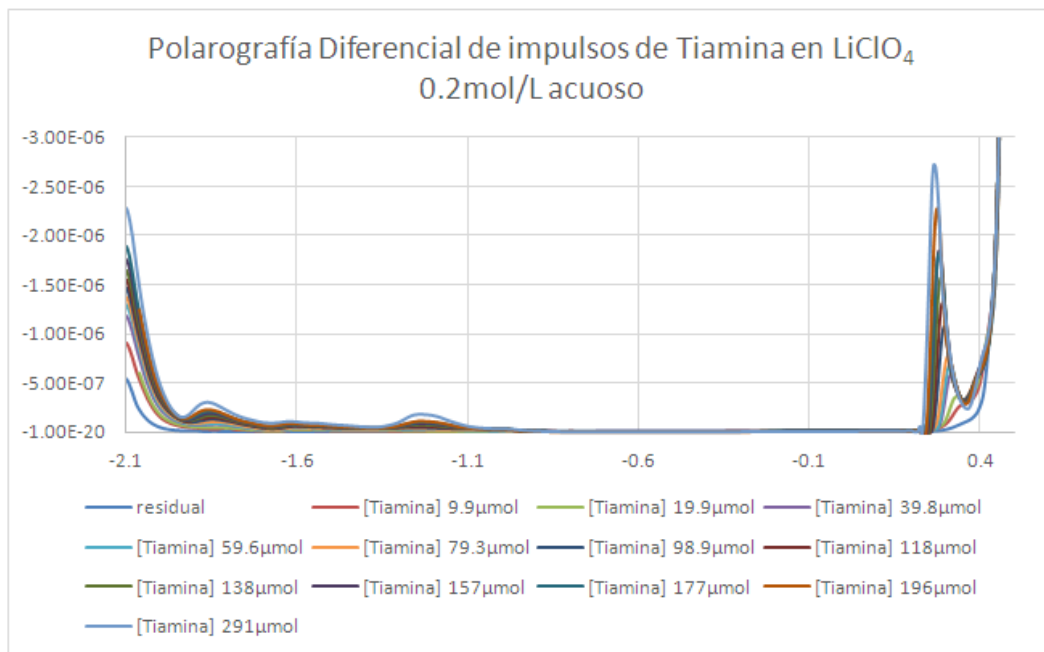


Figura 5 Polarografía Diferencial de Impulsos de Tiamina en  $\text{LiClO}_4$

Se observó que al añadir NaOH a un potencial de  $E = -1850$  mV disminuye lo cual nos indica que es la señal de protones del clorhidrato de tiamina.

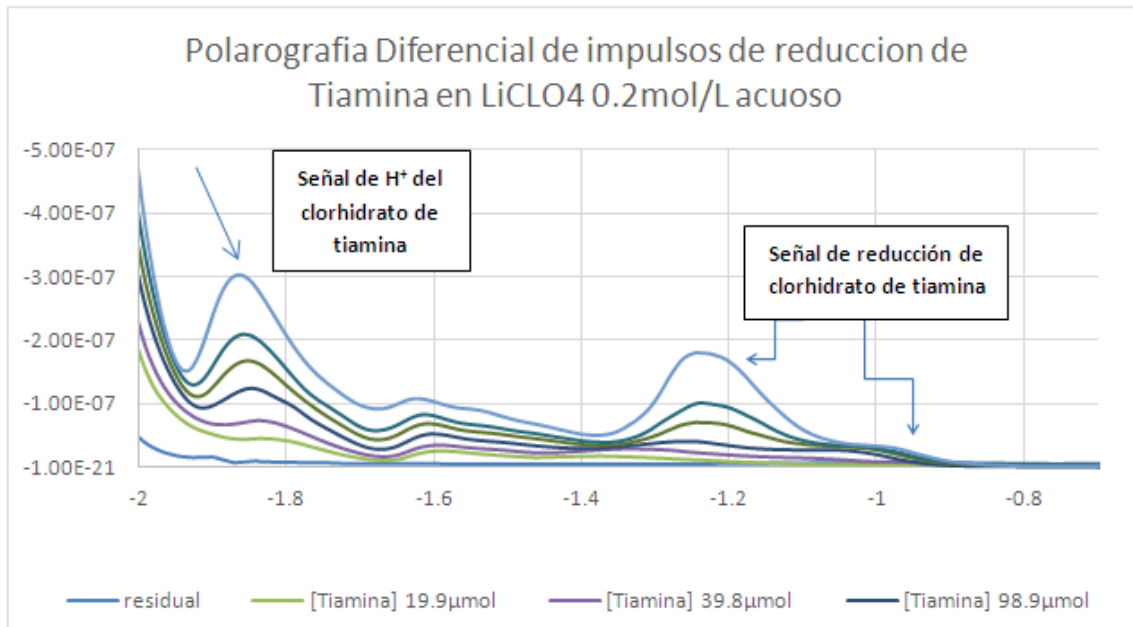
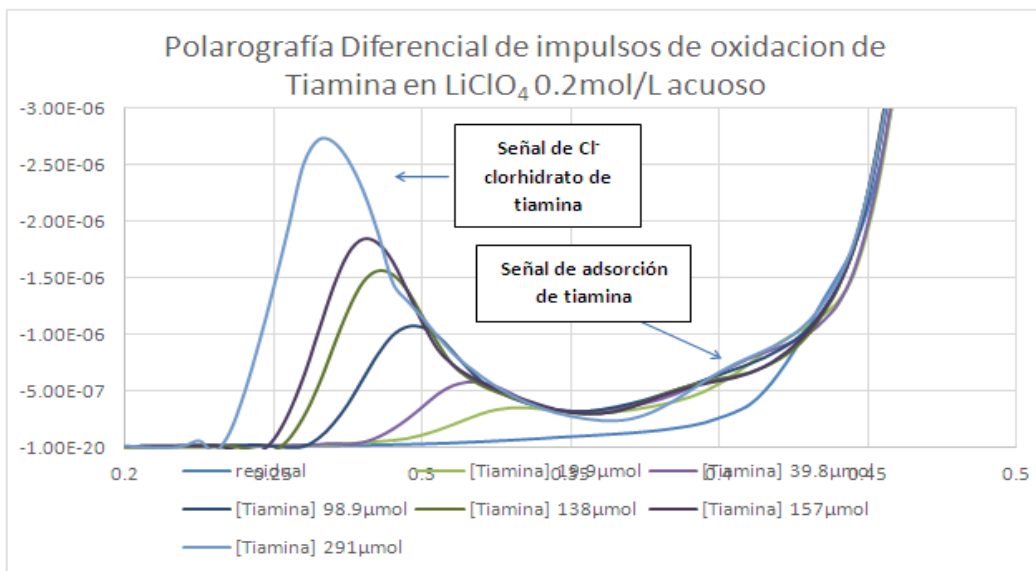
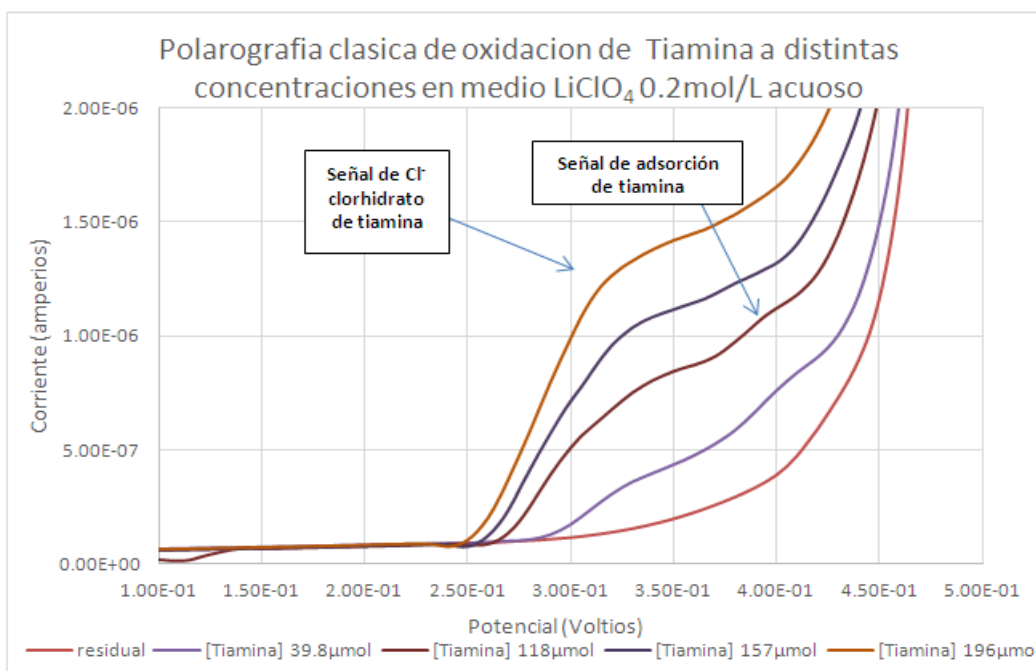


Figura 6 Polarografía Diferencial de impulsos de reducción de tiamina en  $\text{LiClO}_4$  0.2 mol/L acuoso.

La señal de  $\text{Cl}^-$  aparece normalmente a un  $E$  de entre 250 y 300 mV dependiendo del electrolito soporte y en el análisis se observa además de esta señal se observa una adsorción que se cree puede ser del clorhidrato de tiamina.



**Figura 7 Polarografía Diferencial de impulsos de oxidación de Tiamina en LiClO<sub>4</sub> 0.2 mol/L (ac)**



**Figura 8. Polarografía clásica de oxidación de Tiamina a distintas concentraciones en medio LiClO<sub>4</sub> 0.2 mol/L (Ac).**

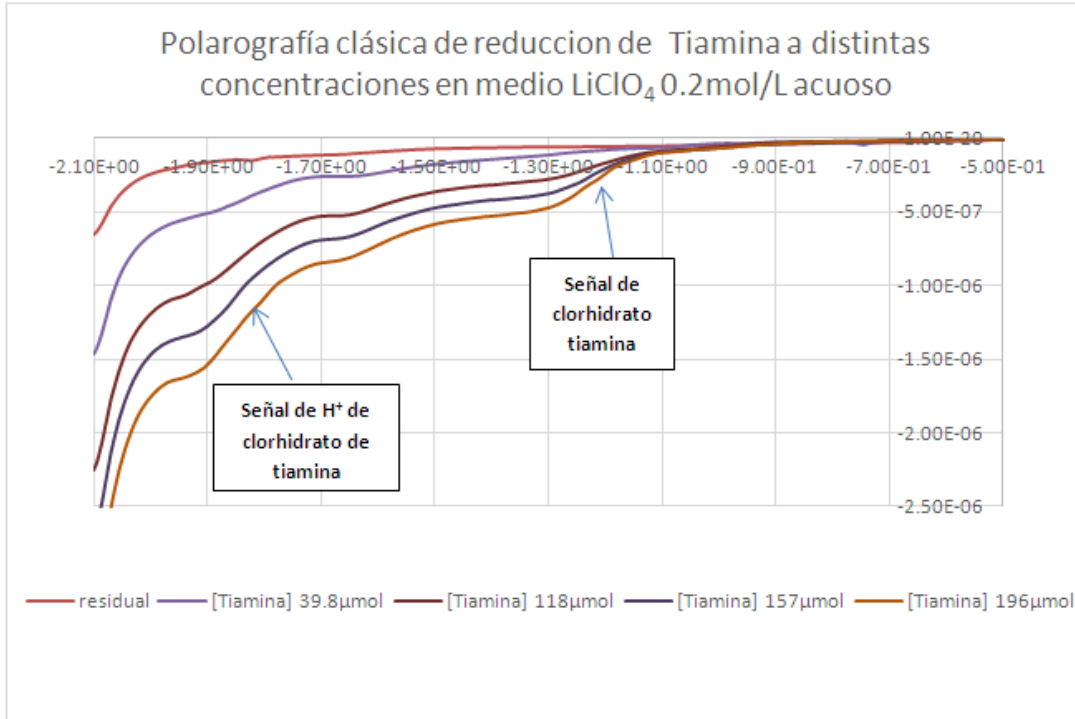


Figura 9 Polarografía clásica de reducción de Tiamina a distintas concentraciones en medio  $\text{LiClO}_4$  0.2 mol/L acuoso.

**Polarografía clásica para el estándar de clorhidrato de tiamina  $1 \times 10^{-1}$  (0.1) en  $\text{LiClO}_4$  0.2 mol/L con  $\text{Cu}^{+2}$  (0.225 mol/L).**

Se realizó el análisis por polarografía clásica de clorhidrato de tiamina con  $\text{Cu}^{+2}$  obteniendo señales de reducción y oxidación de la tiamina apareciendo también las señales de  $\text{Cu}^{+2}$  libre observando que las señales del clorhidrato de tiamina no se ven afectadas por este ya que no se le añadió NaOH por lo tanto no se formó el complejo esperado.

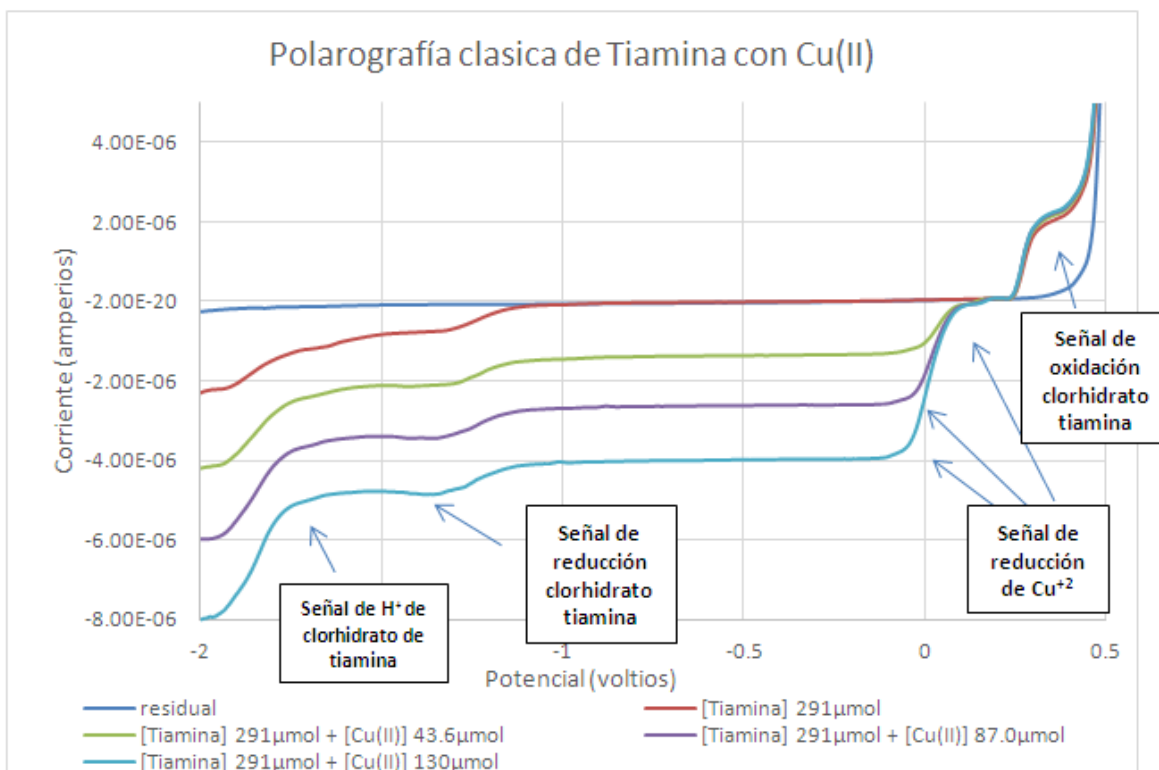


Figura 10 Polarografía clásica de Tiamina con Cu(II).

**Polarografía de impulsos para el estándar de clorhidrato de tiamina  $1 \times 10^{-4}$  mol/L en medio  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaCH}_3\text{CO}_2$  con Pb  $1 \times 10^{-2}$  mol/L a pH 5.8**

Se analizó clorhidrato de tiamina en medio ácido con  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  pero en este análisis no se observó una reacción de la tiamina.

En la figura 11 se puede observar la celda electrolítica del stand donde se encuentran en disolución el clorhidrato de tiamina en medio ácido con  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  y Pb.

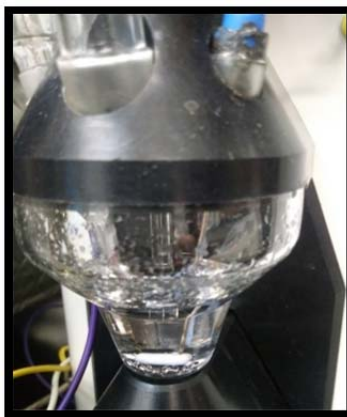


Figura 11 Celda electrolítica.

## CONCLUSIONES

En conclusión se puede decir que es posible determinar clorhidrato de tiamina por polarografía y mediante pruebas a la gota se pudo observar que el clorhidrato de tiamina se puede acomplejar con los cationes de pb, y hierro y se pudo observar la señal de tiamina a un potencial de  $E = -1850 \text{ mV}$ , se pensó que la tiamina también podía acomplejarse con cobre pero mediante el estudio polarográfico se pudo observar que no era así.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a la UABC por darme la oportunidad y el apoyo para ir a esta estancia en la UNAM, seguido por la Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo por su apoyo y atención durante la estancia, a la Maestra Pilar Haro Vázquez que también nos ayudó con las bases para ir mejor preparados a la estancia, al Dr. Octavio Reyes Salas por aceptarnos en su laboratorio de electroquímica y finalmente al laboratorio 114 de electroquímica de la UNAM por su amistad, compañerismo y apoyo por habernos tratado tan bien durante nuestra estadía en la ciudad de México y en el laboratorio.

## REFERENCIAS

- [1] D. E. J. M. M. D. M. J. A. P. Claudio González Pérez, *Análisis aplicado a la Ingeniería Química, Métodos Voltamperométricos*, Salamanca, 2008-09.
- [2] A. M. A. F. S. S. Litter M. I, Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos, CYTED, 2010, p. 185 a 210.
- [3] E. B. Lopez, *Determinación polarográfica de vitamina B12 en preparados multivitamínicos*, México, D.F: UNAM, 1991.



Dr. José David Ledezma Torres  
Coordinador de Cooperación Internacional  
e Intercambio Académico.  
Universidad Autónoma de Baja California  
PRESENTE.

Me permito hacer de su conocimiento que la **QI. Espíndola Ordoñez Michelle Aline** (Matrícula: **295930**), alumna de maestría en la Universidad Autónoma de Baja California, ha **concluido satisfactoriamente su estancia corta** en nuestro grupo de investigación en relación con su trabajo de tesis. Ella trabajó en estudios electroquímicos preliminares para la determinación química y electroquímica de la vitamina B1.

La estancia de quince días se llevó a cabo del 22 de abril al 06 de mayo de 2018, de acuerdo también con su directora de tesis, la **Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo** de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

Le felicito nuevamente por el apoyo que la Coordinación a su digno cargo ofrece a sus estudiantes en el marco de la movilidad estudiantil entre universidades hermanadas.

Para cualquier duda o aclaración que fuese necesaria, quedo a su disposición.

Atentamente

“Por mi raza hablará el espíritu”

Ciudad Universitaria a 4 de junio del 2018.

Dr. Octavio Reyes Salas  
Depto Química Analítica Pg.  
Fac. de Química. UNAM  
Tel. 56 22 37 87

Correo electrónico: [Octavio\\_reyessalas@yahoo.de](mailto:Octavio_reyessalas@yahoo.de)

Ccp: Dr. Luis Enrique Palafox Maestre Director, FCQI. UABC

## 10.2 XXXI CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA 2018




La Asociación Mexicana de Química Analítica A. C. y el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo otorgan la presente

# CONSTANCIA

A: Michelle Aline Espíndola Ordoñez, Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo y María Del Pilar Haro Vázquez

Por la presentación **ORAL** del trabajo: «**CUANTIFICACIÓN DE TIAMINA EN LECHE POR FLUORESCENCIA**». Lo anterior en el marco de las actividades del **XXXI Congreso Nacional de Química Analítica** celebrado del 13 al 15 de junio de 2018 en el Centro de Negocios Universidad - UAEH.

Mineral de la Reforma, Hgo., a 15 de junio de 2018



Dr. Oscar Suárez Castillo  
Director del ICBH-UAEH



Dra. María Teresa Ramírez Silva  
Presidenta del AMQA



Dra. Olivia Zamora Martínez  
Presidenta de la Junta de Representantes-AMQA



Dra. María Elena Páez Hernández  
Comité Organizador-UAEH



## CUANTIFICACIÓN DE TIAMINA EN LECHE POR FLUORESCENCIA

Michelle Aline Espíndola Ordoñez, Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo\*, María Del Pilar Haro Vázquez

Universidad Autónoma de Baja California, FCQI, Tijuana B.C. México, Calzada Universidad No.14418 Parque Industrial Internacional Tijuana B.C C.P 22390, Tel (664) 9797505 Ext. 54317 Fax (664) 6822790, e-mail: michelle.espindola@uabc.edu.mx, gaby@uabc.edu.mx\*

### Introducción

La tiamina (vitamina B1) es esencial para la salud de todos los organismos vivos, su deficiencia se ha asociado durante mucho tiempo con enfermedades en animales como peces, aves, lagartos y mamíferos domesticados. La tiamina también está implicada en varias enfermedades humanas incluyendo Alzheimer, diabetes, demencia, depresión y, más notablemente, síndrome de Wernicke-Korsakoff y enfermedad de Beriberi. Sin embargo, sigue siendo un desafío analítico encontrar un método de detección altamente sensible y específico para tiamina, ya que se requiere su cuantificación a niveles de pM (pico molar) a nM (nano molar) en muestras de diferentes procedencias, y la detección rápida en el sitio sería altamente deseable [1]. Existen métodos analíticos basados en la ventaja de la carga catiónica de la tiamina a través del intercambio iónico para técnicas de aislamiento y separación [2], su detección basada en su actividad en la región del ultravioleta (UV) [3], y en la capacidad de ser oxidada y ser detectada por fluorescencia y quimioluminiscencia [4,5]. Otros métodos por HPLC son utilizados usando gradiente o derivatización postcolumna [6]. La Food Agriculture Organization (FAO por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan consumir 0.4 mg por cada 1000 kcal de ingesta, para la mayoría de las personas [7]. La Ingestión Diaria Recomendada (IDR) ponderada para la población mexicana de acuerdo a la NOM-247-SSA1-2008 es 800 µg [8].

El objetivo de este trabajo es determinar el contenido de tiamina presente en una muestra comercial de leche aplicando el método modificado en la NMX-247-SSA1-2008 [8], aplicando un diseño factorial mixto 3x2 con tres puntos centrales de resolución V para optimizar el volumen del ferricianuro alcalino con el fin de incrementar señal de fluorescencia en la muestra analizada.

### Experimentación

Equipos: Equipo Fluorómetro (Turner Quantech IR Fluorometer) Balanza analítica (Mettler Toledo), Centrifuga (IEC Centra CL2), Micropipetas Epperndorf (10- 100 µL y 100-1000µL).

Reactivos: Ácido clorhídrico (J.T. Baker), Clorhidrato de tiamina (Eastman), Ferricianuro de potasio (J.T. Baker) Hidróxido de sodio (productos químicos de Monterrey) Alcohol isopropílico (Fermont), Sulfato de Sodio Anhidro (Sigma-Aldrich), Cloruro de Sodio (Sigma-Aldrich).

Metodología: Primeramente se realizaron cinco curvas de calibración con el estándar de clorhidrato de tiamina en diferentes días para verificar la respuesta de la señal analítica en un intervalo de 20 a 320 µg L<sup>-1</sup> y se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 1.



Tabla 1. Curva de calibración para Clorhidrato de Tiamina

Tiamina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	FIU
20	590.7
40	1092.7
60	1646.7
80	2144.7
100	2651.9
140	3663.7
180	4869.9
200	5704.8
320	8967.7

#### Procesamiento de muestra

Para eliminar las proteínas se utilizó 50 mL de muestra y se le adiciono 20 mg ácido cítrico, se separaron las fases y se filtró y el sobrenadante se utilizó para realizar el diseño de experimentos.

Posteriormente se utilizó un diseño factorial mixto 3x2 con tres puntos centrales, con 4 grados de libertad y resolución V, en la Tabla 1 se muestra la señal analítica obtenida en FIU (unidades de intensidad de fluorescencia), el volumen adicionado en  $\mu\text{L}$  de muestra procesada y de ferricianuro alcalino, los cuales fueron aforados en matraces volumétricos de 10 mL con agua desionizada.

Tabla 1. Diseño factorial mixto 3x2 con tres puntos centrales

Muestra procesada $\mu\text{L}$	Ferricianuro alcalino (Fa) $\mu\text{L}$	FIU
200	200	158
1700	600	1104
3200	1000	1852
1700	600	1100
1700	600	1107
1700	1000	1230
1700	200	380
200	1000	180
3200	200	510

#### Resultados y Discusión

La cuantificación se basa en la reacción descrita en la NMX-247-SSA1-2008, en la cual la tiamina se transforma en tiocromo, las variantes propuestas son eliminar la extracción con disolvente orgánico y el HPLC, utilizando directamente el fluorómetro.



La tiamina no posee fluorescencia nativa por lo cual se le añade Fa para oxidarla a tiocromo como se muestra en la figura 1, este último produce una luz azul fluorescente que es medida con una  $\lambda_{excitación} = 360 \text{ nm}$  y una  $\lambda_{emisión} = 430 \text{ nm}$ .

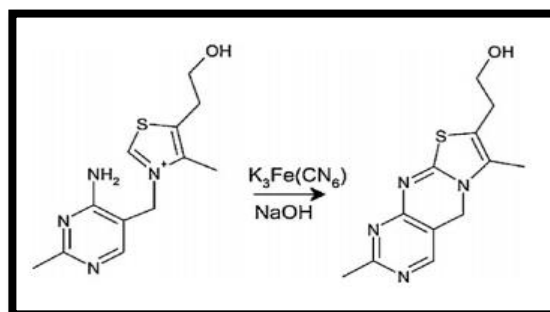


Figura 1. Reacción de oxidación de tiamina a tiocromo usando ferricianuro bajo condiciones alcalinas [1].

En la figura 2 se muestra el efecto que tiene el volumen adicionado del Fa en el volumen de muestra procesada, a mayor volumen de Fa mayor señal fluorescente (FIU).

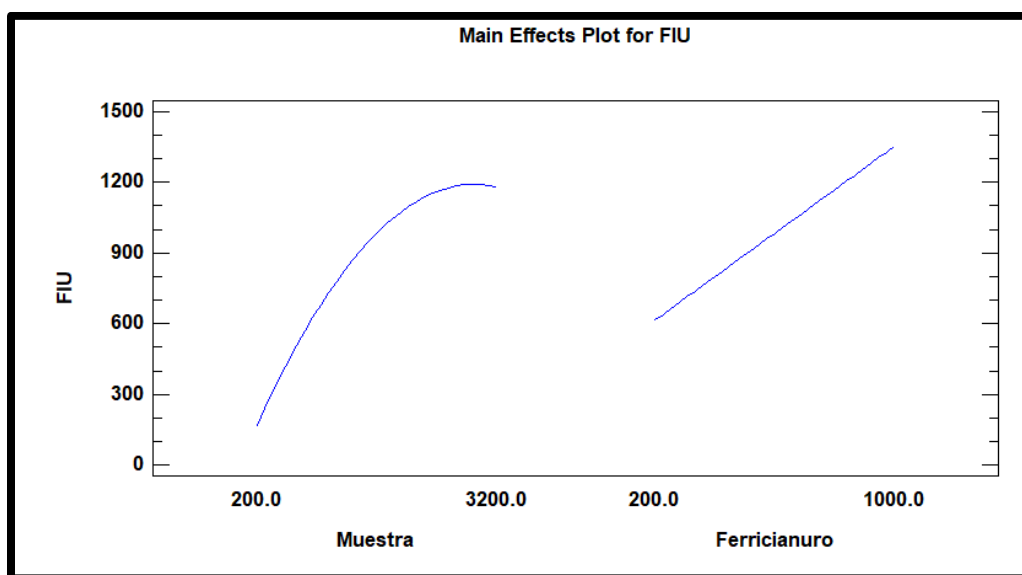


Figura 2. Gráfico de efectos principales

Con el diseño factorial se obtiene la ecuación de regresión lineal múltiple (1) con la cual se puede predecir la intensidad de fluorescencia si se cambia el volumen adicionado de Fa con un coeficiente de determinación de  $r^2 = 0.9552$

$$FIU = 21.0831 + 0.474569 * \text{Muestra} - 0.0125 * \text{Fa} - 0.000137422 * \text{Muestra}^2 + 0.00055 * \text{Muestra} * \text{Fa} \quad (1)$$

En la figura 3 se muestra el gráfico de superficie de respuesta que predice el cambio de intensidad de fluorescencia.

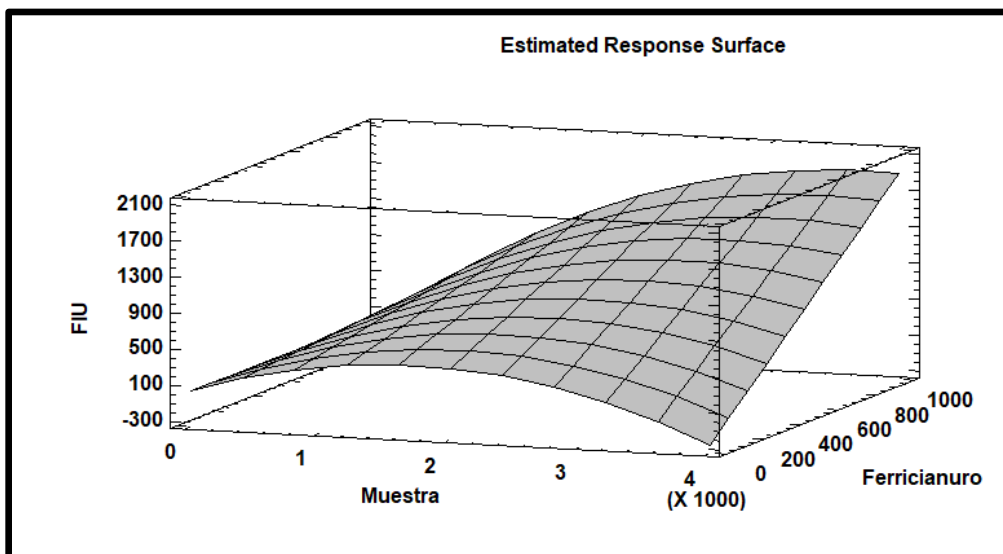


Figura 3 Gráfico de superficie de respuesta para FIU

Para realizar la linealidad del sistema [9] se prepararon estándares de clorhidrato de tiamina con concentraciones descritas en la tabla 1, utilizando 1000  $\mu\text{L}$  de la disolución de Fa aforando a 10 mL, obteniendo la siguiente ecuación de regresión lineal (2) con un coeficiente de determinación de 0.9990:

$$\text{FIU} = 26.458 \cdot [\text{tiamina } \mu\text{g L}^{-1}] + 36.650 \quad (2)$$

En el figura 4 se muestran los resultados obtenidos para la linealidad del método con su respectiva ecuación de regresión y coeficientes.

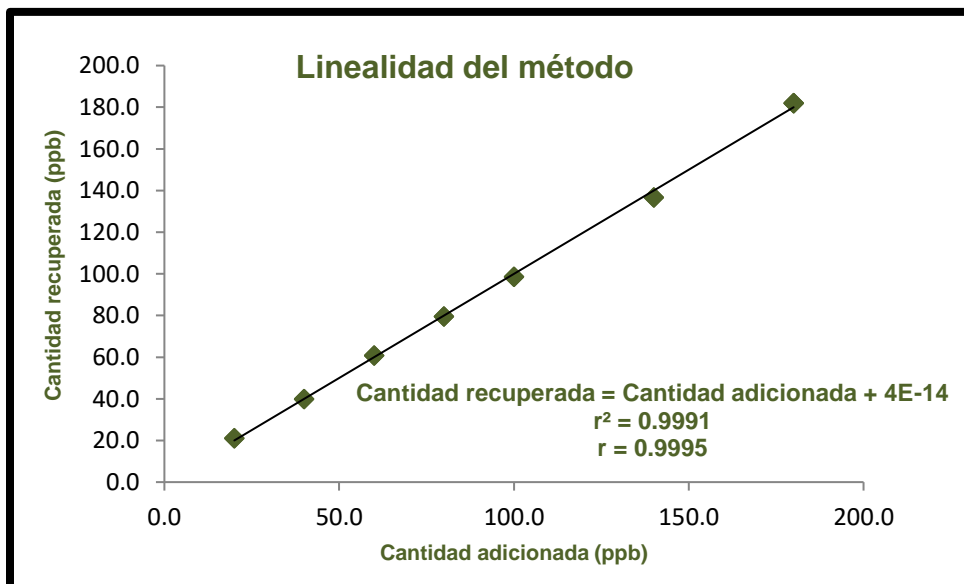


Figura 3. Linealidad el método



Aplicación del método a muestras de leche, se analizaron 3 diferentes lotes y los resultados se muestra en la tabla 5, previamente se realizó la eliminación de proteínas como se aprecia en la figura 4 y descrito en el procesamiento de muestra.



Figura 4. Eliminación de proteínas en la leche

Tabla 5. Determinación de tiamina en leche (Nutri Leche)

Número de Lote	Fecha de caducidad	Cantidad encontrada $\mu\text{g}/250\text{mL}$
J10S5ESYA	07 Feb 2018	201.9
TM1GNORAB	13 Jun 2018	213.7
B0956ERAD	09 Jun 2018	212.6

### Conclusiones

Se logró cuantificar tiamina a partir de muestras de leche comerciales de 3 diferentes lotes cuyo nombre es Nutri Leche la cual indica en su etiqueta que contiene 230  $\mu\text{g}$  por cada 250 mL de leche por fluorescencia mediante la oxidación de tiamina a tiocromo. Los valores obtenidos están por debajo de lo indicado en la etiqueta pero dentro de lo establecido por la OMS y la FAO.

### Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California



## Referencias

- [1] A.K. Edwards, N. Tu-Maung, K. Cheng, B. Wang, A.J. Baeumner, C.E. Kraft. Thiamine Assays—Advances, Challenges, and Caveats, *Chemistry Open* **6** 178-191 (2017)
- [2] D.S. Herr, Synthetic Ion Exchange Resins in the Separation, Recovery, and Concentration of Thiamine. *Ind. Eng. Chem* **37** [7] 631- 634 (1945).
- [3] M. Gratacós-Cubarsí, C. Sárraga, M. Clariana, J.A. García Regueiro, M. Castellari. Analysis of vitamin B1 in dry-cured sausages by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and diode array detection. *Meat Science*. **87**, 234–238 (2011).
- [4] N. Grekas, A.C.Calokerinos. Determination of thiamine by continuous flow chemiluminescence measurement. *Talanta* **37** [11] 1043-1048 (1990).
- [5] C. Zhanga, G. Zhoua, Z. Zhanga, M. Aizawab. Highly sensitive electrochemical luminescence determination of thiamine. *Analytica Chimica Acta* **394**, [2–3], 165-170 (1999).
- [6] E. Pinto, M. Pedersén, P. Snoeijs, L. Van Nieuwerburgh, P. Colepicolo. Simultaneous Detection of Thiamine and Its Phosphate Esters from Microalgae by HPLC. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **291**, 344–348 (2002)
- [7] M.C. Latham. *Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo* (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) Colección FAO: Alimentación y Nutrición **29** Capitulo 11 (2002).
- [8] Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas (2009).
- [9] Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C (2002).