



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Análisis de vitaminas liposobubles (A, D y E)
mediante quimioluminiscencia**

Autor: Álvaro Collado Torres

Fecha: Febrero 2020

Tutor: María Antonia Martín Carmona

INDICE

1. Resumen	3
2. Objetivos	3
3. Introducción	4
4. Metodología	12
5. Resultados y discusión	13
6. Conclusiones	18
7. Bibliografía	19

RESUMEN:

En este trabajo se realiza una búsqueda bibliográfica de distintos métodos disponibles para determinar los niveles de las vitaminas liposolubles A, D y E. Estas vitaminas químicamente se encuadran en un grupo de compuestos insolubles en agua. Son esenciales para los humanos y se requiere un consumo diario con la dieta ya que nuestro cuerpo no es capaz de sintetizarlas por sí mismo. Están involucradas en importantes funciones biológicas dentro del organismo.

Los métodos de análisis de las mismas se basan en la detección de estas vitaminas mediante quimioluminiscencia. La quimioluminiscencia se basa en la emisión luminosa como producto de una serie de reacciones en las que generalmente se produce una oxidación y el producto de la reacción química se genera en estado electrónicamente excitado.

Los métodos quimioluminiscentes revisados han sido comparados con los métodos de referencia (en general, cromatografía de líquidos) que se utilizan para determinar estas vitaminas. Muchos artículos comparan estos métodos analíticos valorando sus ventajas e inconvenientes.

ABSTRACT:

In the present work a bibliographical search of the different available methods to determine the levels of the fat-soluble vitamins A, D and E has been performed.

In this work a bibliographic search of different available methods is performed to determine the levels of the fat-soluble vitamins A, D and E. These vitamins chemically fit into a group of water-insoluble compounds. They are essential for humans and a daily consumption with the diet is required since our body is not able to synthesize them by itself. They are involved in important biological functions within the organism.

The analytical methods are based on the detection of these vitamins by chemiluminescence. Chemiluminescence is based on UV-Vis light emission from an electronically executed state product originated in a sequence of reactions in which oxidation generally occurs.

The chemiluminescence analytical methods have been reviewed in comparison to the reference analytical methods (mostly, liquid chromatography) that are used to quantitate these vitamins. Among the revised articles an important part of them compare these analytical methods, taking into account and evaluating their advantages and disadvantages.

OBJETIVOS:

Realizar una búsqueda bibliográfica lo más extensa posible de los posibles métodos analíticos por quimioluminiscencia que se pueden utilizar para la determinación de las vitaminas liposolubles A, D y E.

INTRODUCCIÓN

Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia se produce cuando tras una serie de reacciones químicas en las cuales generalmente se produce oxidación se generan especies electrónicamente excitadas. Para ello uno de los productos intermedios o finales de la reacción cuando pase de su estado excitado a su estado fundamental debe emitir radiaciones electromagnéticas, generalmente en la región del visible o infrarrojo cercano, este exceso de energía que se produce en la reacción dependerá de la estructura molecular de estos productos.

En la mayoría de las reacciones de quimioluminiscencia se oxida un sustrato, por lo que se emplean sustratos oxidables y oxidantes como el O_2 , el peróxido de hidrógeno, ATP y NADH junto con los compuestos luminiscentes para poder medir las concentraciones de estos componentes de la reacción o como indicadores de sustratos o enzimas que participen en la reacción. (García et al., 2009)

Estas reacciones se clasifican en:

- Quimioluminiscencia directa: La reacción parte de dos reactivos que serán el sustrato oxidable y un compuesto oxidante, estos reaccionarán generando un intermediario electrónicamente excitado, este cuando pase de su estado excitado a su estado fundamental emitiendo radiaciones electromagnéticas. Hay casos en los que para aumentar el rendimiento de la reacción se emplean catalizadores que actuarán reduciendo la energía de activación.
- Quimioluminiscencia indirecta: En este tipo de quimioluminiscencia se precisa la intervención de un fluoróforo de forma que cuando produzca la reacción se transfiera la energía al fluoróforo para que este quede excitado y al pasar a su estado fundamental emita las radiaciones electromagnéticas. (Meseguer et al., 2004)

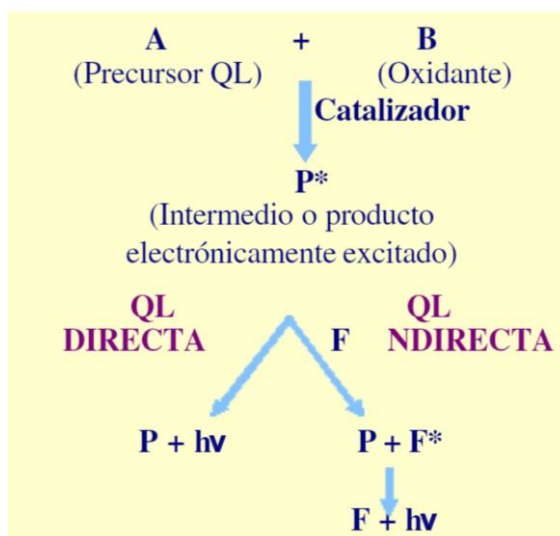


Figura 1: Tipos de reacciones quimioluminiscentes. (Tomado de Meseguer et al., 2004)

Unos ejemplos de reactivos quimioluminiscentes que intervienen en varias reacciones son:

- Luminol: (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona), este reactivo se utiliza principalmente en reacciones quimioluminiscentes directas en fase líquida. Para que se produzca su oxidación a 3-aminofalato necesitan un oxidante fuerte como pueden ser permanganato (MnO_4^-), hipoclorito (ClO^-), el yodo (I_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es uno de los más usados. Aparte necesitan para conseguir una mayor eficacia un catalizador como por ejemplo diversos metales de transición como el Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} . En esta reacción se suele utilizar un pH entre 8 y 11 en función del catalizador siendo el mejor medio el tampón carbonato con un pH de 11. (Meseguer et al., 2004)

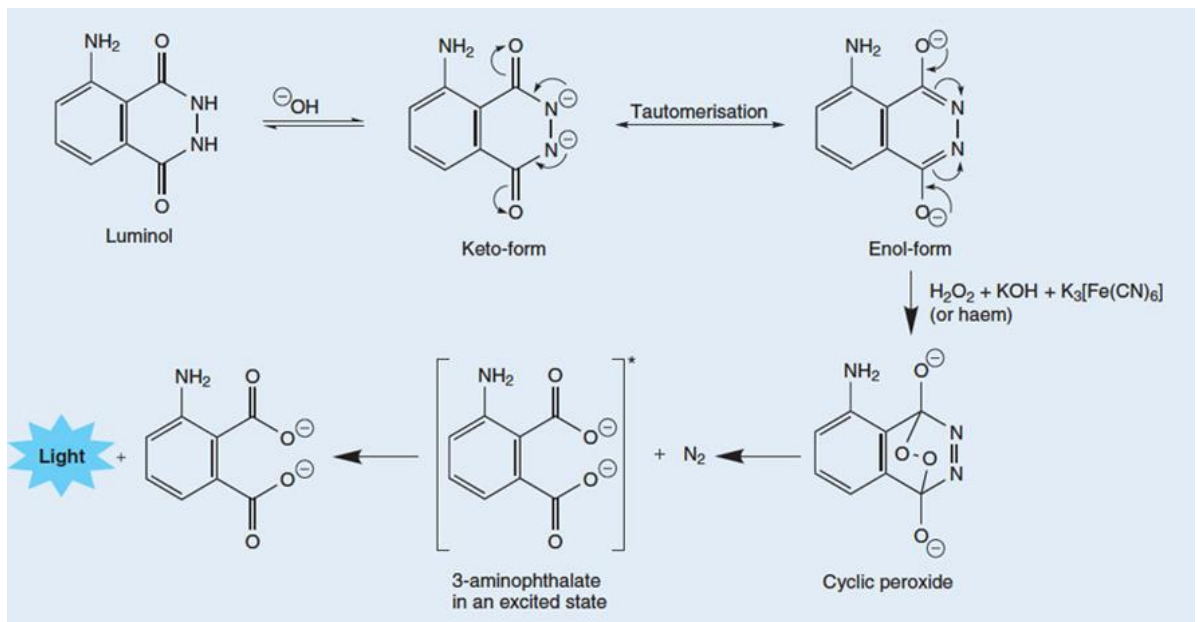


Figura 2: Reacción quimioluminiscente del luminol en medio alcalino, secuencia de reacciones y emisión de fluorescencia. (Tomado de Shaw, et al., 2002).

- Esteres de acridinio: En esta reacción no es necesario el uso de catalizadores ya que solo es necesario el uso de H_2O_2 en medio básico con un pH entre 12 y 13 para obtener el mayor rendimiento cuántico de quimioluminiscencia, lo que supone una ventaja con respecto al luminol. El producto de esta reacción es la formación de N-metilacridona en estado excitado que emite luz a 440nm. Estos derivados se utilizan mucho como marcadores de proteínas en inmunoanálisis y estudios de ADN. (Meseguer et al., 2004)

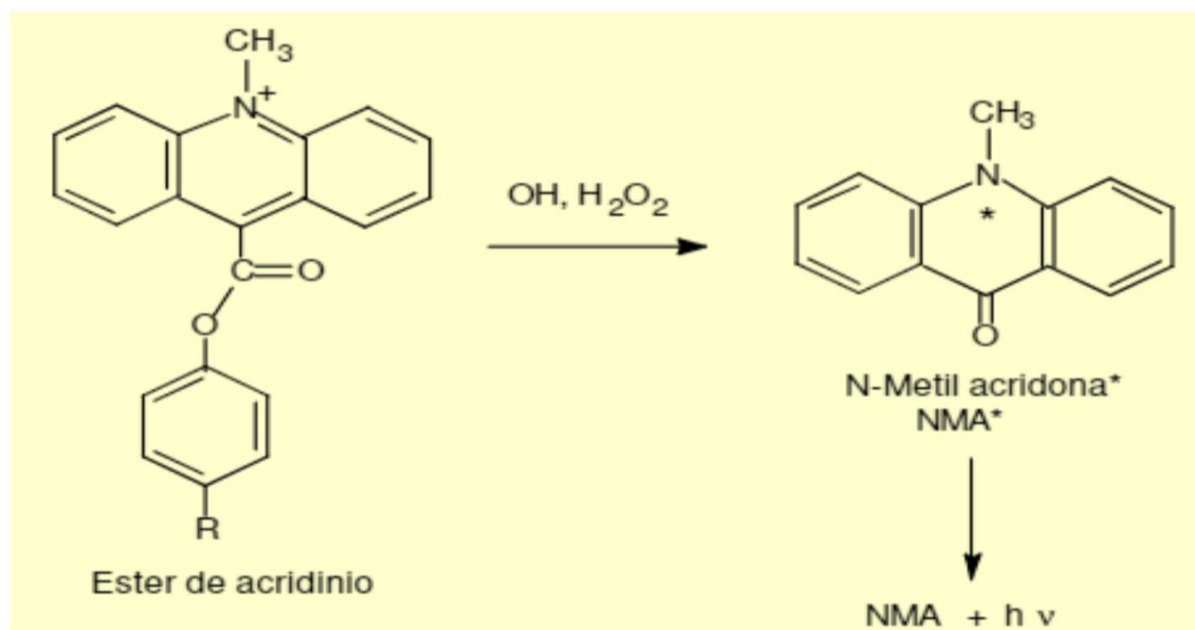


Figura 3: Mecanismo de reacción quimioluminiscente de los ésteres de acridinio. (Tomado de Meseguer et al., 2004)

- Lucigenina: nitrato de bis-N-acridinio, se oxida con peróxido de hidrógeno en medio alcalino de la misma forma que los ésteres, aunque carezca del grupo éster. Necesitan la presencia de catalizadores que serán los iones metálicos de transición.
- Peroxioxalatos: Uno de los reactivos quimioluminiscentes más empleados en los casos de quimioluminiscencia indirecta son los peroxioxalatos. En este tipo de reacciones se produce la oxidación mediante el peróxido de hidrógeno de un éster ariloxalato en presencia de un fluoróforo. Durante la reacción se genera un intermedio de alta energía que forma un complejo con el fluoróforo, el fluoróforo pasa a su estado excitado ya que le cede un electrón al intermedio mencionado anteriormente. La emisión de luminiscencia se produce cuando el fluoróforo regresa a su estado fundamental por lo tanto cuanto más facilidad haya para que se oxide el fluoróforo mejores condiciones de emisión quimioluminiscente se obtendrán. (Meseguer et al., 2004)

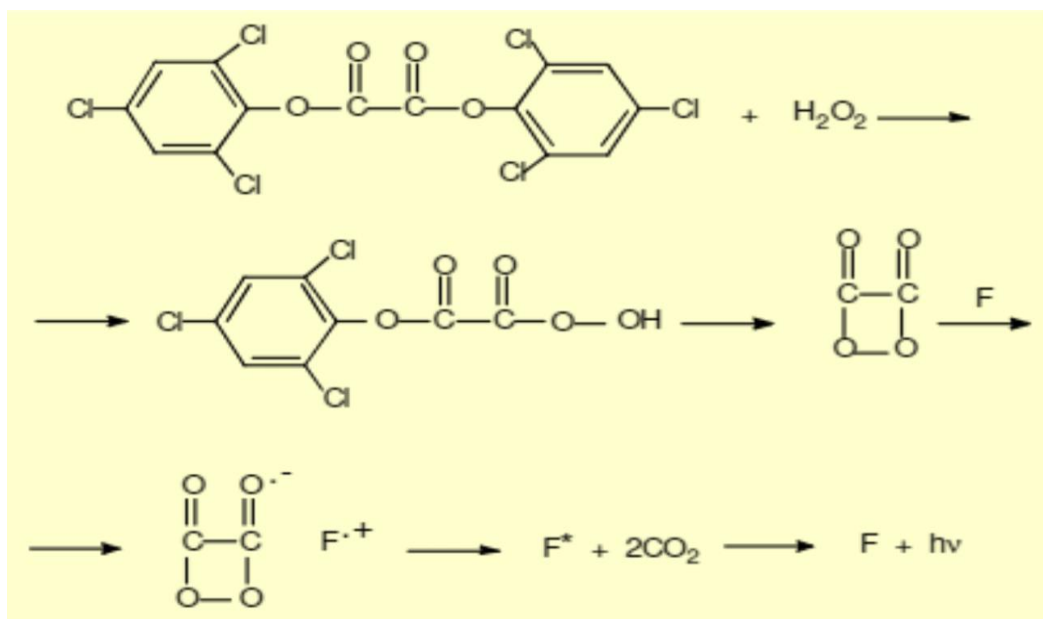


Figura 4: Mecanismo de reacción quimioluminiscente del TCPO. (Tomado de Mesguer et al., 2004)

La concentración de los compuestos químicos que interviene en las reacciones quimioluminiscentes influirá en la intensidad de la emisión de las radiaciones electromagnéticas por lo que estas reacciones se emplean para detección sensible de analitos de interés clínico.

Algunas de las ventajas de estos sistemas para el análisis de analitos son:

- Elevada sensibilidad detectando incluso femtogramos (10^{-15} g), un gran intervalo de concentraciones y compuestos quimioluminiscentes estables.
- No se produce ruido de fondo ni dispersión al no necesitar una previa radiación excitadora.
- Se trata de una metodología rápida y versátil ya que se puede determinar una gran variedad de analitos de la reacción que intervenga en la reacción, obteniendo resultados rápidos no superando los 15 minutos en la mayoría de los casos con un buen intervalo de respuesta lineal.
- No se necesitan equipos muy sofisticados.

En cuanto a las limitaciones o desventajas de estos sistemas quimioluminiscentes destacan:

La posibilidad de que los catalizadores se consuman antes de finalizar la reacción en su totalidad, por lo que habrá que tener varios factores muy controlados como pueden ser la estructura química del reactivo quimioluminiscente, la naturaleza del catalizador y la temperatura (García et al., 2009)

Significación biológica de las vitaminas liposolubles A, D y E:

- Vitamina A:

Es una sustancia esencial para el organismo ya que este no puede sintetizarla por sí mismo por lo que tiene que obtenerla a partir de la dieta, es soluble en solventes orgánicos, en grasas y aceites. Tradicionalmente se considera que hay dos fuentes de vitamina A: la vitamina A o retinol la cual se encuentra principalmente, en aceite de hígado de pescado, en la yema del huevo y en productos lácteos; y por otro lado la provitamina A encontrados en vegetales mayoritariamente, frutas, aceite de palma rojo...

Entre las funciones biológicas de la vitamina A destaca su intervención en la fisiología de la visión formando parte de la rodopsina, una proteína presente en la membrana de los bastones responsables de la visión, tiene un papel muy relevante en el crecimiento y en la reproducción. (Codoceo et al., 1999)

La concentración plasmática de esta vitamina debe estar entre 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en adultos y 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en niños, cuando la concentración en el organismo es inferior a ese intervalo se empiezan a usar las reservas hepáticas para devolver la concentración en suero a los valores normales. Si se continúa con una ingesta baja de vitamina A durante un tiempo prolongado pueden producirse alteraciones que cursan con manifestaciones clínicas como pueden ser: daños en funciones sensoriales afectando el oído, el olfato, la visión de los colores o la adaptación a la oscuridad. Otro problema si continúan disminuyendo los niveles de vitamina A por debajo de 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ puede ser la hiperqueratosis de la piel que suele ser de los primeros síntomas que aparece unido a xeroftalmia como producto de la metaplasia escamosa del epitelio secretor produciendo sequedad en el ojo debido a que no se forma de manera normal la capa que rodea la lágrima. (Cáceres et al., 2013)

- Vitamina D:

Cuando hablamos de la vitamina D estamos englobando a la vitamina D3 (el colecalciferol) la cual se obtiene mediante la irradiación de rayos ultravioleta B a partir del 7-deshidrocolesterol en humanos y animales y a la vitamina D2 (ergocalciferol) producida en plantas, levaduras y hongos produciéndose la radiación UVB sobre el ergosterol.

Tanto la vitamina D2 como la D3 son compuestos inactivos que deberán de sufrir transformaciones mediante su absorción en el organismo para encontrarse en su forma activa. Esta vitamina es transportada unida a la proteína transportadora DBP (Vitamin D binding protein), una vez llega al hígado es cuando se produce su hidroxilación formando calcifediol o calcidiol (25-hidroxivitamina D) empleado para evaluar los niveles de vitamina D. El calcifediol se une a su proteína transportadora y llega a la membrana de las células tubulares renales para introducirse dentro y llegar a la mitocondria donde será transformada a 1,25 (OH)₂D, forma biológicamente activa y realizará su función en la homeostasis del fósforo y del calcio, participando en la absorción intestinal del calcio, consiguiendo que la transmisión muscular sea adecuada y produciendo un recambio mineral óseo adecuado. (Martínez et al., 1999)

Se recomienda ingerir 300 U.I. de vitamina D en niños, 200 U.I. en adultos, llegando a 400 en mujeres menopaúsicas y hasta 800 en ancianos según la FDA, ya que la síntesis de vitamina D se ve afectada por factores como la cantidad de melanina y la edad aparte de los factores ambientales. (Miranda et al., 2009)

Una de las principales causas de la deficiencia de vitamina D es una insuficiente exposición a la luz solar ya que es la principal responsable de la activación de la vitamina D en humanos. Otra causa de déficit de vitamina D en una dieta escasa en esta vitamina o que haya alteraciones a la hora de su absorción o en los procesos que sufre la vitamina D para transformarse en su forma activa, estas situaciones podrían producir raquitismo hereditario en niños u osteomalacia en adultos pudiendo contribuir a una futura osteoporosis, además de posibles complicaciones en lesiones óseas o mayor facilidad para que se produzcan fracturas óseas. (Martínez et al., 1999)

- Vitamina E

La vitamina E engloba a un grupo de ocho sustancias naturales, dentro de los cuales se incluyen los tocoferoles y los tocotrienoles (α , β , γ , y δ). También pertenece al grupo de vitaminas liposolubles ya que es un derivado de estructura isoprenoide y es soluble en grasas, aceites y disolventes orgánicos. Son compuestos esenciales y su aporte al organismo se realiza mediante la dieta.

La vitamina E se encuentra mayoritariamente en el aceite de los vegetales como la soja, maíz, algodón y girasol; también se pueden encontrar en mantequilla, huevo, guisantes y tejido adiposo de los animales. La distribución de los tocotrienoles es distinta a la de los tocoferoles ya que se encuentran en mayor proporción en el aceite de la semilla de palma. Se sugiere una ingesta diaria de entre 3 y 4 mg diarios en lactante y en 8 y 10 mg en adultos. (Sayago et al., 2007)

La vitamina E está implicada en funciones del organismo como pueden ser la proliferación celular, acción fagocítica del sistema inmune, frena el desarrollo de la enfermedad del Alzheimer, ayuda a reducir los niveles de colesterol. Como función más importante, cabe destacar su papel como antioxidante actuando junto con otras moléculas y enzimas protegiendo a las células de los efectos perjudiciales de los radicales libres impidiendo la oxidación de membranas celulares. (Febles et al., 2002)

La carencia de vitamina E en el organismo puede manifestarse produciéndose como primeros síntomas la hiporreflexia y la ataxia límbica y troncal que se caracterizan por la forma de andar, oftalmoplejia, debilidad muscular y pérdida del campo visual. Cuando ya nos encontramos con carencias más prolongadas en el tiempo pueden aparecer síntomas como acortamiento en el tendón de Aquiles, escoliosis y pie cavo. (Codoceo et al., 1999)

Tabla 1: Funciones, síntomas de carencia, síntomas de sobredosis y fuentes de las vitaminas liposolubles A, D y E. (Tomado de Palacios et al., 2009)

LIPOSOLUBLES	Funciones	Síntomas de carencia	Síntomas de sobredosis	Fuentes dietéticas
A (retinol)	Formación de tejidos. Correcta función visual.	Trastornos importantes de la visión. Alteraciones en tejidos diversos.	Dolor de cabeza, vómitos, problemas cutáneos, sequedad de mucosas, inflamaciones óseas, falta de apetito.	Vegetales verdes y naranjas (como precursores) y en hígado, lácteos y derivados enteros (como sustancia activa).
D (calciferol)	Crecimiento y desarrollo del esqueleto. Favorece la absorción de calcio.	Mala recuperación de lesiones óseas. Raquitismo (en niños) y osteomalacia (en adultos). Predispone a fracturas óseas.	Depósitos de calcio en órganos, vómitos, diarreas, debilidad muscular, trastornos renales.	Exclusivamente fuentes animales (productos lácteos enteros, hígado, pescados grasos) y sol (activador de la formación a partir de precursores).
E (tocoferol)	Antioxidante de los tejidos. Protectora y reparadora de tejidos dañados y glóbulos rojos.	Posible anemia.	Poco conocidos.	Semillas, frutos secos, aceites vegetales, vegetales de hoja verde.

Métodos de análisis de vitaminas liposolubles:

Existen una gran variedad de métodos analíticos para la determinación de vitaminas liposolubles. Entre ellos destacamos la cromatografía líquida y la quimioluminiscencia.

Uno de los métodos empleados para la determinación de vitaminas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

Durante la década de los 70 fue cuando esta técnica alcanzo una gran difusión y hasta hoy es una de las técnicas más utilizadas en laboratorios de análisis. (Huetos et al., 2004)

Según la IUPAC: `` La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales estacionaria, mientras que la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa. ``

En cromatografía de líquidos nos encontramos con dos modos de separación principalmente: la cromatografía en fase normal y en fase inversa. La de fase normal emplea una fase estacionaria polar como por ejemplo sílice o alúmina y una fase móvil apolar como ciclohexano o tetracloruro de carbono. Este tipo de separación se aplica principalmente cuando el analito que se va a determinar es polar.

En el caso de la de fase inversa se utiliza una fase móvil polar y una fase estacionaria apolar, este tipo de cromatografía suele emplearse más a menudo debido a que al utilizar una fase móvil polar nos a permitir separar una gran variedad de compuestos de interés. (Huetos et al., 2004)

Los parámetros del HPLC son:

- Diámetro interno de la columna: posee gran importancia ya que la sensibilidad del método y la cantidad de muestra que se puede cargar en la columna dependerá del diámetro de la misma. Se pueden utilizar diámetros de entre 2 y 4 milímetros.
- Tamaño de las partículas: Las partículas más utilizadas y con las que se consigue una mejor separación son las de 5 μm de diámetro ya que aportan mayor superficie, aunque por el contrario se necesitará aplicar una presión mayor.
- Tamaño del poro: Los poros de mayor medida aportan una cinética mejor mientras que las partículas con un tamaño de poro más pequeño aportan una superficie mayor.
- Presión del sistema: La presión del sistema varía según el tamaño de partícula, aunque actualmente se utilizan presiones altas para poder utilizar un tamaño de partículas menor ofreciendo un flujo reproducible y constante. (Reyes et al., 2019)

Componentes de un equipo de HPLC:

- Bomba: es la encargada de generar gradientes que deben ser constantes y necesitará sistemas que regulen el caudal de la fase móvil, debe ser capaz de trabajar a altas presiones.
- Sistema de inyección: es el encargado de incorporar la muestra al sistema.
- Tubos de conexión: del tamaño del diámetro del tubo va a depender la eficacia del sistema, por lo que se utilizan tamaños de diámetro pequeños para que no se produzca la difusión de los solutos ni el ensanchamiento de los picos.
- Columna: Es el lugar que contiene la fase estacionaria y es donde se separan los analitos, se pueden utilizar precolumnas cromatográficas cuya función será proteger y alargar la vida de las columnas.
- Detector: debe cumplir las siguientes características: especificidad y precisión.
- Se pueden incorporar otros dispositivos para optimizar el funcionamiento como por ejemplo añadir un sistema de visualización de datos, inyectoros automáticos, el uso de un segundo detector, hornos termostatizados, etc. (Reyes et al., 2019)

Otra técnica que se suele emplear es la combinación de la cromatografía líquida (LC) con es la espectrometría de masas (MS), combinando la cromatografía como método de separación y la espectrometría de masas como método de detección, identificación y cuantificación de los compuestos que se analicen.

Estos equipos tienen dos tipos diferentes de interfases que son la interfase de tipo Electropray (ES) en la cual se produce la desolvatación y evaporación de los iones preformados en la fase líquida y se utilizan caudales bajos, y la interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI) en la que la ionización se realiza en la fase de gas y se usan caudales de hasta 1 mL min^{-1} , ambas se incluyen dentro de la ionización a presión atmosférica (API).

Las ventajas que presenta API son principalmente que los valores de volumen utilizados en la fase móvil en API son más próximos a los que se utilizan en la cromatografía líquida, además se trata de un método con gran sensibilidad y de fácil manejo. (Quintela et al., 2005)

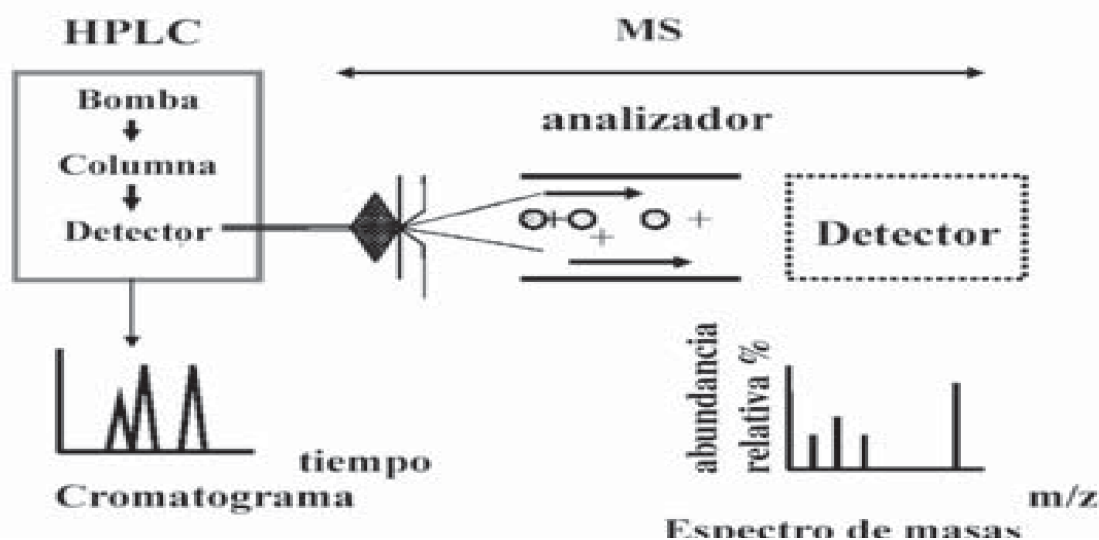


Figura 5: Esquema de un equipo de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas. (Tomado de Martín et al., 2010)

METODOLOGÍA

En este trabajo se ha realizado una extensa búsqueda bibliográfica tanto en castellano como en inglés en las siguientes bases de datos: PubMed y Science Direct y además ayudándonos del buscador Google Scholar.

Se han usado como palabras clave: quimioluminiscencia, métodos analíticos, vitaminas liposolubles, vitamina A, vitamina D, vitamina E, HPLC, cromatografía líquida, espectrometría de masas, RIA, FIA.

Cabe destacar que en la búsqueda en castellano se ha observado a medida que avanzan los años la cantidad de artículos que recogían las palabras clave de "métodos analíticos por quimioluminiscencia para vitaminas liposolubles" ha ido aumentando, se realizó la búsqueda cada 5 años desde el 2004 hasta el 2009 encontrando tan solo 187 artículos, del 2009 al 2014 se encontró 396 y en estos últimos 5 años desde 2014 hasta el final del 2019 se recogieron 452 artículos.

Se realizó exactamente la misma búsqueda en inglés usando como palabras clave: “Chemiluminescence analytical methods for fat soluble vitamins” con los mismos intervalos por años obteniendo 9160 artículos entre 2004 y 2009, del 2009 al 2014 se encontraron 11800 y por último se hizo la búsqueda desde 2014 al 2019 encontrando 12600 artículos, por lo que se observa que a medida que pasa el tiempo se va avanzando e investigando más a fondo este tema.

RESULTADOS Y DISCUSION

Vitamina D:

Como se ha comentado anteriormente hay dos formas de vitamina D: el colecalciferol (vitamina D₃) que se produce mediante la exposición de la piel a la radiación UV del sol y el ergocalciferol (vitamina D₂) que se encuentra principalmente en los vegetales y obtenemos a través de la dieta. A la hora de determinar esta vitamina en suero lo que se va a detectar es la 25-OH vitamina D total en sangre ya que es la forma en la que se transporta y la empleada para determinar sus depósitos, aunque el metabolito activo sea la 1,25(OH)₂ vitamina D.

Hay distintos métodos para su determinación como pueden ser HPLC, RIA, LC-MS/MS (cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem) considerada la técnica “gold estándar” pero esta requiere una instrumentación de un coste elevado, el empleo de personal especializado y muy costosa, por lo que hace complicado su implementación en el uso rutinario de los laboratorios clínicos. Los inmunoensayos por quimioluminiscencia son mucho más accesibles por los laboratorios clínicos en el ámbito diario por lo que constituyen una técnica de elección por su selectividad y sensibilidad comparables a los métodos radioquímicos (RIA) o a la cromatografía de líquidos asociada a la espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS).

Existen varios inmunoensayos comerciales automatizados distintos para la determinación de vitamina D como pueden ser el Cobas e411 de Roche, el kit para 25 OH vitamina D de Architect i4000, el Liaison de Diasorin o el analizador Advia Centaur de Siemens.

- Advia Centaur (Siemens):

Este método realiza un ensayo total de la vitamina D (tanto la D₂ como la D₃) que es susceptible de automatización. Se trata de un inmunoensayo competitivo con detección mediante quimioluminiscencia que emplea un anticuerpo monoclonal, que es el murino anti-25 (OH)vitamina D₃ junto con un éster de acridinio como marcador y por último un análogo de vitamina D marcado con fluoresceína. Existe una relación inversa entre la cantidad de vitamina D presente en la muestra del paciente y la cantidad de unidades de luz relativas detectadas por el sistema.

Siguiendo el protocolo que aporta el fabricante esta técnica posee una precisión con un coeficiente de variación intraensayo de un 4,2%, una precisión con un coeficiente de variación interensayo de un 11,9 y una sensibilidad funcional de 4,2ng/ml. Su intervalo de linealidad es de 4,2-150 ng/ml.

Además, es detectable al RMP (Reference Method Procedure) de LC/MS/MS de 25(OH) vitamina D teniendo una especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos del 97,4% para la 25 (OH) vitamina D₃, del 106,2% para la 25 (OH) vitamina D₂ y para el 3-epi25(OH)D₃ entre 0,1 y 3,5%. (Torrubia et al., 2016)

- Liason (Diasorin):

Se trata de otro inmunoensayo de quimioluminiscencia competitivo directo que utiliza micropartículas magnéticas. Estas partículas magnéticas están recubiertas por anticuerpos específicos anti vitamina D, y la vitamina D está unida a un derivado de isoluminol como reactivo quimioluminiscente. Se emplea un tampón que contiene un 10% de etanol y tensioactivo para liberar la 25 (OH)D de su proteína de unión durante la incubación y competirá con la vitamina D marcada por los sitios de unión de anticuerpos. Una vez realizada la incubación el medio de reacción se lava eliminando el exceso de vitamina D no unida al anticuerpo. Después se agregan los reactivos de partida produciéndose la reacción quimioluminiscente. La intensidad de quimioluminiscencia está inversamente relacionada con la concentración de 25(OH)D en la muestra. Este ensayo muestra reactividad cruzada para la 1,25(OH)D₂ (40%) y para la 1,25(OH)D₃ (17%). (Moon et al., 2012)

- Elecsys Vitamin D assay:

Se trata de un inmunoensayo competitivo con detección por electroquimioluminiscencia. Este ensayo emplea como pretratamiento inicial un reactivo con ditioneol y hidróxido sódico para liberar a la 25(OH)D de su proteína de unión. Una vez liberada la vitamina se incuba con la proteína de unión a vitamina D marcada con rutenio para que se vayan formando complejos. Después se añaden micropartículas recubiertas con estreptavidina y 25(OH)D marcadas con biotina y se irán ocupando los sitios de unión de la proteína de unión a vitamina D marcada con rutenio formando un complejo que consiste en la proteína de unión a la vitamina D marcada con rutenio y la 25(OH)D biotinilada. Este complejo se une a la fase sólida por la interacción de la biotina y la estreptavidina siendo las sustancias no unidas eliminadas. Las concentraciones se determinan mediante una curva de calibración.

Este inmunoensayo tiene una reactividad cruzada considerable con el epímero C3 de 25 (OH) D₃, el 24,25-dihidroxitmina D₃, mientras que otros reactivos tienen una mínima reactividad cruzada. (Moon et al., 2012)

Estos tres inmunoensayos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes y se consideró la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem como método de referencia. La insuficiencia de vitamina D se definió como un nivel sérico de 25 (OH) D inferior a 50 nmol /L (20 ng/ml).

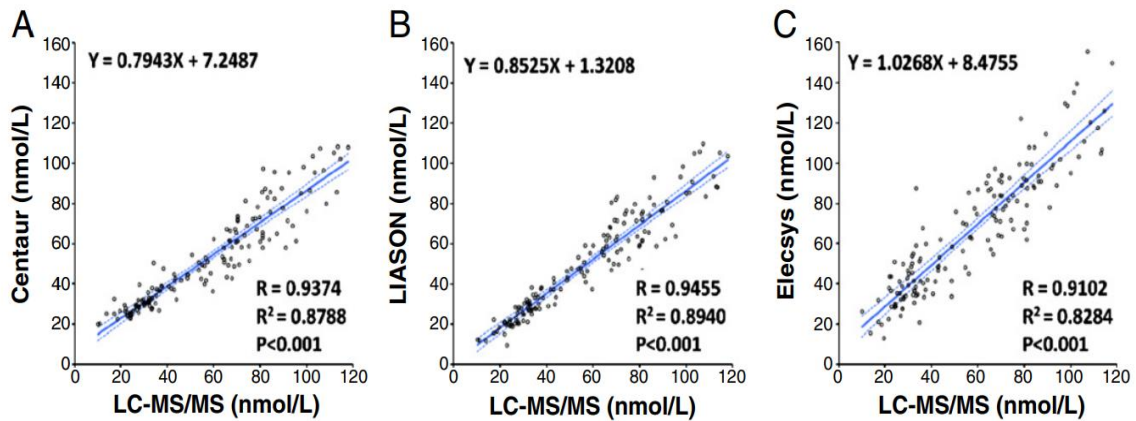


Figura 6: Comparación de los métodos Centaur, LIASON y Elecsys con el método de referencia LC-MS/MS. (Tomado de Moon et al., 2012)

Los resultados de los cuatro ensayos se compararon mediante análisis por regresión. Las correlaciones entre ensayos fueron aceptables para los cuatro ensayos. Las correlaciones de ADVIA Centaur y LIAISON con LC – MS / MS fueron mejores ($R = 0.9374$ y 0.9455 , respectivamente) que el de Elecsys ($R = 0.9102$). (Moon et al., 2012)

Los principales problemas de los inmunoensayos para la determinación de vitamina D están relacionados con la naturaleza hidrofóbica del analito o la elevada concentración de la proteína de unión de vitamina D en suero. Otro de los problemas puede ser la aparición de reacciones cruzadas de los distintos metabolitos de vitamina D con los anticuerpos empleados en el ensayo.

Para tratar de minimizar estos problemas hay que realizar una previa inactivación de la proteína de unión de vitamina D, elegir adecuadamente el anticuerpo que se va a utilizar en la técnica.

Debido a que en la actualidad existe un alto porcentaje de deficiencia de vitamina D en la población mundial, los laboratorios se centran más en la determinación de esta vitamina que por ejemplo en las vitaminas A y E por lo que existe una gran variedad de técnicas y estudios centrándose en la cuantificación de esta vitamina, pero entre estos estudios basados en inmunoquímica, cromatografía líquida/UV y LC-MS/MS se ha observado que existen variaciones considerables entre ellos hasta el punto de que una persona puede tener una insuficiencia de vitamina D o no tenerla en función de la técnica empleada para su análisis o del laboratorio donde se realice la técnica. (López et al., 2017)

Debido a este problema se están llevando a cabo diversos controles internacionales de calidad como pueden ser el DQAS (vitamin D External Quality Assessment Scheme) para comparar y contrastar los resultados de las diversas metodologías y la estandarización de los niveles de 25OH vitamina D por varias organizaciones científicas.

Además, el NIST (National Institute of Standards and Technology) está al corriente de este problema, ya que ha elaborado materiales de referencia de vitamina D en suero para la determinación de 25(OH)D₂ y 25(OH)D₃ denominado SRM (Standard Reference Material). De esta forma se está mejorando tanto la concordancia entre los resultados conseguidos en los distintos inmunoensayos como la compatibilidad entre estos y los métodos de referencia (Moon et al., 2012)

- Vitamina A y E:

Por otro lado, se han desarrollado una gran cantidad de métodos para la determinación de retinol (vitamina A) y tocoferol (vitamina E), más concretamente α -tocoferol, tanto en muestras biológicas como en formas farmacéuticas. Estos métodos pueden ser: la espectrofotometría de absorción Uv-Vis, la fluorimetría, la electroforesis capilar o sistemas de inyección de flujo con detección quimioluminiscente como describiremos a continuación.

En este caso nos centramos en un método de sistemas de inyección de flujo con detección quimioluminiscente que utiliza el vanadio, el cual en su forma reducida (vanadio IV) participa en una reacción de quimioluminiscencia con el luminol como reactivo quimioluminiscente. En este método van a ser el retinol y el tocoferol los que van a reducir el vanadio (V) en condiciones neutras y/o ligeramente ácidas. Cuando el vanadio se encuentra reducido puede reaccionar con el luminol generando una señal quimioluminiscente debido a la formación de aminoftalato en estado excitado que se desactiva emitiendo radiación a 425 nm. La intensidad de quimioluminiscencia es suficiente como para detectar niveles de retinol y tocoferol proporcionando la base para detectar vitaminas liposolubles en suero y productos farmacéuticos. (Asgher et al., 2011)

El mecanismo de las reacciones producidas se basa en la oxidación del luminol por el oxígeno disuelto y el efecto catalizador del Fe²⁺. El vanadio en su estado de oxidación reducido (IV) tiene un potencial redox muy bajo en una solución altamente alcalina por lo que puede reducir el oxígeno disuelto a radical superóxido y este radical superóxido puede reaccionar con el luminol alcalino generando quimioluminiscencia por medio de la cual el vanadio puede ser detectado o a su vez radical superóxido que dismuta en peróxido de hidrógeno. Esta reacción que se produce de forma adicional de H₂O₂ con el vanadio reducido produce el reactivo radical hidroxilo que reaccionando con el luminol generan también quimioluminiscencia. (Asgher et al., 2011)

La secuencia completa de reacciones sería esta:

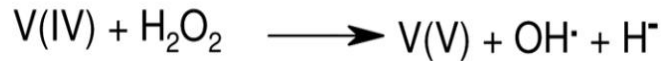
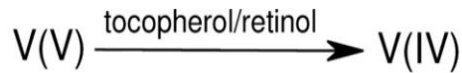


Figura 7: Secuencia de reacciones para la determinación de vitaminas A y E mediante detección quimioluminiscente en la que actúa como mediador el vanadio. (Tomada de Asgher et al., 2011)

Los parámetros químicos que pueden afectar directamente a la cuantificación de las vitaminas son: la concentración del disolvente/tensioactivo para el flujo de reactivos y durante el mezclado con la muestra; la concentración de vanadio; el pH del tampón borato y la concentración de luminol. Los parámetros físicos a controlar son la longitud de la bobina mezcladora de la muestra; la velocidad del flujo del portador de la muestra y los reactivos; y por último el volumen de la muestra.

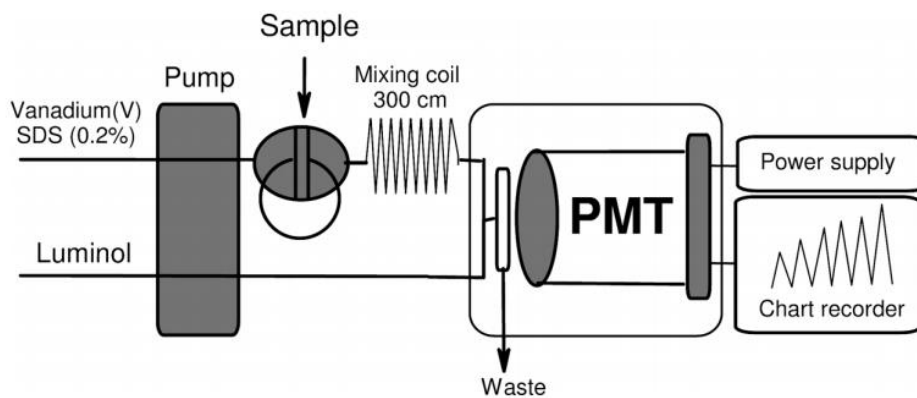


Figura 8: Bomba peristáltica (pump), reactor (mixing coil), canales para la introducción de los reactivos y de la muestra con detección mediante un tubo fotomultiplicador (PMT) (Tomada de Asgher et al., 2011)

Debido a que ambas vitaminas son insolubles en agua se utilizaron metanol y tensioactivos para disolver estos compuestos de la solución madre. Entre los distintos tensioactivos que pueden emplearse el SDS muestra una respuesta mayor de quimioluminiscencia comparándolo con el metanol y otros tensioactivos por lo que suele emplearse el SDS como corriente portadora de las muestras y en la preparación de las muestras.

Este método de quimioluminiscencia por inyección de flujo se validó mediante una comparación con el HPLC como método de referencia obteniendo que no existe una diferencia significativa al 95% de nivel de confianza entre los dos métodos. Se ha visto que no hay diferencias significativas entre las interferencias que puede haber entre tocoferol y retinol en formas farmacéuticas, pero para las muestras de suero sanguíneo existe una potencial interferencia para la determinación de las vitaminas que se puede evitar mediante la dilución de la muestra de 50 a 100 veces. Los autores de este trabajo comparan el método de quimioluminiscencia por inyección de flujo con la técnica del HPLC demostrando que es adecuada para determinación de estas vitaminas tanto en formas farmacéuticas como en suero. (Asgher et al., 2011)

CONCLUSIONES

Se ha realizado una revisión bibliográfica (artículos de revisión, de artículos de investigación, artículos de divulgación, capítulos de libro y monografías, así como tesis doctorales disponibles en las bases de datos) de los métodos de análisis de vitaminas liposolubles basados en quimioluminiscencia. En la mayoría de los artículos se comparan los distintos métodos quimioluminiscentes para el análisis de las vitaminas liposolubles A, D y E con los de cromatografía de líquidos (HPLC).

Los parámetros analíticos de sensibilidad y de selectividad de las distintas metodologías analíticas utilizadas son análogos, por lo que los métodos quimioluminiscentes se pueden utilizar en la práctica diaria en la determinación de vitaminas A, D y E en distintas matrices. Es el propio laboratorio el que debe valorarlos antes elegir uno u otro en función de que método se ajuste más a las necesidades del propio laboratorio y al tipo de muestras, sin perder nunca de vista las repercusiones económicas y la capacidad de procesar un número elevado de muestras en un tiempo de análisis reducido.

BIBLIOGRAFIA

1. Asgher, M.; Waseem, A.; Yaqoob, M.; Nabi, A. (2011). "Flow Injection Chemiluminescence Determination of Retinol and α -Tocopherol in Blood Serum and Pharmaceuticals." *Analytical Letters*, 44, 12–24.
2. Cáceres, O.; Barreto, J.; Cáceres, M.; Márquez, M, La O, Y.; Hernández Y. (2013), "Deficiencia de vitamina a, xeroftalmia y ceguera nocturna. a propósito de 3 casos." *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 23, 338-349.
3. Codoceo, R.; Muñoz, R.A., "Vitaminas liposolubles: A, E y K.", en Hernández, M.; Sastre, A., "Tratado de nutrición", 177-202, (1999)
4. Febles, C.; Soto, C.; Saldana, A.; García, B. (2002): "Funciones de la vitamina E. Actualización.", *Revista Cubana Estomatol*, vol.39, n.1, 28-32.
5. Reyes, J. "Diseño, desarrollo, optimización y validación de un método HPLC fase reversa para la determinación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles y liposolubles en un suplemento multivitamínico." Trabajo de investigación Universidad Central de Ecuador, (2019).
6. García, C.; Martínez, I. (2009), "Ventajas del método de quimioluminiscencia frente al de radioinmunoanálisis (RIA)". *Visión científica.*, 1, 60-68.
7. Gómez, M.J.; Sosa M.; Del Pino J.; Jódar E.; Quesada J.M.; Cancelo M.J.; Díaz M.; Mesa M.; Muñoz M.; Carpintero P.; Navarro C.; Valdés C.; Giner A.; Palacios S. (2011): "Documento de posición sobre las necesidades y niveles óptimos de vitamina D." *Revista de osteoporosis y metabolismo mineral*, 3, 53-68
8. Huetos, O. "Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas." Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid, (2004).
9. Iglesias, E. M.; Granada, M. L.; Doladé, M.; Barallat, J.; Hidalgo, I.; Cruz, M. (2013). Comparación de las concentraciones de vitamina D por 3 métodos comerciales. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 6, 2–9.
10. López, E. "Influencia de los niveles de 25- hidroxivitamina d en el hiperparatiroidismo secundario, en pacientes con insuficiencia renal y en pacientes con obesidad mórbida antes y después de la cirugía. importancia de realizar una buena determinación de los niveles de esta vitamina." Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid, (2017).
11. Martín-Gómez, M.C.; Ballesteros-González, M., "Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores." en "Monografía XXX: Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica." Publicaciones de la Real Academia Nacional de Farmacia, (2010).
12. Martínez M.E.; Del Campo M.T., "Vitamina D.", en Hernández, M.; Sastre, A., "Tratado de nutrición", 203-215, (1999)

13. Mata-Granados, J.M.; Ferreiro-Verab, C.; Luque de Castro, M.D.; Quesada, J.M. (2010). "Determinación de los metabolitos principales de vitamina D en suero mediante extracción en fase sólida en línea con cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem" *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2, 55-61.
14. Meseguer, S. "Métodos quimioluminiscentes en química analítica", tesis doctoral Universidad de Valencia (2004).
15. Miranda, D.; Leiva, I.; León, J.P.; De la Maza, M.P. (2009): "Diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de vitamina d.", *Revista Chilena de Nutrición*, vol.36, n.3, 269-277.
16. Moon, H.; Cho, J.; Hur, M.; Song, J.; Oh, G. Y.; Park, C. M.; Yun, Y.M.; Kim, J. Q. (2012). "Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays." *Clinical Biochemistry*, 45, 326–330.
17. Palacios, N.; Montalvo, Z.; Ribas, A.M.; "Alimentación, nutrición e hidratación en el deporte." Publicaciones del Ministerio de Educación, Política Social y Deporte, Madrid 2009.
18. Quintela, O.; Cruz, A.; Concheiro, M.; De Castro, A.; López-Rivadulla, M. (2005), "Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología." *Revista de Toxicología*, Vol. 22, 7-14.
19. Sayago, A., Marín, M.I., Aparicio, R., Morales, M.T. (2007): "Vitamina E y aceites vegetales." *Grasas y aceites*, 58, 74-86
20. Shaw, A. (2002) "Genetic chess by the light of a jellyfish". *Chemistry Review*, 12, 2-5.
21. Torrubia, B.; Alonso, I.; López-Ramiro, E.; Mahillo, I.; De la Piedra, C. (2016). "Comparación entre dos inmunoensayos automatizados por quimioluminiscencia para la cuantificación de 25(OH) vitamina D". *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8, 70-74.