



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

**OBTENCIÓN DE GLUCOSAMINA A PARTIR DE PRODUCTOS
PESQUEROS NO UTILIZADOS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA**

PRESENTA

ELVA ELIZABETH MAGUEY REYES



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

MÉXICO, D. F. ABRIL 2007

M. 97131



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

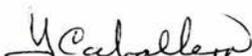
JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. GUADALUPE MERCADO RAMÍREZ
Vocal	Prof. YOLANDA CABALLERO ARROYO
Secretario	Prof. SILVIA DE JESUS MENDOZA ARELLANO
1er. Suplente	Prof. ROSA LUZ CORNEJO ROJAS
2º. Suplente	Prof. KATIA SOLORZANO MALDONADO

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 2 B de Química Orgánica. Edificio A de la Facultad de Química Ciudad Universitaria. México D.F.

Asesor:


Dra. YOLANDA CABALLERO ARROYO

Sustentante:

Elva E. Maguey Reyes
ELVA ELIZABETH MAGUEY REYES

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis: A mi abuelita, Margarita Cedillo, a mi mamá Argelia Reyes, Francisco Maguey y a mi tía Carmen Maguey por que siempre creyeron en mi, y cuando ya no podía me alentaban para que siguiera adelante, eso me hizo más fuerte y responsable.

A mi hermano J. Manuel Maguey solo me resta decirle qué los sueños se pueden hacer realidad si uno es perseverante.

A mis tíos Rodolfo Maguey y Socorro Cedillo, gracias por apoyarme en todos los momentos, mi más profundo agradecimiento con cariño y respeto. Alejandra Cruz, Ángeles Reyes, y a todos mis primos, Yoce, Pepe, Ale, Charle, Panchis, Mayi, Sebas, a los cuales les digo que la mejor herencia que les pueden dar es el estudio, y les dedico esta frase; *todos podemos caer, pero esta prohibido no levantarse. La vida del estudiante es el sacrificio y su recompensa, el triunfo.*

A mis abuelitos: Francisco Maguey Cedillo (†), Rosario Domínguez (†), Nicolás Reyes (†), y a mi tío Manuel Maguey (†), con cariño y respeto.

A mis amigos con los cuales he formado una segunda familia ya que junto a ellos viví momentos tanto felices como tristes; y con ellos aprendí que es la amistad.

Gracias Patty Piza, Jannely Álvarez, Reyna Aguilar, Sofía López, Ricardo Zambrano, Lizzette Henestroza, Sara Hernández, América Martínez, Rodrigo Martínez, Lorena Borja, Jeanete Rosas, José Manuel Orozco, Cristina Anaya, Olivia Herrera, Yolanda Jiménez, Agustín Olmedo y a todos aquellos que me faltaron mencionar los cuales forman parte de mi segunda familia.

Alguna vez me preguntaron que es la amistad, yo respondí que es aquella que día con día, se da sin recibir nada a cambio, crece y nunca se permite marchitar, y se caracteriza por varias cosas: se da mutuamente, se escucha, se da consejos se dice la verdad, la mentira no cave. Y no es necesario que se conozca un día, una semana, un mes o un año, uno se da cuenta quien es su amigo.

Hay algunas frases que me gustaría compartir y son las siguientes:

✚ Que Nada te turbe, Que Nada te espante, todo se pasa. Dios no se muda. La paciencia todo lo alcanza. Quien a Dios tiene nada le falta, solo Dios basta.

✚ Un libro abierto es un cerebro que habla, cerrado, un amigo que espera, olvidado, un alma que perdona y destruido, un corazón que llora.

Con el tiempo...

+ ...aprenderás que intentar perdonar o pedir perdón, decir que amas, decir que extrañas, decir que necesitas, decir que quieres ser amigo...

+ ante una tumba...

+ ...ya no tiene ningún sentido...

“El hombre se hace viejo muy pronto y sabio demasiado tarde”.

...Justamente cuando: “YA NO HAY TIEMPO”

◆ Di: “yo te amo”, solamente cuando tu amor sea verdadero ...

◆ Y si tienes que decir: “Lo lamento mucho”, mira de frente a los ojos de la persona.

◆ Si no crees en el “amor a primera vista”, no te burles de los sueños de los otros..

◆ No ofendas, no juzgues a las personas por “ lo que escuchó hablar de estas.. ”.

◆ Cásate con alguien con quien te gusta conversar...

◆ Cuando estén viejos, la habilidad de conversar será más importante que cualquier otra cosa...

◆ Recuerda que el silencio a veces es la mejor respuesta...

◆ Recuerda que la mejor relación es aquella donde el amor entre dos personas es mayor de que la necesidad que ellas tienen una por la otra..

◆ Nunca interrumpas a alguien que te esté demostrando afecto...

❖ A tí, que pensaste alguna vez en la magia de lo espiritual, que lloraste por amor, que creíste en un sueño. A tí, que sabes lo importante que es compartir con otros el brillo de tu estrella... A tí te invito a olvidar las palabras que no entienden el dolor que no se expresa y a no olvidar que las mejores almas están hechas de cosas imposibles.

❖ Sonríe, sonríe siempre, aunque tu sonrisa sea una sonrisa triste, porque más triste que una sonrisa triste, es la tristeza de no poder sonreír.

A la Dra. Yolanda Caballero por ser una gran persona conmigo y por su ayuda.

A la Dra. Pilar Cañizares por la atención, paciencia, por abrirme las puertas de su laboratorio, y haberme proporcionado el equipo y su amable ayuda.

A la *Profa. Silvia Mendoza* por sus múltiples observaciones, sugerencias y su motivante manera de ser, además es una persona que estimo mucho, y le doy las gracias a dios por a vérmelas puesto a todas en mi camino.

A la maestra *Katia* y la profesora *Rosa Luz* por su forma de ser, y su entrega y entusiasmo en todo momento el cual transmiten al enseñar, mostrando así el camino de la ciencia.

↓ No es maestro el que transmite información si no el que es capaz de captar la atención de su pupilo haciéndole comprender aquello que enseña.

↓ De todas las victorias humanas le compete al maestro en gran parte el mérito. De todas las derrotas en cambio, su responsabilidad.

↓ “Los logros más importantes no se miden solo por los resultados, sino por el esfuerzo que ponemos en realizarlos y no olvides nunca: Si quieres aprender, enseña.”

Y a todos mis profesores que tuve durante mi estancia en la facultad, por aquellos que creyeron, ya que aquí esta la prueba de cuando se quiere, se puede.

A los laboratoristas del 2B a Vero, Ernesto, Don Manuel, Sergio y Rubén quien amablemente me atendían a todos les doy las gracias.

A Lulu y a su amigo Omar quien amablemente me consiguió el estándar.

A Patty Piza gracias por estar siempre conmigo recuerda que siempre que necesites de un amigo puedes contar conmigo siempre, a Jannely Álvarez “sigue adelante y no desistas en todo lo que te propongas”, Reina Aguilar y Olivia Herrera gracias por escucharme y estar en los momentos difíciles y también por que fueron mis primeras amigas en esta facultad, juntas pasamos por varias etapas y henos aquí, América y Cristina por hacerme reír con sus comentarios, además por tener ese optimismo el cual nos hace ver la vida de otra manera. Y a ti Agustín Olmedo por que eres la persona más sincera y linda que conozco.

A Manuel Orozco por tu apoyo de muchas formas, por tu asesoria eres una gran persona, sigue así y sobre todo por tu amistad, ***a todos les doy las gracias sinceramente.***

INDICE

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	6
CAPITULO I	
3. PARTE TEÓRICA	7
3.1 ANTECEDENTES	7
3.2 MATERIA PRIMA PARA OBTENER QUITINA	8
3.3 MÉXICO Y LA QUITINA	9
3.4 OBTENCIÓN DE CAROTENOS Y CAROTENOIDES DE LOS RESIDUOS DEL CAMARÓN 11
3.5 QUITOSANO	14
3.6 APLICACIONES	16
3.6.1 TRATAMIENTO DE AGUAS	16
3.6.2 INDUSTRIA ALIMENTARIA	17
3.6.3 EN PROCESOS INDUSTRIALES	19
3.6.4 MEDICINA	19
3.6.5 BIOTECNOLOGÍA	21
3.6.6 AGRICULTURA	21
3.6.7 COSMÉTICA	21
3.6.8 INDUSTRIA PAPELERA	22
3.6.9 TECNOLOGÍAS DE MEMBRANA	22
3.6.10 ALIMENTOS NUTRACEÚTICOS	23
3.6.11 INDUSTRIA TEXTIL	23
3.7 IMPORTANCIA DE LA GLUCOSAMINA	25
3.8 CARACTERÍSTICAS DEL CARTÍLAGO	25
3.9 LA GLUCOSAMINA Y LAS ARTICULACIONES	27

3.10 PERSPECTIVAS FUTURAS	35
---------------------------------	----

CAPITULO 2

4. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	36
4.1 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)	36
4.2 DISPERSIÓN CONTROLADA. FUNDAMENTO DEL FIA	39
4.3 COMPONENTES DE UN EQUIPO PARA FIA	41
4.4 SISTEMA DE TRANSPORTE DE MUESTRAS Y REACTIVOS	42
4.5 INYECTORES DE MUESTRA Y DETECTORES	44
4.6 ZONA DE REACCIÓN	45
4.7 ZONA DE DETECCIÓN Y SISTEMA DE DETECCIÓN (ESPECTROFOTÓMETRO)	48
4.8 VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS ANÁLISIS AUTOMÁTICOS	49

CAPITULO 3

5. FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN	50
------------------------------------	----

CAPITULO 4

6. METODOLOGÍA	52
6.1 PROCEDIMIENTO	52
6.2 EQUIPO DE FIA	55
6.3 REACTIVOS	56
6.4 DISOLUCIONES	56
6.5 CUANTIFICACIÓN	56
6.5.1 DISOLUCIÓN MADRE DE GLUCOSAMINA (ESTÁNDAR SECUNDARIO)	56
6.5.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA	

CURVA DE CALIBRACIÓN	57
6.6 CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS	58
6.7 CONFIGURACIÓN	58
6.8 PARÁMETROS FÍSICOS E HIDRODINÁMICOS	59
6.9 ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA GLUCOSAMINA	60
6.10 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	62
CAPITULO 5	
7. RESULTADOS	63
7.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	64
7.2 CONCENTRACIÓN DE GLUCOSAMINA	64
7.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN	67
7.4 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	67
7.5 LIMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	68
8. CONCLUSIONES	71
ANEXOS	72
Espectro de IR estándar secundario de sulfato de glucosamina	72
Espectro de IR de clorhidrato de glucosamina (muestra obtenida en noviembre)	73
Espectro de IR de sulfato de glucosamina (muestra obtenida en octubre)	73
Espectro de IR de sulfato de glucosamina (muestra obtenida en noviembre)	74
Cáscara de quitina residuo en el precipitado resultado de la hidrólisis	74
BIBLIOGRAFÍA	75

1. INTRODUCCIÓN

En esta tesis se pretende obtener glucosamina a partir de productos pesqueros no utilizados, como son la cascarilla de camarón, y el caparazón de algunos crustáceos, etc.

La glucosamina es un compuesto que ha adquirido gran importancia, ya que es considerado como un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de enfermedades reumáticas y artríticas; también se emplea en el tratamiento de patologías que se originan en trastornos metabólicos de los tejidos osteoarticulares, debido a ello, en los últimos años su consumo, comercialización y distribución en sus diversas formas farmacéuticas se ha incrementado notablemente. En lo anterior también ha intervenido de manera sobresaliente la literatura química, misma que se ha encargado de informar de la posible obtención de este compuesto a partir de subproductos de la industria pesquera. Siendo México, un país con amplia zona costera, la pesca es de gran importancia económica y por lo mismo se generan gran cantidad de residuos que no son aprovechados.

El trabajo que aquí se presenta tiene como objetivo principal destacar la importancia de este recurso natural como fuente de obtención de glucosamina con los consecuentes beneficios científicos, tecnológicos y económicos para diferentes sectores de la población, en particular para las comunidades que trabajan en la industria pesquera.

La glucosamina es un aminosacárido que ayuda a favorecer la estructura articular, mejorando así la movilidad de las articulaciones. Hasta el momento se reportan cuatro sales de glucosamina importantes: yoduro de glucosamina, clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, así como la N-acetil glucosamina.

El sulfato de glucosamina es la forma más empleada de la glucosamina y es ampliamente utilizada en el tratamiento de la osteoartritis y otras enfermedades artríticas; en diferentes artículos científicos se ha reportado la seguridad y eficacia en

el empleo de este fármaco lo que ha contribuido a su recomendación por parte de la comunidad médica.

En esta tesis se pretende llevar a cabo la extracción de glucosamina a partir de cáscara de camarón, mediante una hidrólisis ácida, se probarán diferentes condiciones para optimizar el rendimiento del compuesto buscado y posteriormente se le dará tratamiento a este hidrolizado para obtener cristales de este compuesto, realizando pruebas de identificación y de rendimiento empleando métodos químicos y espectroscópicos, verificando así la pureza y la eficiencia del método propuesto.

2. OBJETIVOS

+Optimizar la técnica de obtención de glucosamina, a partir de uno de los componentes más importantes que se encuentra en los residuos pesqueros de camarón.

+Presentar una revisión de las diversas aplicaciones de los productos que se obtienen de los residuos pesqueros.

+Desarrollar un método de análisis de detección y cuantificación de la glucosamina empleando la técnica de Análisis por Inyección en Flujo.

+Darle un valor agregado a los residuos pesqueros, ya que en nuestro país no son adecuadamente aprovechados, por lo que se pierden productos químicos de interés y de elevado valor económico.

CAPITULO 1

3. PARTE TEÓRICA

3.1 ANTECEDENTES

La quitina constituye el antecedente mas directo de la glucosamina, fue aislada por primera vez en 1811 por el profesor Henri Braconnot en hongos. En 1830 se encontró en ciertos insectos y se le dio el nombre de quitina. El descubrimiento del quitosano, un derivado de la quitina, por C. Rouget en 1859, planteó el inicio de una investigación intensiva sobre estos compuestos.

En 1823, se aisló de los élitros de insectos una sustancia que después se comprobó era la misma aislada por Braconnot de los hongos, y que fue llamada "quitina" (del griego tunic, envoltura). En 1876, la quitina de artrópodos fue sometida a la hidrólisis con ácido clorhídrico y se obtuvieron como productos de degradación ácido acético y una sustancia cristalina cuyo estudio indicó que era un amino azúcar al que se llamó glucosamina. Se sugirió que la quitina era un compuesto de este azúcar con ácido acético. Hoy, está demostrado que esa hipótesis era correcta y que la acetilglucosamina (2-acetamido-2-deoxiglucosa) es la unidad estructural de la quitina al igual que la glucosa es la unidad estructural de la celulosa.(1)

ESTADO NATURAL.

La quitina se encuentra, en diferentes proporciones en el exoesqueleto de todos los artrópodos, que forman el grupo más grande del reino animal y comprende varias clases: insectos, arácnidos, crustáceos y otras más. La quitina se encuentra también en la membrana celular de muchos hongos.

Es probable que la quitina, después de la celulosa, sea el polisacárido más abundante en la naturaleza. A pesar de la abundancia de la quitina y sus usos tan diversos no se le ha dedicado mucho interés a su estudio y aprovechamiento. Se ha investigado la posibilidad de obtener quitina de desechos de langostas, cangrejos de mar, camarones y jaibas, ya que se desechan cantidades importantes de caparzones de estos crustáceos. Se calcula que estos residuos contienen 25% de quitina.

Los caparazones, además de contener la quitina en forma de sales de calcio y por tanto ser fuente de obtención de dichas sales, también proporcionan pigmentos rojos y proteínas con la misma calidad a la de la carne del crustáceo. Por ser una mezcla compleja de compuestos se hace difícil aislar la quitina sin técnicas drásticas y costosas, la quitina no se encuentra en estado puro en la naturaleza y rara vez llega el 50% de una estructura. La quitina de origen animal está íntimamente asociada con proteínas insolubles en agua y sales inorgánicas que hacen difícil aislarla. (1)

PROPIEDADES FÍSICAS.

La quitina, es un polímero formado por unidades de 2-acetamido-2-deoxiglucosa enlazadas por uniones 1,4- β -glucosídicas similares a las que se presentan en la celulosa. Tiene gran peso molecular.

Al igual que la celulosa, también tiene una estructura micelar de cadenas orientadas paralelamente.(1)

PROPIEDADES QUÍMICAS.

La quitina es insoluble en agua, ácidos diluidos, álcalis diluidos y concentrados, alcohol y en todos los disolventes orgánicos. Es soluble, con alguna degradación, en ácidos minerales concentrados. Por hidrólisis ácida enérgica, se degrada a glucosamina; la hidrólisis alcalina la desacetila, con sólo ligera disminución de la longitud de la cadena, formando quitosano.

La quitina se disuelve lentamente en soluciones de hipoclorito a la temperatura ordinaria, pero es insoluble en el reactivo de Schweitzer y se diferencia de la celulosa en estos dos aspectos. Se disuelve en una solución de sodio en amoniaco líquido, con formación de un compuesto monosódico.(1)

3.2 MATERIA PRIMA PARA OBTENER QUITINA

Una materia prima abundante en México de la que se puede obtener quitina, son los residuos de la industria pesquera que deberán ser recogidos, limpiados y molidos siendo esta parte el proceso primario para la elaboración de la quitina.

En el caso de los crustáceos entre más jóvenes sean, mayor será la cantidad y calidad de las sales de calcio que también se pueden obtener. En caso de no contarse con los

secadores necesarios se pueden secar al sol, en un terreno amplio y colocar limpios los caparzones. El residuo limpio y molido se puede vender a las empresas que elaboran los derivados. Es fundamental tener la técnica adecuada para proceder a la obtención del polisacárido. (2)

3.3 MÉXICO Y LA QUITINA

La República Mexicana (figura 1) posee 11 592.77 kilómetros de costas, de los cuales 8475.06 corresponden al litoral del Pacífico y 3 117.71 al del golfo de México y mar Caribe, incluyendo islas; su plataforma continental es de aproximadamente 394 603 km², siendo mayor en el golfo de México; además cuenta con 12 500 km² de lagunas costeras y esteros y dispone de 6 500 km² de aguas interiores, como lagos, lagunas, represas y ríos. (3)

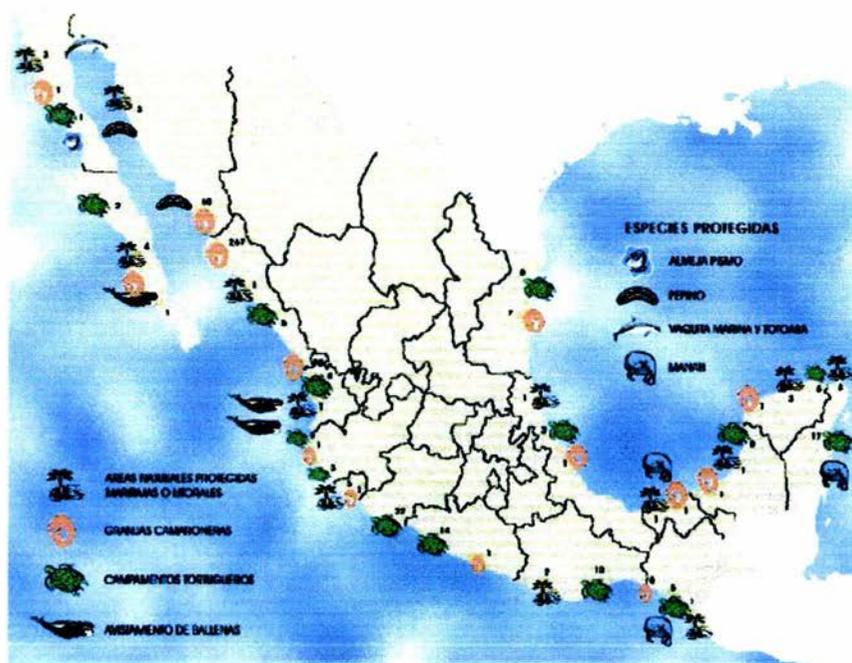


Figura 1. Mapa de la República Mexicana.

Por la ubicación geográfica del país, sus aguas ofrecen medios muy diversos para el desarrollo de las distintas especies de organismos acuáticos debido a la variabilidad

de climas y de condiciones ecológicas, la cual es mayor en las aguas marinas. Lo anterior permite que en los mares de México se encuentren especies de climas templados, cálidos y fríos, de fondo y superficie, costeras y de alta mar, regionales y migratorios, y de todas las transiciones entre estos tipos extremos. (3)

La plataforma continental presenta un declive suave y su profundidad normalmente no excede los 200 metros; es una zona de gran riqueza biótica. En el golfo de México alcanza gran extensión frente a Campeche y Yucatán; también es muy amplia en la costa suroccidental de la península de Baja California y en el fondo del golfo de California. Otras zonas importantes se localizan en las Islas Mariás y en el golfo de Tehuantepec.

En general, los ecosistemas de las zonas tropicales se caracterizan porque en ellos vive una gran diversidad de especies y no se encuentra alguna que domine por su abundancia; esto sucede en las aguas que bañan las costas mexicanas, lo que ofrece al país ventajas que han permitido establecer grandes pesquerías comerciales, principalmente en el golfo de California, en la costa occidental de la península de Baja California, en la sonda de Campeche, así como pesquerías tropicales a lo largo de todos sus litorales.

En estas aguas se aprovechan 305 especies diferentes, y algunos investigadores han calculado que existen 1 200 especies posibles de ser capturadas. La utilización de estas especies se ha incrementado paulatinamente; en los años 60 a 70 tenían importancia económica solamente 20 especies de peces, 2 de crustáceos y 2 de moluscos; en la actualidad ha aumentado el aprovechamiento de especies de peces pelágicos y demersales, que llegan a alcanzar más del 50% de la captura total nacional y diversifican la pesca en cuanto a nuevos recursos. (3)

Principales especies capturadas en México en el año 2003		Toneladas
CRUSTÁCEOS		
Camarón		109,685
Jaiba		16.821
Langostino		3,294
Langosta		2,814

Tabla 1. Tonelaje de captura durante el año 2003.

La información mostrada en la tabla 1 da idea de que el aprovechamiento de los desechos de camarón que se producen en el país significaría darle un importante valor agregado a este producto lo cual favorecería en todos los aspectos a la población ligada a la captura, cultivo y comercialización del camarón. Considerando la producción anual promedio de 70 mil ton/anales, se tendría una generación de cefalotórax de camarón de 35 a 60 mil ton/anales, ya que parte de la producción considerada de camarón corresponde al crustáceo descabezado. Esta cantidad es realmente importante tomando en cuenta los subproductos posibles de obtener. Los residuos del procesado del marisco contienen en general un 14-35% de quitina asociada con proteínas (30-40%), lípidos, pigmentos y depósitos de calcio (30-50%), estimándose por tanto una producción mundial anual de quitina en los residuos de unas 120.000 toneladas. Este gran volumen, unido a su lenta capacidad de degradación, ha estimulado una gran actividad investigadora centrada en la determinación de los posibles usos de esta sustancia con una doble finalidad; por un lado la búsqueda de una explotación económica beneficiosa y por otro la eliminación del problema del medio ambiente. (3)

3.4 OBTENCIÓN DE CAROTENOS Y CAROTENOIDES DE LOS RESIDUOS DEL CAMARÓN

Los residuos de camarón, representan un problema para la ecología mexicana e incluso de salud pública debido a su descomposición al aire libre; sin embargo, con un tratamiento adecuado no solo se podrían obtener quitina y quitosano, sino también carotenos y carotenoides.

Las conchas y caparazones de muchos crustáceos, entre ellos el camarón, contienen proteínas, lípidos y pigmentos dentro de los que se encuentran los carotenoides. Entre ellos destaca la astaxantina, que se utiliza principalmente para conferir color a muchas especies acuícolas, aumentando así su valor comercial. El aislamiento y aprovechamiento de este pigmento ha estado sujeto a numerosas investigaciones con el fin de elevar su empleo y el valor comercial de los residuos en los que se encuentra. (4)(5)

Los carotenoides son un grupo numeroso de pigmentos muy difundidos en el reino vegetal y animal. Poseen colores que van desde el amarillo-naranja al púrpura. Son insolubles en agua aunque se disuelven en grasas y disolventes orgánicos; se les clasifica como pigmentos lipocromos. En la actualidad se conocen 800 carotenoides. (6)

Los carotenoides son terpenos de 40 carbonos, que se encuentran como pigmentos fotosintéticos o complejos proteínicos en plantas superiores y bacterias fototrópicas, incluyendo cianobacterias. Actualmente se han aislado más de 400 carotenoides de plantas, animales y hongos. (7)(8)

Existen dos grandes grupos de estos pigmentos: los carotenos y las xantofilas, los primeros son hidrocarburos, en cambio las xantofilas contienen al menos un átomo de oxígeno en su molécula.

Los carotenos α , β , γ y δ poseen actividad de pro vitamina A, siendo el β -caroteno el más activo. Estos carotenos conjuntamente con el γ -caroteno, el licopeno y la luteína (que no muestran actividad como la vitamina A), parecen ofrecer protección contra el cáncer de pulmón, colon rectal, glándulas mamarias, útero y próstata. (9)

La astaxantina (3,3'- dihidroxi-4,4'-diceto- β - β -caroteno) (figura 2), cuya fórmula molecular es $C_{40}H_{52}O_4$, se distingue por tener una cadena poliénica de once dobles enlaces conjugados responsables del intenso color rojo brillante del cromóforo. Presenta un anillo cíclico en cada extremo de la molécula, un grupo funcional hidroxílico en cada uno de los carbonos 4 y 4'. La existencia de dichos grupos oxigenados en los extremos lo caracterizan como oxicarotenoide o xantofila, estos grupos pueden estar libres o esterificados.

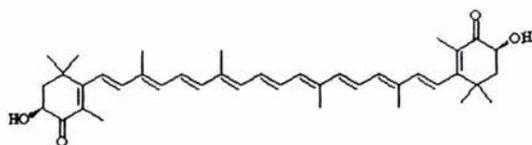


Figura 2. Estructura de la astaxantina.

A partir de su descubrimiento la astaxantina fue encontrada principalmente en los invertebrados marinos y con mayor predominancia en los crustáceos los cuales se caracterizan por poseer pigmentos, que contiene entre 65% a 98 % de astaxantina. (10)(11) En dichos organismos vivos este carotenoide se encuentra ligado a una proteína mediante enlaces covalentes formando compuestos estables e insolubles de color azul-grisáceo o verdoso llamados carotenoproteínas. (12)

Al ser hidrolizados estos compuestos, ya sea por calentamiento (como sucede durante la cocción de los invertebrados comestibles), o por extracción con disolventes orgánicos, se libera astaxantina exhibiendo su característico color rojo-naranja. En algunos casos, el compuesto puede estar asociado firmemente con el material tegumentario como la quitina o el carbonato de calcio, impidiendo su completa extracción aún con disolventes orgánicos. (13)

La astaxantina se caracterizó por primera vez en 1933 por Khun y Ledere, y fue obtenida a partir de los huevos del decápodo *Hamarus americanus*. (14) Años más tarde, en 1938, Khun y Sorensen aislaron el compuesto de otro decápodo, *Astacus gammarus* al que descubrieron, estudiaron y por el cual asignaron el nombre de astaxantina al pigmento encontrado. (15) La astaxantina es muy común en la naturaleza, sobre todo en el ambiente marino y probablemente se conoce mejor por el color rosa-rojo de la carne de salmón, trucha, gamba, langosta, cangrejos y camarones, entre otros. Los carotenos y especialmente la astaxantina, se distinguen por su capacidad para interactuar con especies químicamente reactivas de oxígeno y radicales libres.

El carotenoide astaxantina presenta un gran interés científico y comercial, ya que tiene grandes perspectivas de aplicación en la industria farmacéutica como marcador en el seguimiento de células, como agente antioxidante y antitumoral; en la industria de cosméticos se emplea como colorante y antioxidante.

En la industria de alimentos se emplea como suplemento y complemento en la coloración directa e indirecta de diversos productos como en la dieta de aves de corral con la finalidad de incrementar la coloración en la yema de huevo; en la acuicultura como fuente de pigmentación en la dieta de crustáceos (camarón y langosta), de peces para dar color al músculo de la trucha arco iris y principalmente del salmón, lo que incrementa el valor comercial de los productos a través de la bioacumulación y metabolismo de las diferentes formas de astaxantina en los músculos de la piel y exoesqueleto. La astaxantina se puede adicionar en forma libre o esterificada. (16)(17)(18)

3.5 QUITOSANO

El quitosano es la forma parcialmente N-desacetilada de la quitina, de la que se liberan por hidrólisis química o enzimática los grupos acetilo quedando entonces los grupos amino, es insoluble en agua. Si la quitina se encuentra desacetilada en un 80% o más, ya es denominada quitosano. El quitosano tiene grupos funcionales que permiten obtener derivados con diferentes características entre otras se puede conseguir que sean solubles en agua. (19)

El interés por el quitosano se debe principalmente a su propiedad de formar numerosas sales tanto solubles como insolubles en agua.

Se ha visto que la concentración del ácido clorhídrico y la temperatura en el proceso de desmineralización de la quitina original tienen una gran influencia en la viscosidad final del quitosano. Las altas concentraciones de ácido producen degradación, de tal forma que el producto final tiene una viscosidad menor. Como la viscosidad final del quitosano está determinada por el grado de degradación, lo mejor es mantener la concentración de ácido alrededor de 3%, o menos, mientras se mantiene la temperatura a unos 25°C. Como resultado de estas investigaciones, actualmente la quitina y el quitosano están siendo empleados con éxito en campos tan diversos como el farmacéutico, médico, la industria alimentaria y procesadora de efluentes y la agricultura entre otros muchos. (1)

PROPIEDADES.

El quitosano es un sólido blanco amorfo, insoluble en agua, soluble en los ácidos, cuya estructura cristalina es similar a la de la quitina original. Por las condiciones extremas de desacetilación, la cadena del quitosano es más corta que la quitina original, alrededor de 25-30 unidades menos de glucosamina. (1)

En esta tesis pretendemos realizar de forma breve una recopilación de las interesantes propiedades y aplicaciones que estos compuestos procedentes de los productos de la pesca pueden ofrecer. Algunas de ellas ya han sido estudiadas ampliamente y otras constituyen vías abiertas de investigación en todo el mundo, siendo nuestro propósito contribuir también a estas investigaciones.

ESTRUCTURA DE LA QUITINA Y EL QUITOSANO.

Entre los polímeros naturales más usados en la actualidad dos polisacáridos han tomado auge por la infinidad de aplicaciones que se han encontrado para ellos y, especialmente, por su poco impacto ambiental: la quitina y el quitosano. Ambos biopolímeros están químicamente relacionados: la quitina, es una poli(β -N-acetil-glucosamina) (figura 3); la cual, mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50 % de sus grupos acetilo, se convierte en quitosano (poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100 % el polímero se conoce como quitano. Estos dos biopolímeros han estado presentes en la naturaleza desde hace millones de años. (20)

Por los hallazgos paleontológicos, es posible asignarle a la quitina una edad de al menos 570 millones de años, al haber sido encontrada en el exoesqueleto de artrópodos acuáticos, fósiles conocidos como trilobites, que datan de la era paleozoica. (20)

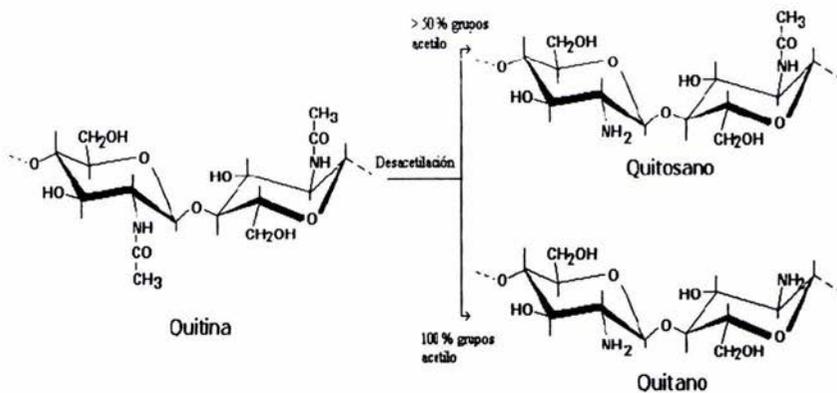


Figura 3. Reacción de desacetilación de la quitina y sus productos.

Por su parte, el quitosano se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos, por ejemplo en el *Mucor rouxii* llega a representar hasta un tercio de su peso. Sin embargo, la fuente más importante de quitosano, a nivel industrial, lo constituye la quitina, la cual, mediante un proceso de desacetilación química o enzimática, ha permitido producirlo a gran escala. (20)

3.6 APLICACIONES

Las aplicaciones de la quitina y quitosano son muy amplias, en algunos sectores su utilización es habitual y conocida; para otros grupos constituye actualmente una interesante vía de investigación. (20)

3.6.1 TRATAMIENTO DE AGUAS

Es una de las áreas en donde su uso adquiere mayor importancia debido a que el quitosano y la quitina son sustancias “ambientalmente amigables”. Entre los principales usos, para el tratamiento de aguas, se pueden mencionar:

Coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad.

Floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado.

Captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas. Actúan como quelantes de metales de transición y contaminantes ambientales (PCBs), como removedores de iones metálicos (Hg, Cd, Pb, Ag y Ni).

Como floculantes, coagulantes y precipitantes de: proteínas, aminoácidos, tintes, colorantes, algas, aceites, metales radioactivos (U y Co), partículas en suspensión y pesticidas. Por ello se emplean en el tratamiento de piscinas y estanques.

Para tratar efluentes de industrias de alimentación y residuos alimentarios, reducen la DQO hasta en un 80%. (20)

Aguas residuales en las diferentes industrias que lo requieran como en refinerías de petróleo, plantas procesadoras de pescado, cerveceras, mataderos etc. y en el tratamiento de agua para consumo humano.

Algunos copolímeros de injerto del quitosano muestran alta efectividad para remover metales pesados, especialmente los derivados de ácidos alquenodíicos.(20)

3.6.2 INDUSTRIA ALIMENTARIA

USOS COMO ADITIVOS.

El quitosano y sus derivados pueden ser considerados mejoradores de la textura de los alimentos, en virtud de que fijan agua y grasa por lo que se emplean como aditivos en los alimentos. Por sus propiedades como espesante, gelificante y emulsificante, se ha empleado con éxito la quitina cristalina. También pueden ser utilizados como estabilizantes del color, o como agentes floculantes, utilizándose para la clarificación de bebidas (vinos, zumos, etc.) y como agentes que previene la precipitación en el vinagre; se han empleado también como aditivos con características nutricionales ya que proporcionan fibra dietética como uno de los ingredientes funcionales. Su empleo en galletas y pan previene la disminución del volumen de la masa. Como aditivos para alimentación animal se han empleado hasta en un 10% en alimento para pollos; aumenta el crecimiento, el vigor y el número de bifidobacterias en el buche cuya función es impedir el crecimiento de otros microorganismos. Se emplean también en harinas (shellfish) que contienen proteína, quitina y astaxantina y se usan en la alimentación del salmón. (19)

Diversos estudios ponen de manifiesto también la efectividad del quitosano como antioxidante secundario por su habilidad de quelar iones metálicos implicados en la catálisis de las reacciones oxidativas.

ENVOLTURA Y RECUBRIMIENTO PROTECTOR DE ALIMENTOS:

Su uso en películas comestibles puede favorecer la protección de la vida salvaje ya que aunque sean ingeridos por algunos animales (el 30% de los peces marinos tienen plásticos en su estómago) pueden ser fácilmente degradados por enzimas existentes en el estómago de algunos de éstos. También se emplean junto con otros elementos en recubrimientos para frutas (N,O-carboximetilquitina) retrasando el envejecimiento, disminuyendo la oxidación, las pérdidas por transpiración y protegiendo al producto frente al ataque de hongos. (19)

El quitosano representa una alternativa interesante en la formulación de recubrimientos y películas comestibles, debido a sus propiedades bioquímicas y formadoras de películas. Este polímero ha sido empleado con éxito en estudios realizados sobre tomates, pepinos, calabacines y algunas frutas.

Las películas con quitosano son resistentes, duraderas, flexibles y muy difíciles de romper, con propiedades mecánicas similares a algunos polímeros comerciales. Tienen una moderada permeabilidad al agua, constituyen buenas barreras para la penetración del oxígeno, disminuyen las tasas de respiración, retrasan el proceso de maduración (debido al etileno y dióxido de carbono) y además inhiben el desarrollo fúngico. (19)

La estructura molecular del quitosano posibilita también que actúe como liberador de sustancias de una manera controlada, pudiéndose utilizar para incluir aditivos o ingredientes funcionales en los recubrimientos de alimentos frescos o mínimamente procesados. (19)

En un buen protector de alimentos frente a microorganismos (concentraciones => del 0,02% protegen frente a E. coli) como bacterias, levaduras y hongos; es empleado para la obtención de alimentos mínimamente procesados y para retrasar la aparición del off-flavor en la carne. En concreto la acción antimicrobiana la realizan privando a los microorganismos de iones vitales (Cu), bloqueando o destruyendo la

membrana, filtrando constituyentes intracelulares, y formando complejos polielectrolíticos con polímeros ácidos y células de superficie.

3.6.3 EN PROCESOS INDUSTRIALES

Se emplea en la recuperación de proteína de desechos de ovoproductos para alimentación animal, como agente purificador del azúcar, clarificador en industrias de bebida (agua, vino, zumo de manzana y zanahoria) sin afectar el color (0,7 g/L), como finalizador en zumos (quitosano ácido, soluble en agua), coagulación del queso (2-2,5% pH 6, remueve el 90% de los sólidos), retardador del pardeamiento enzimático de jugos de manzana y pera. (20)

3.6.4 MEDICINA

El quitosano y sus formas derivadas son empleada con éxito en diversos ámbitos de la medicina, en otros su aplicación está en fase de estudio y desarrollo. Hoy día se sabe que la quitina y el quitosano han sido usados desde la antigüedad para acelerar el sanamiento de heridas. Los antepasados de los coreanos usaban la quitina en el tratamiento de abrasiones (obteniéndola a partir de los tentáculos del calamar) y los antepasados de los mexicanos aplicaban quitosano para la aceleración de la cicatrización de heridas, los obtenían de las paredes celulares de algunos hongos. (19)

Por las propiedades antimicrobianas, en parte debidas a la presencia de quitosano y β -glucanasa activas, su histocompatibilidad y su capacidad de retención de humedad y de liberación controlada de sustancias así como por sus propiedades mecánicas como la elasticidad, el quitosano forma parte de vendajes. Se emplea como biomaterial para hacer lentes de contacto, hilos de sutura y prótesis, ya que tiene la propiedad de ayudar a la regeneración de huesos, se emplean en gotas oftalmológicas, cremas y recubrimientos para quemaduras, heridas y úlceras, suturas quirúrgicas reabsorbibles, implantes y cultivos de tejido eliminando la contaminación por microorganismos. (19)

A continuación se mencionan algunos usos médicos de estos materiales:

- ✓ Producción de suturas quirúrgicas a partir de quitina.
- ✓ Producción de gasas y vendajes tratados con quitosano.
- ✓ Cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras.
- ✓ Control del colesterol sanguíneo.

En los últimos años algunos estudios han demostrado la capacidad del quitosano para reducir de forma efectiva la absorción de grasa de la dieta, reducir la presión sanguínea y disminuir los niveles de colesterol sérico. Todo ello gracias a un mecanismo de formación de enlaces iónicos con los que se fija a diferente tipo de iones tales como ácidos biliares y ácidos grasos libres, y a su capacidad de formar micelas con el colesterol con lo que disminuye la absorción de ácido cólico y su aporte al hígado. (19)

Por su efecto reductor del colesterol y triglicéridos, es también un agente hipocolesterémico efectivo y selectivo. Al no absorberse a nivel sistémico, ejerce su mecanismo de acción sólo a nivel local, por lo cual no posee ninguna contraindicación, salvo la alergia manifiesta a los crustáceos. Cuando se administra junto con ácido ascórbico se incrementa notablemente la gelificación del quitosano, lo que le permite absorber hasta 12 veces su capacidad para transportar grasas. (19)

Otros campos y acciones muy importantes para la industria farmacéutica se tienen en la aplicación para la distribución controlada de medicamentos en el organismo, actúan como diluyente de medicamentos y tabletas, en el transporte de células, acción antitumoral de los oligómeros de quitosano, materiales para ortopedia, estomatología, en la enfermedad periodontal y como antiplaca ya que eleva el pH; antiácido (previene la gastritis), aumento de la biodisponibilidad del calcio y de la producción de bifidobacterias en el tubo digestivo, es estimulante inmunitario, ayuda en problemas de intolerancia a la lactosa, es secuestrante de sales biliares, protector frente a la diarrea y la constipación y se emplea en la fabricación de membranas renales artificiales. (19)

3.6.5 BIOTECNOLOGÍA

El quitosano actúa en la inmovilización de enzimas como la glucosa isomerasa, se emplea en lechos para biorreactores, en la separación de proteínas, en biosensores (monitorizando la oxidación de los lípidos en músculo de pescado y crustáceos), en recubrimientos celulares, cromatografía, inmovilización celular, reacción con aldehídos, captación de células y enzimas y en la producción de proteínas de única célula. (19)

3.6.6 AGRICULTURA

En recubrimientos de semillas, como fertilizante y spray foliar, en la conservación de las frutas, como nematocida e insecticida, en la protección frente a plagas y ataque de hongos, como viricida y estimulante del crecimiento ya que participa en el transporte de nutrientes. (19)

3.6.7 COSMÉTICA

Son varias sus aplicaciones en la industria cosmética; por sus propiedades humectantes se emplean como ingrediente en cremas de manos, lociones de baño etc., por sus propiedades abrasivas se emplean en la limpieza de la piel. Su polaridad positiva le da características como fijadores para el cabello. Se emplean con éxito como soporte apropiado para otros ingredientes por lo que se adicionan en pasta de dientes y colutorios bucales. Su empleo en el tratamiento de la celulitis se encuentra patentado. (19)

Fabricación de cápsulas para adelgazar, denominadas “atrapagrasas”. Quizás sea la aplicación más extensamente aprovechada del quitosano (Outfat es solo una de las marcas más conocidas). Esto se debe a que la estructura del quitosano es la de una cadena polisacárida glucosídica, con grupos aminos con carga positiva. La fibra del quitosano difiere de las otras fibras por el hecho de que posee una carga eléctrica positiva. Esta carga le permite enlazarse químicamente a los lípidos, grasas y bilis cargados negativamente.

El Quitosano tiene la propiedad única de unirse a las grasas en el tracto digestivo antes de que éstas entren en contacto con las enzimas digestivas y se absorban. Ser biodegradable y carecer de efectos secundarios lo convierte en un producto con numerosas aplicaciones en el campo de la medicina, la bioquímica, la cosmética y la nutrición. (19)

También se le han atribuido otras propiedades como un efecto antiácido útil para el tratamiento de las úlceras gastroduodenales, tiene un efecto hipouricemiente, así como un potencial efecto beneficioso en el tratamiento de la enfermedad celíaca.(19)

Aditivo bactericida en jabones, champúes, cremas de afeitado, cremas para la piel, pasta dental, etc.

Agente hidratante para la piel, debido a que sus geles pueden suministrar agua y evitar la resequeidad. Además, el quitosano forma una película que ayuda a dosificar otros principios activos. (20)

3.6.8. INDUSTRIA PAPELERA

Se emplea como aditivo en la elaboración del papel ya que aumenta el rendimiento de la pulpa y de la capacidad de retención de agua (pañuelo de papel), como adhesivo, aplicado en la superficie del papel le da mayor resistencia y una mejor fijación de la tinta, papel fotográfico, separación de productos y recuperación de componentes de la industria papelera. (19)

3.6.9 TECNOLOGÍAS DE MEMBRANA

Para la separación de componentes en forma de filtros moleculares, en columnas cromatográficas, como absorbentes de encapsulación, para el control de permeabilidad, en ósmosis inversa, electrodiálisis, quitina magnética y aislamiento de lisozima. (19)

3.6.10 ALIMENTOS NUTRACEÚTICOS

En alimentos funcionales (bebidas, barras comestibles, etc.), se emplean por sus características de solubilidad y la posibilidad de obtención de múltiples compuestos derivados. (19)

3.6.11 INDUSTRIA TEXTIL

El quitosano como agente para evitar el encogimiento de los tejidos y fijador del color es muy útil en la industria textil.

Biosensores son numerosísimas las aplicaciones del quitosano en este campo, especialmente como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico. Algunos ejemplos son:

Sensor para glucosa en sangre humana, basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre quitosano, usando adicionalmente Azul de Prusia⁴.

Sensor para la detección de fenoles en aguas de desecho en plantas industriales, basado en la inmovilización de la enzima tirosinasa.

Sensores basados en la inmovilización de nanopartículas espacialmente ordenadas. (20)

AGENTE ANTIMICROBIANO

En lo que respecta a la actividad antimicrobiana del quitosano, su espectro de actuación es amplio, afectando a bacterias, mohos y levaduras. Esta propiedad ha sido ampliamente descrita en la literatura científica, sobre todo en estudios basados en experimentos *in vitro* frente a diversos grupos de microorganismos. Aunque su actividad antimicrobiana depende de diversos factores que pueden limitar su eficacia, los estudios demuestran que se puede considerar un compuesto interesante para su utilización como conservador en alimentos, con un potencial considerable para mejorar la calidad y seguridad de los mismos. (19)

Los mohos y levaduras son el grupo más sensible al quitosano, seguidos de las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas.

En el área de la cirugía plástica ayuda al restablecimiento de los tejidos, evita la mala cicatrización, sirve para la fabricación de piel sintética y es un agente que inhibe las infecciones en heridas.

La quitina y sus derivados tienen uso potencial en diferentes países, siendo posible su aprovechamiento en países con industria pesquera establecida principalmente Japón, China y Estados Unidos. En todos ellos ya existe una industria consolidada alrededor de este polímero, siendo China el principal productor y exportador de quitina. Chile y España están en una fase incipiente, a la par de algunos países de América Latina.

En México ha sido un tema poco estudiado, y si se toma en cuenta la abundancia de su industria pesquera y la amplitud de sus litorales se desprende la necesidad e importancia de hacer estudios específicos para nuestro país.

Los usos tan variados de la quitina y del quitosano han llevado a los fabricantes de reactivos a tenerlos en sus catálogos en el Aldrich del 2007-2008 registran al quitosano de peso molecular bajo o mediano y con una viscosidad de 20 a 80 cp y 75 a 85 % desacetilado con un costo de US\$120 por 250 g.

Estos precios indican que deben mejorarse la técnica, para tener un precio más accesible a todas las industrias que lo emplean.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS GENERALES

El quitosano es un copolímero de glucosamina y N-acetilglucosamina. La N-acetilglucosamina (NAG) es una forma acetilada de la glucosamina que es uno de los componentes estructurales del tejido de las articulaciones y del tejido conectivo.

La glucosamina o 2-amino-2-deoxi-beta-D-glucopiranosido es un aminoazúcar, precursor importante en la biosíntesis de los cartílagos, es un componente fundamental de los péctidoglucanos, y de proteínas con un elevado contenido de carbohidratos ligados. Los péctidoglucanos y el colágeno componen la mayor parte de la matriz cartilaginosa. Los péctidoglucanos son esenciales para tener cartílagos saludables porque permiten ligar el agua que lubrica y amortigua las articulaciones. Los cartílagos recubren las cabezas de los huesos o las superficies articuladas,

protegen la articulación y le dan amortiguación. La degeneración del cartílago de las articulaciones puede provocar el dolor que acompaña a la osteoartritis. (21)

3.7 IMPORTANCIA DE LA GLUCOSAMINA

Este compuesto ocupa un lugar esencial en los mecanismos naturales de auto reparación de las articulaciones. La glucosamina contribuye de distintas maneras al mantenimiento la reparación de los cartílagos. La glucosamina en su estado natural se encuentra en nuestros músculos y articulaciones. Es un compuesto importante para la movilidad diaria y también de la salud de nuestros cartílagos, tendones y ligamentos. Es esencial en la producción y regeneración del cartílago, así como del líquido sinovial (el aceite de las articulaciones). Puede fortalecer el núcleo de los discos intervertebrales, y es también necesaria para el desarrollo sano de uñas, tendones, piel, ojos, huesos, ligamentos y mucosas. (21)

3.8 CARACTERÍSTICAS DEL CARTÍLAGO

El cartilago es un tejido esponjoso que forma parte esencial de las articulaciones, recubre los extremos de los huesos, ofreciendo una superficie esponjosa y lubricada que amortigua, al mismo tiempo que posibilita el movimiento sin que haya fricción.

Nuestro cuerpo tiene 143 articulaciones diferentes de las cuales depende nuestra capacidad de movimiento. Las articulaciones se clasifican en 3 tipos:

- Fijas: como las uniones de los huesos del cráneo en las cuales prácticamente no hay movimiento.
- Poco móviles: como la articulación sacroiliaca (conexión entre la columna lumbar y la pelvis) que tienen poca movilidad.
- Los móviles: que tienen amplia movilidad, que se presentan en formas y tamaños diversos y dan la posibilidad de diferentes formas de movimientos. Es en éstas donde el cartílago es más importante y son ellas las que más se deterioran en la osteoartritis o enfermedad degenerativa del cartílago.

Algunas articulaciones, como las de las rodillas y de las caderas, deben soportar una carga que fluctúa entre 2.5 y 10 veces el peso corporal según los movimientos que

hagamos. De modo que una persona de 90 Kg. puede llegar a soportar un peso de hasta 900 Kg. (21)

COMPOSICIÓN DEL CARTÍLAGO

Sabemos que el hielo es sumamente deslizante; pues bien, el cartilago es de 5 a 8 veces más resbaladizo que el hielo, pero a diferencia de éste; no es frágil sino esponjoso (figura 4). El cartilago está formado fundamentalmente por agua (65 a 80%) y el resto se compone de colágeno y proteoglicanos.

El colágeno es, un tipo de proteína presente en muchos lugares del cuerpo, le da elasticidad y amortiguación a las articulaciones y mantiene en su lugar a los proteoglicanos.

Los proteoglicanos, formados por proteínas y azúcares, conforman una red densa que es capaz de atrapar agua. Cuando la articulación se comprime expulsan el agua, cuando se relaja la reabsorben. Funcionan pues como una esponja que amortigua la carga de las articulaciones.

La otra estructura esencial del cartilago son los condrocitos, unas células que están distribuidas por todo el cartilago y que son las encargadas de producir el colágeno y los proteoglicanos. (21)

Estructura de una articulación sinovial

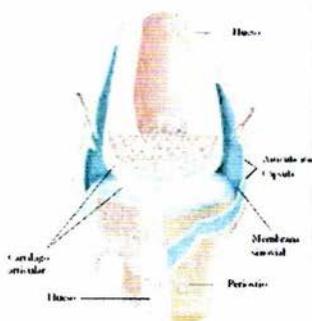


Figura 4. Estructura del cartilago.

3.9 LA GLUCOSAMINA Y LAS ARTICULACIONES

La glucosamina cumple, como ya se mencionó, varias funciones en el cartílago:

- Forma parte esencial de los proteoglicanos y es indispensable para producir los glucosaminglicanos, unas proteínas del cartílago que acumulan agua.
- Actúa como estimulante sobre los condrocitos, las células encargadas de producir el colágeno y los proteoglicanos. La glucosamina es el factor que determina la cantidad de proteoglicanos que los condrocitos pueden sintetizar. A menor cantidad disponible de glucosamina menor será la síntesis de proteoglicanos y por ende, menor la capacidad del cartílago para atrapar agua y amortiguar el peso.
- El sulfato de glucosamina proporciona cantidades importantes de azufre que es un nutriente esencial para las articulaciones. De hecho, los individuos que sufren de artritis generalmente presentan deficiencia de dicho nutriente (figura 5).
- La glucosamina estimula los mecanismos de autoreparación de los cartílagos articulares. (21)



Figura 5. Estructura ósea de la artritis.

LA GLUCOSAMINA COMO AGENTE TERAPÉUTICO

Por sus propiedades la glucosamina constituye el agente terapéutico más eficaz actualmente conocido en el tratamiento de la osteoartritis o enfermedad degenerativa del cartílago, que es la forma más común de la artritis y consiste en un desgaste del cartilago, lo cual trae como consecuencia un deterioro progresivo de la movilidad articular. (21)

EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS

El consumo del sulfato de glucosamina constituye la clave de la regeneración del cartilago y es el elemento esencial de todo el tratamiento de la osteoartritis. La glucosamina, prácticamente no tiene efectos secundarios nocivos. (21)

FORMAS DISPONIBLES Y DOSIS DE LA GLUCOSAMINA

En el mercado se encuentran varias formas de la glucosamina:

El sulfato de glucosamina.

- N-Acetil-Glucosamina (NAG), que es menos eficaz.
- Clorhidrato de glucosamina es más barato.

El Sulfato de glucosamina es el más recomendable de los tres presentaciones mencionadas por varias razones:

- Es la forma bajo la cual la glucosamina ha sido investigada en numerosos estudios.
- Presenta un porcentaje muy alto de absorción por vía oral, hasta de 98%.
- Una vez absorbida se dirige rápidamente a las articulaciones y se fija al cartilago, ligamentos y tendones.
- No existen estudios doble ciego ni sobre la absorción, ni sobre la eficacia de la NAG.
- La fijación de la NAG a la matriz del cartilago ha sido puesta en duda por algunos estudios.
- Un alto porcentaje de la NAG ingerida es destruida por las células intestinales y, tiende a ser expulsado por las heces fecales.

- No existe suficiente evidencia científica para apoyar el uso del Clorhidrato de glucosamina.
- Sólo el Sulfato de glucosamina proporciona azufre que es de vital importancia para tratar la artritis. (21)

El sulfato de glucosamina puede aliviar los problemas articulares asociados con las lesiones deportivas y la artritis. En un estudio realizado durante tres años sobre el desarrollo a largo plazo de la artrosis de rodilla, en el que participaron 212 personas, se compararon los efectos de tomar sulfato de glucosamina con un grupo placebo. Las personas del grupo placebo mostraron un estrechamiento progresivo del espacio articular de la rodilla, mientras que las que tomaban sulfato de glucosamina no mostraron pérdidas significativas del espacio articular. Además gozaron de mejoras importantes a lo largo de los tres años que duró la prueba en cuanto al dolor y las incapacidades que sufrían.

Muchas pruebas han confirmado que el sulfato de glucosamina ha tenido más éxito que otros medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs). No se han apreciado efectos secundarios significativos, aunque no debe ser tomada durante el embarazo, ya que no se han estudiado aún sus posibles efectos. (21)

EFFECTOS SECUNDARIOS

Los efectos secundarios normalmente consisten en molestias gastrointestinales como náuseas, diarrea, indigestión y agruras, que generalmente ceden al ingerirla con los alimentos o a las pocas semanas de usarla. No produce reacciones alérgicas de ningún tipo.

De acuerdo con la Asociación Farmacéutica Americana y la Sociedad Nacional de Profesionales Farmacéuticos, la reacción alérgica que padecen algunas personas es provocada por la carne de mariscos. Aunque la glucosamina es elaborada con el caparazón de langostas, camarones y cangrejos, a veces una pequeña cantidad de la carne de estos crustáceos puede quedar adherida al caparazón durante el procesamiento de este suplemento. Por lo tanto, si una persona es alérgica a los crustáceos no debe tomar glucosamina o debe consumirla con precaución. (21)

INDICACIONES

La glucosamina está indicada en el tratamiento de la osteoartritis pues regenera el cartilago dañado. Pero además es útil en términos preventivos para los siguientes casos:

- En deportistas de alto rendimiento para prevenir el daño al cartilago.
- En lesiones del cartilago por traumatismos.
- En personas obesas para proteger el cartilago.
- En personas de edad avanzada. (22)

El sulfato de glucosamina ha sido el más estudiado, pero existen otras alternativas como el clorhidrato y la N-acetil glucosamina con evidencias clínicas de menor eficacia. Al inicio del tratamiento puede utilizarse la vía parenteral para lograr un efecto más rápido y potente. Se recomiendan ciclos de dos ó tres meses dos veces al año por lo menos.

Se encuentra disponible es cápsulas de 250 mg, sobres de 1.500 mg y ampolletas de 400 mg. (23)

GLUCOSAMINA

En estudios experimentales in vitro se ha demostrado que la glucosamina tiene una actividad estimuladora sobre los condrocitos, incrementa la síntesis de colágeno, una acción inhibitoria de las colagenasas y fosfolipasa A2 y provoca una disminución de los radicales libres de superóxidos. Produce efecto analgésico pero se desconoce el mecanismo de acción. Existen estudios clínicos controlados con placebos y AINES, doble ciegos, en los que se demostró un control del dolor más eficaz y duradero que el obtenido con el AINE. (23)

BIOQUÍMICA Y METABOLISMO DEL SULFATO DE GLUCOSAMINA

La Glucosamina (2-amino-2-deoxi- alfa-D-glucosa) y la galactosamina son los dos hexosamino-azúcares (aminados de 6 carbonos), que se encuentran en las células animales. Estructuralmente, la glucosamina es una molécula de glucosa modificada

por reemplazo de un grupo OH por un grupo NH₂ que se encuentra en el carbono 2 (C-2). La Glucosamina es un amino monosacárido producido por el organismo por combinación de glutamina con fructosa, a través de la acción enzimática de la glucosamino sintetasa.

Se encuentra en muchos tejidos y secreciones corporales y es el principal sustrato de monoaminosacáridos necesarios para la síntesis de macromoléculas tales como ácido hialurónico. Se cree que el papel de la glucosamina es potenciado por la presencia de sulfato, que también es un componente esencial de los proteoglicanos.

La síntesis de glucosamina se inicia con la reorganización estructural de la glucosa-6-fostato a fructosa-6-fostato para facilitar la interacción con glutamina. La glucosamino sintetasa facilita la transferencia de un grupo amida de la glutamina a la fructosa-6-fostato. La enzima simultáneamente isomeriza este compuesto para formar glucosamina. La molécula resultante es la precursora de todas las hexosaminas y sus derivados. Luego, la glucosamina es acetilada por la coenzima A, formando N-acetil- glucosamina (NAG), que posteriormente se convierte en N-acetilgalactosamina o en N-acetilmanosamina. La glucosamina y sus derivados pueden incorporarse a todas las macromoléculas que requieran monoaminosacáridos.

La glucosamina es una molécula pequeña (PM 179) e hidrosoluble, por lo que es absorbida con facilidad por las células intestinales por medio de transporte activo. En los seres humanos, cerca del 90 % de la glucosamina administrada como dosis oral de sulfato de glucosamina, es absorbida rápidamente. No se conoce si la molécula se absorbe intacta o sufre algún proceso de degradación.(24)(25) Luego de su ingestión la glucosamina se concentra en el hígado, desde donde puede seguir tres vías diferentes: incorporarse a las proteínas plasmáticas, ser degradada a moléculas de menor tamaño o ser utilizada para otros procesos de biosíntesis. La eliminación de la glucosamina es principalmente por vía urinaria, aunque una pequeña parte de la glucosamina o sus metabolitos son eliminados por las heces.(25)(26)

La glucosamina es rápidamente incorporada al cartílago articular, que es el tejido que concentra más glucosamina. (24)(25)

MECANISMO DE ACCIÓN

El sulfato de Glucosamina estimula la síntesis e inhibe la degradación de proteoglicanos y estimula la regeneración del daño al cartílago articular inducido experimentalmente. (27)(28)

Algunos expertos consideran que el sulfato de Glucosamina promueve la incorporación de azufre al cartílago articular.(29)

El sulfato de Glucosamina no parece ser efectivo en la inhibición de la ciclooxigenasa y las enzimas proteolíticas relacionadas con la inflamación (tabla 2)(30). Aunque protege contra el edema inducido por carragenina, dextrano y formalina en los modelos experimentales, no fue efectivo en contrarrestar el edema provocado por mediadores específicos del proceso de inflamación, tales como bradiquinina, serotonina o histamina. A diferencia de los AINE, que actúan a través de inhibición de la ciclooxigenasa y modifican la síntesis de prostaglandinas, el mecanismo de acción del sulfato de Glucosamina parece relacionarse a su capacidad de estimular la síntesis de proteoglicanos necesarios para estabilizar las membranas celulares y aumentar la sustancia basal intracelular. (28)(31)

En vista de que el mecanismo de acción antiinflamatorio del sulfato de glucosamina es diferente al de los AINE, es posible que ambos tengan un efecto sinérgico en el alivio de algunos procesos inflamatorios. La evidencia indica que el tratamiento combinado utilizando glucosamina y diclofenaco, indometacina o piroxicam puede disminuir las cantidades de AINE requeridas para producir un resultado antiexudativo. (32)



Tabla 2. Mecanismo de acción de sulfato de glucosamina.

La glucosamina es un suplemento natural seguro y eficaz. Se ha demostrado que su utilización es más segura que la de las NSAIDS (drogas anti-inflamatorias no-esteroides). Como no se han establecido relaciones entre la glucosamina y los efectos a largo plazo tan comunes con las NSAIDS, su utilización a largo plazo es segura. (33)

PRECAUCIÓN

Las personas que presenten las afecciones enunciadas a continuación deben tomar precauciones con estos suplementos:

DIABETES

Dado que la glucosamina es un aminosacárido, las personas con diabetes deben controlar los niveles de azúcar en sangre con más frecuencia al tomar estos suplementos.

Alergia a los mariscos. Si es alérgico a los mariscos, debe consultar al médico antes de comenzar a tomar glucosamina. En la mayoría de los casos, las alergias son causadas por las proteínas que se encuentran en los mariscos y no por la quitina. (34)

Cada persona produce cierta cantidad de glucosamina en su organismo. La gente pierde la capacidad de producir suficiente glucosamina a medida que envejece. Los cartílagos de las articulaciones que soportan peso, tales como las caderas, las rodillas y las manos, son destruidos, luego se endurecen y se forman espolones óseos, lo que causa dolores, articulaciones deformadas y limita el movimiento de las articulaciones. El hecho de tomar glucosamina como suplemento puede ayudar a cubrir esta deficiencia y restaurar el equilibrio de la glucosamina ya que esta sustancia no se encuentra en nuestra alimentación. (34)

Las fuerzas de carga de peso podrían rápidamente provocar degeneración sin un apropiado sistema. El líquido sinovial es un líquido claro y viscoso (Syn=como, oval=relativo y huevo) producido por las células que rodean la membrana sinovial de la cápsula articular. Este líquido aporta lubricación a las superficies articulares, previene el contacto de las superficies, aporta nutrientes a las células del cartilago articular y elimina productos de desecho. (34)

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Proteoglicanos

Una apreciación de la estructura de los proteoglicanos es fundamental para entender la función de estas moléculas en el cartilago articular. Los proteoglicanos están compuestos por numerosas cadenas de glucosaminoglicanos que están unidas de manera covalente a una proteína central.

Los glucosaminoglicanos son unidades de disacáridos unidos en los que uno de los azúcares se une a un azúcar aminosulfatado.

Existen cuatro glucosaminoglicanos que pueden asociarse con proteoglicanos: Hyaluronan, Condroitín sulfato y dermatán sulfato, Heparan sulfato y Keratán sulfato.

La diferencia entre los diferentes glucosaminoglicanos son los restos de azúcares, el tipo de unión entre estos, y el número y localización de los grupos sulfato. El Hyaluronan es un disacárido de glucuronato y N-acetilglucosamina y es la única glucosamina que no está sulfatada. El Condroitín sulfato es un disacárido de glucuronato de N-acetyl galactosamina mientras que el dermatan sulfato es derivado del Condroitín sulfato por epimerización del glucuronato en iuduronato. Keratán sulfato es un disacárido de galactosa y N-acetil glucosamina, mientras que el heparán sulfato contiene iuduronato y N-acetil glucosamina. La mayoría de los glucosaminoglicanos son covalentes y van unidos a una proteína (central) para producir proteoglicanos. El Hyaluronan es una excepción en que no está unida a una proteína central.

Los proteoglicanos tienen la capacidad de una hidratación altamente especializada mientras las fibras de colágeno están sometidas a una tensión extrema. (35)

No existe un estándar farmacéutico internacional para la glucosamina, con base a la información encontrada hasta ahora. La glucosamina está normalmente en forma de sulfato, pero esta fórmula podría contener otras sales y un poco de agua de cristalización, la cantidad real de glucosamina puede variar de fórmula a fórmula, la estabilidad puede ser un problema y la glucosamina puede estar en combinación con condroitina. Por lo anterior se deduce la importancia de contar con un estándar internacional. (36)

3.10 PERSPECTIVAS FUTURAS

A pesar del gran número de aplicaciones potenciales existentes y el considerable progreso realizado en la investigación de quitina y quitosano, es necesario potenciar su utilización en diversos sectores industriales que, con excepción del campo de la salud humana, se han mostrado hasta ahora reticentes a su aplicación. Ello ha sido debido, por un lado a la falta de confianza en la capacidad de las industrias proveedoras para suministrar materia prima, y por otro lado al papel negativo que han jugado las patentes ralentizando el desarrollo del mercado. En la actualidad, la tendencia del mercado de los productos de quitina y quitosano se dirige a su aplicación dietética y biomédica pero en un futuro próximo debería considerarse la posibilidad de su utilización para el empaquetado de alimentos y otros productos, reduciendo de esta manera el volumen de desechos procedentes de envoltorios y favoreciendo la protección de la vida salvaje.

Dentro de la dinámica actual de reutilización y minimización de residuos la obtención de compuestos de alto valor como la quitina y quitosano, a partir de desechos de crustáceos, representa una interesante oportunidad, para dar valor agregado a algunos residuos sólidos y ayudar en la lucha contra el deterioro ambiental debido a la acumulación de material no aprovechado. (20)

Futuro

Es probable que las aplicaciones más importantes que lograrán tener estos biomateriales en un futuro muy próximo, especialmente en países en vías de desarrollo como el nuestro, serán en el campo de la terapia genética no viral, utilizando una vía alterna a la introducción física directa del material genético dentro de las células. Esta vía, ya probada con resultados alentadores, utiliza la formación de complejos polielectrolitos entre las macromoléculas de ADN y sales inorgánicas, policationes, lípidos, etc., para introducir el ADN en las células.

En el caso del quitosano ya comienzan a vislumbrarse algunas posibilidades en esta área, como por ejemplo las que puedan derivarse de los estudios de transfección *in vitro* e *in vivo* de células de mamíferos, en el tratamiento de enfermedades hereditarias y cáncer. (20)

CAPITULO 2

CARACTERIZACIÓN

Las técnicas instrumentales espectroscópicas como la espectroscopia IR, RMN, C¹³ y la espectroscopia de masas han sido de gran ayuda en la determinación de la estructura de un compuesto sintetizado. Para todas estas técnicas es necesario que el compuesto por analizar esté lo más puro posible, ya que de no ser así se presentan espectros muy complejos, dificultando su interpretación.

4. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

La espectroscopia UV-Vis es una técnica muy sensible para una cuantificación, se puede medir concentraciones hasta de 10^{-5} M. En esta técnica también es importante la pureza de la muestra.

Otra técnica para la cuantificación puede ser la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), sin embargo es conveniente señalar que para tener buenos resultados se requiere de un estándar interno, si la muestra se encuentra en una matriz compleja.

El Análisis por Inyección de Flujo (FIA) usando como detector un espectrofotómetro de UV-Vis, es una técnica rápida y muy sensible. Esta tiene la ventaja que no se requiere todo el espectro de absorción, por lo que es muy adecuada cuando nuestro compuesto que se va a analizar está en una matriz compleja, o que no se tiene totalmente pura.

4.1 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

Considerando las características de los posibles métodos de análisis mencionados anteriormente, se eligió el Análisis por inyección de flujo, FIA con detector Uv-Vis, como el método adecuado para analizar las muestras obtenidas en nuestros experimentos, las determinaciones no requieren mucho tiempo, el equipo es sencillo en su manejo y se pueden determinar las concentraciones de analitos desde ppm hasta g/L.

Los métodos de inyección en flujo, en su forma actual, fueron descritos por primera vez a mediados de los años setenta por Ruzicka y Hansen en Dinamarca y Stewart y colaboradores en un primer artículo publicado en 1975 en Estados Unidos.(37)(46) Los métodos de inyección en flujo son una consecuencia de los métodos de flujo segmentado, muy utilizados en los laboratorios clínicos entre los años sesenta y setenta, para la determinación rutinaria y automática de distintas especies en sangre y orina, para diagnóstico médico. En los sistemas de flujo segmentado (figura 6), que únicamente los fabricaba una compañía en EEUU, las muestras eran transportadas a través del sistema hasta el detector por medio de una disolución acuosa, que contenía una serie de burbujas de aire muy próximas entre sí. La misión de estas burbujas de aire era evitar la dispersión excesiva de la muestra, promover el mezclado turbulento entre muestras y reactivos y limpiar las paredes del conducto para evitar la contaminación entre muestras sucesivas. Sin embargo, los descubridores del análisis por inyección en flujo observaron que se podría eliminar, casi completamente, el exceso de dispersión y la contaminación entre muestras, si se diseñaba correctamente un sistema sin burbujas de aire y que realizara de forma sencilla la mezcla entre muestras y reactivos.

La ausencia de burbujas de aire le confiere, a las medidas de inyección en flujo, ventajas importantes, como son: (1) análisis más rápidos (típicamente entre 100 y 300 muestras/hora), (2) mejores tiempos de respuesta (a menudo menores de 1 minuto desde la inyección de la muestra hasta la respuesta del detector), (3) menor tiempo entre la aparición de la señal y el retorno a la línea base (menos de 5 min. para cada pico) y (4) equipo mucho más sencillo y versátil, exceptuando el sistema de inyección. Estas dos últimas ventajas tienen una especial importancia, porque hacen factible y económico aplicar medidas automáticas a un número de muestras, no rutinarias, relativamente pequeño. Por tanto, los métodos de flujo continuo ya no deben de quedarse restringidos por más tiempo a situaciones en las que haya un gran número de muestras y el método analítico sea totalmente rutinario. Como consecuencia de estas ventajas, los sistemas de flujo segmentado han sido prácticamente reemplazados por métodos de inyección en flujo continuo y también por sistemas discretos que utilizan robots.

Una definición académica de FIA es la siguiente: Obtención de información a partir de una zona de fluido bien definida, inyectada y dispersada en una corriente continua no segmentada de un fluido portador.

Mientras que una definición aplicativa es la siguiente: Una tecnología simple y versátil para la automatización del análisis químico por vía húmeda, basada en la manipulación física y química de una zona de muestra dispersada, formada a partir de la inyección de la muestra en una corriente de fluido portador, con detección en línea.

En resumen, el FIA es un método automático de análisis en flujo continuo no segmentado (figura 7), cuya característica fundamental es el uso de una corriente continua de líquido en la que se introduce la muestra; después, esta corriente confluye con otra corriente de reactivo. La corriente líquida que se forma es transportada a través de un sistema de tubos hacia el reactor y seguidamente va al detector que mide el producto de reacción que interesa. (38)(39)



FIGURA 7. Configuración básica para Análisis por inyección en flujo.

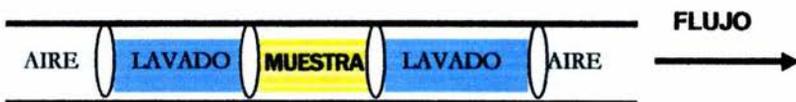


FIGURA 6. Configuración básica para Análisis por inyección por flujo segmentado.

Los rasgos esenciales del FIA son:

El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de CFA (Análisis en Flujo Continuo).

La muestra líquida es inyectada directamente en el flujo.

Se realiza un transporte de la muestra inyectada a través de un sistema de canales en los cuales puede efectuarse un proceso físico-químico adicional, como por ejemplo una reacción química.

La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Se produce una mezcla incompleta pero reproducible, que da lugar a un gradiente de concentración variable con el tiempo a lo largo del sistema.

La señal que proporciona el sistema de detección continua es transitoria.

En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado ni el equilibrio químico ni el físico.

El tiempo de operación debe ser reproducible, pues las medidas se realizan en condiciones de no-estabilidad y por lo tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir grandes alteraciones de los resultados.

La existencia de un régimen de flujo laminar proporciona importantes ventajas al FIA: a) zona de muestra bien definida, b) caudales reducidos, y por tanto, consumos pequeños de reactivos y c) alta frecuencia de muestreo, lo que significa un montaje más sencillo al no ser necesaria una presión elevada ni burbujas separadoras de aire para evitar la contaminación mutua al ser inyectadas sucesivamente. (40)

4.2 DISPERSIÓN CONTROLADA. FUNDAMENTO DEL FIA

Las condiciones habituales del FIA, ocasionan que el bolo de muestra inyectado no alcance el equilibrio físico ni químico, además de originar que este se diluya (disperse) en la disolución portadora o en el reactivo.

El régimen laminar produce una zona bien definida del bolo de la muestra inyectado produciéndose un gradiente de concentración a lo largo del todo el bolo. En la figura 8 se muestra la dispersión que sufre la muestra a lo largo de una configuración FIA; al ser un sistema continuo se obtiene una señal trascendente cuyo máximo corresponde a la parte del bolo menos diluida.

Existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión de bolo de muestra inyectada:

a) El transporte por convección desarrollado en condiciones de flujo laminar, que originan un perfil parabólico donde la velocidad lineal de las moléculas en las

paredes del tubo es igual a cero, mientras que las moléculas que se encuentran en el centro del tubo viajan al doble de la velocidad media.

b) El transporte por difusión debido a la formación de gradientes de concentración (horizontal y/o vertical) en diferentes momentos del transporte por convección.

Por lo tanto, la forma de una señal FIA (pico) dependerá del tiempo en el que el bolo de muestra se encuentra dentro del sistema. A tiempos demasiado cortos la dispersión es prácticamente cero y no se genera un gradiente de concentración en el bolo inyectado; por otra parte, tiempos de estancia largos ocasionan una dispersión muy acusada originando picos muy anchos. Debido a esto es necesario establecer cual es el tiempo de residencia más adecuado, siendo un parámetro difícil de determinar. Generalmente, la señal óptima es aquella en la cual, aun el transporte por convección y por difusión influye de la misma manera, no predominando uno sobre el otro, aunque evidentemente esta decisión dependerá de la reacción que se va a llevar a cabo.

Las características del pico (altura del pico) dependen de las características hidrodinámicas del sistema FIA, caudal, volumen de inyección, longitud del reactor, etc., siendo difícil un modelo teórico de la dispersión capaz de predecir el comportamiento de un bolo inyectado en una configuración FIA. Generalmente los sistemas FIA tienen más de un canal por lo que deben tenerse presentes las confluencias (tamaño y geometría), la geometría de la celda de flujo, las conexiones, el volumen de inyección, etc.

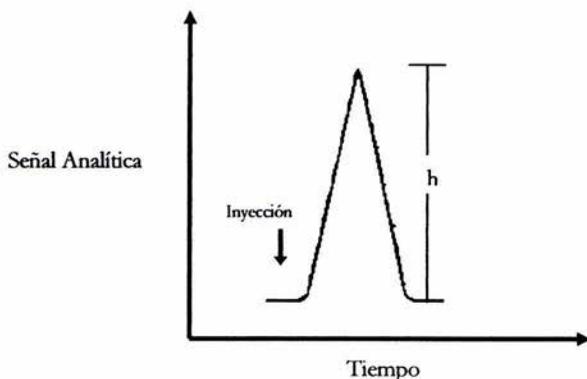


Fig. 8 Señal obtenida en una configuración FIA.

Si se usa como detector un espectrofotómetro de UV se mide absorbancia. Cuando una sustancia recibe radiación monocromática parte la absorbe y parte la transmite; la cantidad de radiación absorbida por una muestra viene dada por la Ley de Lambert-Beer: (41)(42)(46)

$$A = \epsilon bc$$

A= absorbancias

ϵ = coeficiente de absortividad molar

b= longitud de la celda

c= concentración

4.3 COMPONENTES DE UN EQUIPO PARA FIA

1) Sistema de propulsión: bomba peristáltica, bomba de jeringa, balón de gas a presión, gravedad, etc.

2) Sistema de inyección: válvula rotatoria, válvula de conmutación, jeringa y septum, inyección hidrodinámica "FIA sin inyección"

3) Sistema de detección: espectrofotometría de absorción molecular UV-visible e IR, fluorimetría, espectrometría de absorción atómica, fotometría de flama, ICP, potenciometría, conductimetría, amperometría, coulombimetría, voltametría, etc.
(39)(46)

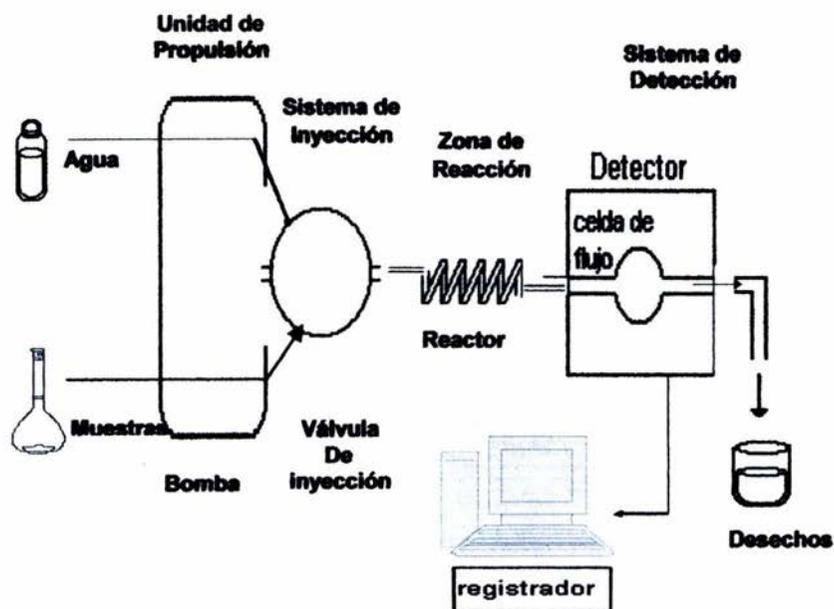


Figura 9. Esquema general de un sistema FIA

4.4 SISTEMA DE TRANSPORTE DE MUESTRAS Y REACTIVOS

Unidad de propulsión.

La unidad de propulsión tiene como misión establecer un flujo de caudal lo más constante posible, ausente de impulsos y perfectamente reproducible. Esto se puede conseguir: por la acción de la gravedad, mediante un sistema de presión gaseosa o con una bomba peristáltica.

En la práctica utilizaremos una bomba peristáltica que consiste en un tambor que contiene una serie de rodillos que comprimen un tubo flexible por el que circula el reactivo o el portador.

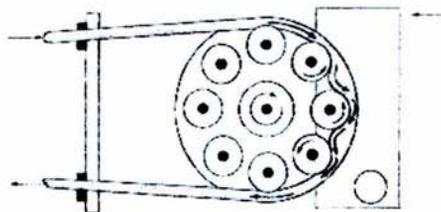


Figura 10. Representación de un canal de una bomba peristáltica

Habitualmente, en un análisis por inyección en flujo la disolución circula a través del sistema por medio de una bomba peristáltica, un dispositivo que comprime, mediante unos rodillos, un fluido (gas o líquido) que se encuentra en el interior de un tubo de plástico. La Figura 10 ilustra el fundamento de una bomba peristáltica. En este caso, unas abrazaderas comprimen continuamente el tubo contra los rodillos, para lograr una corriente permanente de fluido a través del tubo. Las bombas modernas suelen tener 8 o 10 rodillos, dispuestos en configuración circular para que, en todo momento, la mitad de ellos presionen sobre el tubo. Este diseño produce un flujo relativamente libre de impulsos. El caudal se controla mediante el diámetro interno del tubo y la velocidad del rotor. En el mercado hay una amplia variedad de tamaños de tubo (d.i.= 0,25 a 4 mm) para lograr caudales tan pequeños como 0,0005 mL/min. y tan grandes como 40 mL/min. En las bombas peristálticas habituales los rodillos son lo suficientemente largos como para poder manipular varios tubos a la vez. (38)(41)(42)(46)



Figura 11. Foto de la bomba peristáltica (sistema de propulsión).

4.5 INYECTORES DE MUESTRA Y DETECTORES

Sistema de inyección.

Este componente del sistema tiene como misión situar una cantidad perfectamente definida de muestra en el portador.

En los sistemas antiguos de FIA utilizaban jeringas, pero su uso ocasionaba un cambio transitorio en el flujo, que producía un pico agudo e irreconocible. Por este motivo se tuvo que cambiar el sistema de inyección.

Actualmente se utilizan válvulas de inyección rotatorias. Tienen seis orificios, tres de entrada y tres de salida, que pueden estar en dos posiciones:

* De carga.

* De inyección.

Con este sistema se consigue una buena reproducibilidad de los volúmenes suministrados, rapidez y facilidad de manejo, así como una aceptable capacidad de automatización.

En la figura 12 se muestra el mecanismo de acción de la válvula de inyección en sus dos posiciones de carga o llenado o de inyección.



Figura 12. La figura muestra el mecanismo de acción de la válvula de inyección en sus dos posiciones de carga o llenado y de inyección.

Los volúmenes que se inyectan de muestra en los procedimientos de inyección en flujo abarcan desde 5 a 200 μL , siendo los más usuales en la mayoría de las

aplicaciones los de 10 a 30 μL . En un análisis bien hecho, es vital que la disolución de la muestra se inyecte rápidamente, de golpe o como un bolo de líquido; además, las inyecciones no deben alterar el flujo de la corriente portadora.

En la Figura 12 puede verse la forma normal de introducir la muestra. Cuando la válvula de inyección está en la posición indicada, los reactivos fluyen por una derivación, mientras que la muestra fluye a través de la válvula. Cuando se gira la válvula 90 grados, la muestra entra en la corriente y forma una zona perfectamente definida. En la práctica, cuando la válvula está en esta posición, el flujo a través de la derivación cesa porque el diámetro del bucle de muestra es mucho mayor que el del tubo de la derivación. (38)(41)(42)(46)

4.6 ZONA DE REACCIÓN

Puede ser diferente dependiendo de la cinética de la reacción. Si la cinética es rápida se utilizan reactores de corta longitud o reactores de tubo liso. Si la cinética es lenta se pueden utilizar tubos con cámara de mezcla o un serpentín de una determinada longitud. Esta zona de reacción también se le conoce como “reactor”.

El transporte de muestras en los sistemas FIA se produce en régimen laminar, lo que origina un perfil parabólico de velocidades al circular las partículas interiores del fluido más rápidas que las exteriores. Rápidamente el transporte se debe a la difusión axial -producida por un gradiente de concentración horizontal y a difusión radial- producida por la diferencia de concentración entre puntos situados perpendicularmente a la dirección del flujo. El que predomine un transporte u otro depende del tiempo que la muestra tarde en llegar desde el sistema de inyección a la zona de reacción. Con esto lo que se busca es que el transporte sea una mezcla de ambos tipos de difusión, para eso necesitamos controlar el caudal y la longitud del reactor. En FIA se suele trabajar con caudales de entre 0.5 y 3 mL/min. y con reactores de entre 50 y 200 cm. (38) (41) (42)(46)

GEOMETRÍA DE LA ZONA DE REACCIÓN O REACTORES

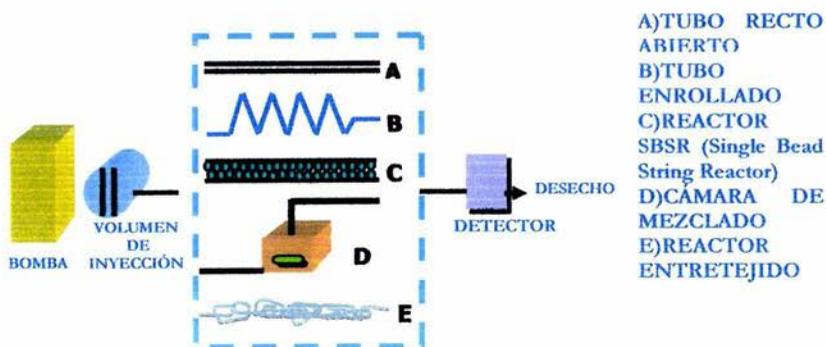


Figura 13. Tipos de reactores en FIA. Apuntes de FIA. Dra. Ma. del Pilar Cañizares M.

Los reactores son unidades dentro del sistema de transporte que actúan sobre el tiempo de residencia y perfil del bolo de muestra, de forma que a su paso por la unidad de detección ésta posea las características adecuadas para la medida o la detección de la respuesta. Pueden responder a diferentes tipos, en función de las necesidades de cada sistema (figura 13).

Tubo recto abierto: Reciben este nombre los reactores constituidos por un tubo recto de diámetro y longitud variable, el cual se encuentra situado en el sistema de inyección y/o en el de detección.

Tubo enrollado o serpentín: (figura 14) Estos reactores reciben este nombre, ya que se encuentran enrollados helicoidalmente en torno a un cilindro de diámetro variable (varilla de vidrio o plástico). La longitud de este tubo está en función del tiempo de residencia requerido para la mezcla más adecuada del portador o reactivo y la muestra. El diámetro del serpentín modifica la dispersión de la muestra. Este tipo de reactores es el más común y es el que más se utiliza tanto en la industria como en la investigación.

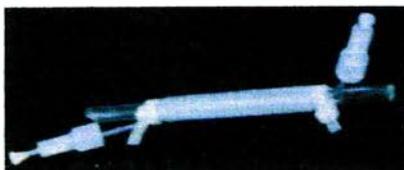


Figura 14. Reactor del tipo serpiente.

Reactor SBSR o Single Bead String Reactor cuyo nombre en español sería: Reactor de Bolitas en Cadena Simple; consiste en un tubo de longitud variable relleno de bolitas o de un polímero químicamente inerte cuyo diámetro es de un 60 a un 80 % del diámetro del tubo, de forma que en cualquier sección del mismo existe una única bolita. El volumen no ocupado por el relleno es grande, por lo que el flujo no encuentra mucha resistencia a su paso. El uso de este reactor presenta una serie de ventajas, como son: el aumento del tiempo de residencia (benéfico cuando la reacción es muy lenta), disminución ostensible de la dispersión (incremento de la señal, utilizando menos muestra o concentraciones muy bajas de ésta) y aislamiento de la línea base en relación con los tubos abiertos, probablemente debido a que las bolitas actúan como supresoras de impulsos. El tiempo de retorno a la línea base permanece razonablemente constante para diferentes longitudes del reactor.

Cámara de Mezclado: Se utiliza cuando se precisa un mayor grado de mezcla (punto de confluencia o minicámara sin agitación) o una total homogeneización de muestra y reactivo (minicámara con agitación). Generalmente se requiere un mayor grado de mezcla cuando se utiliza un sistema eléctrico de detección y cuando las diferencias de viscosidad, gravedad específica, temperatura, contenido en detergentes, etc. entre el portador y la muestra son muy grandes. También se emplean para llevar a cabo las denominadas valoraciones FIA. (38)(41)(42)(46)

4.7 ZONA DE DETECCIÓN Y SISTEMA DE DETECCIÓN (ESPECTROFOTÓMETRO)



Figura 15. Celda de Peek. (Zona de detección)

Un detector para que resulte adecuado en FIA, deberá poseer las siguientes características: Pequeño volumen, bajo nivel de ruido, señal independiente del caudal, respuesta rápida y lineal en un amplio margen de concentraciones y alta sensibilidad como ejemplo: un detector como un espectrofotómetro UV/Visible, y una celda de flujo peek. La señal analítica que se obtiene en un sistema FIA se denomina Diagrama y es una representación de la señal medida frente al tiempo (pico).

En la figura 15 se muestran dos ejemplos de celda de flujo para FIA y en la figura 16 un equipo comercial FIA. (39)(43)(46)



Figura 16. Ejemplo de un equipo comercial de FIA: incluye una bomba peristáltica (zona de propulsión), zona de reactor, zona de detección.

4.8 VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS ANÁLISIS AUTOMÁTICOS

Los instrumentos automatizados ofrecen una importante ventaja económica al ahorrar costos. En los laboratorios que diariamente realizan un elevado número de análisis de rutina, mediante la automatización, se puede lograr un ahorro enorme.

La segunda ventaja importante de los instrumentos automatizados es su velocidad, que suele ser significativamente mayor que la de los dispositivos manuales. De hecho esta velocidad posibilita el control continuo de la composición de los productos mientras se van fabricando y, a su vez, esta información permite modificar las condiciones para mejorar la calidad o el rendimiento. El control continuo también es muy útil en medicina, ya que los resultados analíticos pueden usarse para establecer las condiciones normales de los pacientes y su respuesta a la terapia.

La tercera ventaja de la automatización es que con un buen analizador se pueden conseguir resultados, durante largos períodos de tiempo, más reproducibles que los que obtendrían con un operador utilizando un instrumento manual. Este aumento de la precisión de un dispositivo automatizado se considera que se debe a dos razones. Un factor que contribuye de manera muy importante a la precisión, es la elevada reproducibilidad de las medidas de los tiempos en las sucesivas operaciones de los instrumentos automatizados, una reproducibilidad que raramente se puede lograr con los métodos manuales. Por ejemplo, los analizadores automáticos permiten usar reacciones colorimétricas sin alcanzar el punto final, o las que dan lugar a productos cuya estabilidad no sea apta para medidas manuales. Asimismo, las técnicas de separación como diálisis o extracción con disolventes, en las que la recuperación del analito es incompleta, siguen siendo aplicables si se utilizan sistemas automatizados. En ambos casos, la gran reproducibilidad de la medida del tiempo en la secuencia de las operaciones, garantiza que las muestras y los patrones se procesen exactamente igual y justamente en el mismo período de tiempo. (38)(44)(46)

CAPITULO 3

5. FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN

Como se ha señalado, la quitina es un polisacárido nitrogenado que constituye el esqueleto externo (exoesqueleto), de los insectos y los crustáceos. Si la quitina se encuentra desacetilada en un 80% o más, es denominada quitosano. Ambos biopolímeros están químicamente relacionados: la quitina, es una poli(β -N-acetil-glucosamina) (figura 17), la cual, mediante una reacción de desacetilación que elimina al menos un 50 % de sus grupos acetilo, se convierte, en quitosano (poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100 % el polímero se conoce como quitano.

La hidrólisis de la quitina como se menciono produce glucosamina, que es un monosacárido derivado de la glucosa. Estructuralmente, la glucosamina es una molécula de glucosa modificada por reemplazo de un grupo OH por un grupo NH₂ que se encuentra en el carbono 2 (C-2). La quitina se disuelve lentamente en soluciones de hipoclorito a la temperatura ordinaria, pero es insoluble en el reactivo de Schweitzer y se diferencia de la celulosa por estos dos aspectos. De igual manera se disuelve en una solución de sodio en amoniaco líquido, con formación de un compuesto monosódico.

El interés por el quitosano se debe principalmente a su propiedad de formar numerosas sales tanto solubles como insolubles en agua. Las altas concentraciones de ácido empleado en la hidrólisis producen degradación en tal grado que el producto final tiene a veces viscosidad menor. Como la viscosidad final del quitosano está determinada por la magnitud de la degradación, lo mejor es mantener la concentración de ácido alrededor de 3%, o menos, mientras se mantiene la temperatura a unos 25°C.

Estos dos biopolímeros como se ha mencionado la quitina y el quitosano han estado presentes en la naturaleza desde hace millones de años. En efecto, por los hallazgos paleontológicos, es posible asignarle a la quitina una edad de al menos 570 millones de años al haber sido encontrada en el exoesqueleto de artrópodos acuáticos fósiles conocidos como trilobites, que datan de la era paleozoica. (20)

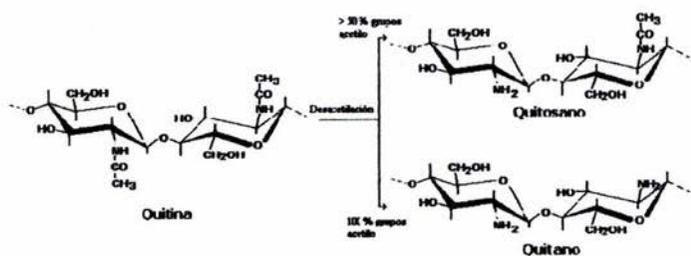
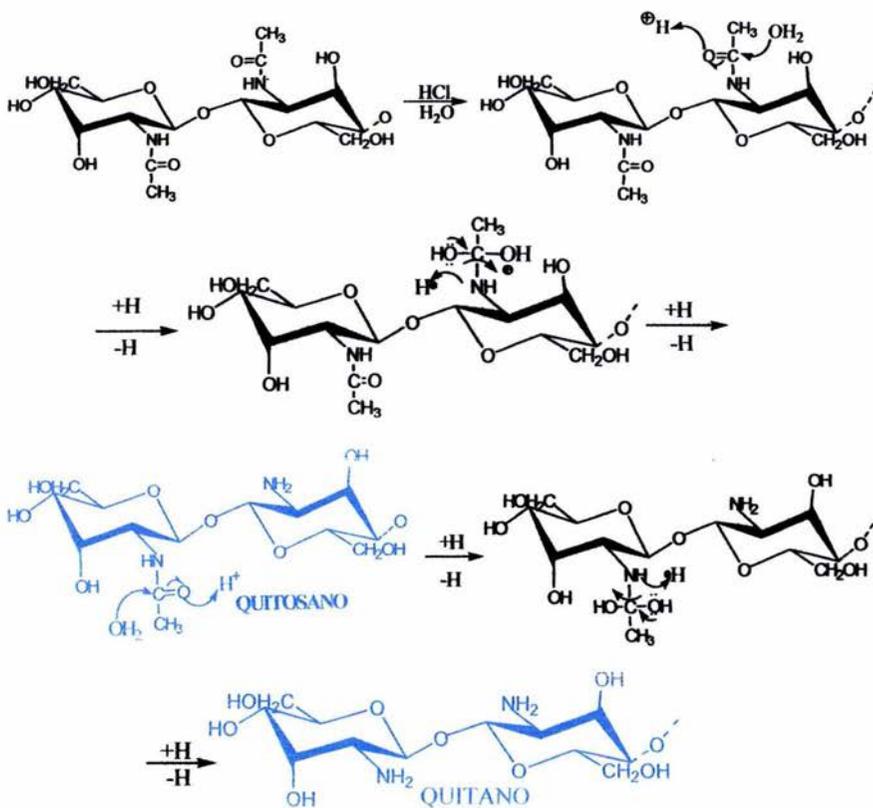


Figura 17. Desacetilación de la glucosamina y sus productos.

Mecanismo de reacción de la quitina para la obtención de la glucosamina.



CAPITULO 4

6. METODOLOGÍA

6.1 PROCEDIMIENTO

Los residuos pesqueros empleados en los experimentos realizados fueron adquiridos en el mercado de la Viga de la ciudad de México. En los diversos experimentos se trabajo con porciones de 200 g de caparzones de crustáceos o residuos, que se conservaron en una mezcla alcohol-agua 3:7 para su transporte hasta su empleo en el laboratorio.

Ya en el lugar de trabajo se limpiaron mecánicamente y se despojaron de la parte carnosas que aun les quedaba.

Se cortaron en trozos pequeños, los cuales fueron sometidos a un tratamiento con ácido clorhídrico al 5 % y se maceraron durante 6 hrs, a temperatura ambiente.

Se hicieron diversos ensayos variando la concentración de ácido y el tiempo de exposición hasta encontrar las condiciones óptimas de digestión. Durante el proceso se degradan proteínas, lípidos y sales de calcio que se encuentran como fosfatos y carbonatos, y se libera astaxantina, estos compuestos se encuentran en los productos de la digestión (sobrenadante) y se pueden comercializar. De esta digestión se desprende bióxido de carbono, el cual es un indicador de que la desmineralización se ha efectuado. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con agua destilada.

Del residuo anterior se tomaron varias muestras de 2 g en cada ensayo. Se sometieron a una hidrólisis, variando la concentración del ácido, tiempo de exposición y la temperatura. En todos los caso se empleó agitación magnética constante. Se trabajo también con ácido sulfúrico a diferentes concentraciones y en las mismas condiciones que para el ácido clorhídrico. Esto ultimo para comparar los resultados obtenidos con ambos ácidos.

Las condiciones óptimas de trabajo se obtuvieron realizando la hidrólisis con ácido clorhídrico o sulfúrico al 50 % (v/v): con agitación constante a temperatura de 70 a 75° durante 5 hrs. A estas condiciones, prácticamente todo el residuo sólido quedó disuelto. Mediante este proceso de hidrólisis se garantiza la obtención en disolución de la glucosamina que es nuestro analito de interés.

Se filtró la mezcla obtenida en el inciso anterior y se lavo con agua destilada.

Junto con las muestras de hidrólisis, se preparo un blanco de reactivos bajo las mismas condiciones.

La solución filtrada se calentó con parrilla a presión atmosférica, para reducir el volumen de la disolución. El calentamiento se suspendió cuando se observó la presencia de cristales en la superficie del líquido.

La disolución anterior (disolución concentrada) se dejó reposar durante 24 hrs. a una temperatura de 0 a 5°, obteniéndose un sólido el cual fue separado por filtración simple. Al sólido obtenido se le determinó el p.f. y se envió una muestra para obtener el espectro de IR (ver anexos). Los resultados mostraron un espectro con algunas bandas descritas para la glucosamina y otra más que no corresponden.

Con los resultados anteriores se desprende que el IR no es el mejor método analítico para nuestro experimento, ya que al secar la muestra se recupera una mezcla cuyos componentes se encuentran en la disolución. En los métodos utilizados tradicionalmente hasta ahora para la identificación del compuesto, ha sido necesario contar con el analito en forma pura; siendo esto laborioso y tardado por ello se buscó un método analítico que permitiera identificar y cuantificar en solución, el analito de interés.

Revisando varias opciones se seleccionó el método FIA para cuantificar la glucosamina, ya que no requiere tener el compuesto en estado sólido y se puede identificar y cuantificar directamente de la disolución.

Por las consideraciones antes mencionadas y debido a que se cuenta con el equipo de FIA, se llevo a cabo la identificación y cuantificación de la glucosamina obtenida se prepararon las muestras para análisis por FIA de acuerdo al procedimiento ya descrito.

Durante el proceso de hidrólisis, el polímero más abundante en los residuos empleados, que es la quitina, se separa para dar el monómero, la N-acetilglucosamina o el producto de hidrólisis que es la glucosamina (quitosano). Por ser este amino azúcar de naturaleza básica y por trabajar en medio ácido la glucosamina se obtendrá en forma de clorhidrato o sulfato. (45)

Diagrama de Obtención de los productos de hidrólisis de los residuos pesqueros



A los sólidos obtenidos por hidrólisis se les efectuó un espectro de infrarrojo, que se muestra a en el anexo.

6.2 EQUIPO DE FIA:

DETECTOR: UV-visible.

Ocean Optics Inc.

Firstin Photonics.

USB 4000

SISTEMA DE PROPULSIÓN: Bomba peristáltica.

Ismatec.

ISM834C

App Nr ISO 44-00028

De ocho rodillos y 4 sujetadores.

6.3 REACTIVOS:

Las especificaciones de los reactivos que fueron utilizados para este trabajo:

Estándar secundario de sulfato de glucosamina solución inyectable de 400 mg, caja con 6 ampollas, laboratorio Asofarma, marca comercial Vartalon, lote: 16453.

Ácido clorhídrico PM 36.46, Ensayo 36.5% min. Identificación de la ignición 0.008%, yoduro y bromuro cumple, Bromo y cloro libre cumple, Lote: 11882-C.

Ácido sulfúrico Lote: x02c08.

Agua destilada.

Agua desionizada.

6.4 DISOLUCIONES:

Preparación de las soluciones utilizadas en el procedimiento:

Ácido clorhídrico al 5 %(v/v): se tomaron 5mL del ácido clorhídrico concentrado y se agregó poco a poco a vaso de precipitado el cual contenía 95 mL de agua destilada, todo esto se hizo condiciones de seguridad.

Ácido clorhídrico al 50 %(v/v): se tomo 10 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agregó poco a poco a vaso de precipitado de 150 mL el cual contenía 10 mL de agua destilada, todo esto se hizo bajo condiciones de seguridad.

6.5 CUANTIFICACIÓN

6.5.1 DISOLUCIÓN MADRE DE GLUCOSAMINA (ESTÁNDAR SECUNDARIO)

Para preparar una solución madre de glucosamina con una concentración de 32mg/mL a un volumen de 50mL, se tomaron cuatro ampollitas que contenían 400mg/mL de sulfato de glucosamina cada uno, se tomo con precisión un volumen de 2mL de sulfato de glucosamina que contenía cada ampollita dándonos una concentración de 1600mg/mL, esto se llevo a un matraz volumétrico y se aforo con agua destilada a 50 mL obteniendo así una concentración final de 32 mg/mL.

Posteriormente se elaboró la curva de calibración son las siguientes concentraciones:

Volumen inicial:

$$1\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 50\text{mL} = 0.64 \text{ mg/mL}$$

$$1\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 25\text{mL} = 1.28 \text{ mg/mL}$$

$$1\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 10\text{mL} = 3.2 \text{ mg/mL}$$

$$1\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 5\text{mL} = 6.4 \text{ mg/mL}$$

$$3\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 10\text{mL} = 9.6 \text{ mg/mL}$$

$$2\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 5\text{mL} = 12.8 \text{ mg/mL}$$

$$5\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 10\text{mL} = 16.0 \text{ mg/mL}$$

$$3\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 5\text{mL} = 19.2 \text{ mg/mL}$$

$$7\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 10\text{mL} = 22.4 \text{ mg/mL}$$

$$4\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 5\text{mL} = 25.6 \text{ mg/mL}$$

Solución stock:

$$5\text{mL} * (32\text{mg/mL}) / 5\text{mL} = 32 \text{ mg/mL}$$

Se tomaron tres ampollas de sulfato de glucosamina y se aforo con agua destilada a 50 mL, obteniendo así una concentración de 24 mg/mL. Esto se hizo para nuestro punto fuera de la curva se hizo con la siguiente concentración:

Volumen inicial:

$$16\text{mL} * (24\text{mg/mL}) / 25\text{mL} = 15.36 \text{ mg/mL}$$

La solución anterior se inyectó siete veces para verificar la repetibilidad del método.

6.5.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Para las muestras obtenidas por la hidrólisis con ácido sulfúrico se tomó 1 mL y se agregó a un matraz volumétrico de 25 mL, se aforo con agua destilada.

Para la muestra obtenida por la hidrólisis con ácido clorhídrico se preparó de la siguiente manera se tomó 1 mL de la muestra y se agregó a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforo con agua destilada.

Para ambas muestras se obtuvieron las señales de glucosamina para estas disoluciones, dándonos estas señales dentro de la curva de calibración.

Para el blanco de reactivos se tomó 1 mL y se agregó a un matraz volumétrico de 25 mL, se aforo con agua destilada.

6.6 CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS

Caudal.....2.85 mL/min.

Volumen de inyección.....200 μ L.

Longitud del reactor.....100 cm.

Portador.....Agua

pH.....Agua (5.5-6.5)

Longitud de onda.....270 nm.

6.7 CONFIGURACIÓN

La determinación de las condiciones óptimas de trabajo para la identificación y cuantificación de glucosamina obtenida de los residuos pesqueros, utilizando el método de FIA (Análisis por Inyección en Flujo) es una herramienta que permitió no solo identificarla si no que además se determino su λ máx de absorbancia. Se realizo la cuantificación del contenido de glucosamina obtenida en nuestros experimentos. (46)

Para encontrar la condiciones de trabajo en el sistema FIA fue necesario fijar los parámetros físicos e hidrodinámicos del sistema FIA, estos parámetros son:

Longitud de onda

Caudal mL/min.

Volumen de Inyección en μ L.

Longitud del Reactor en cm.

6.8 PARÁMETROS FÍSICOS E HIDRODINÁMICOS

Para fijar los diferentes parámetros hidrodinámicos fue necesario fijar algunos parámetros mientras se estudiaban las condiciones óptimas para estudiar las variables; por ejemplo para optimizar el caudal se usó un reactor de 100 cm, y un volumen de inyección no mayor a 500 μL ; con ello se va discerniendo uno a uno los diferentes parámetros hidrodinámicos a optimizar. Estos datos de optimización se basaron en los diferentes artículos de FIA, los cuales sugieren algunas condiciones hidrodinámicas para algunos análisis que ya han sido realizados por este método. (46)

Longitud de onda: Para realizar la identificación de la glucosamina a través del sistema FIA, fue necesario realizar un barrido de nuestro estándar secundario, para con ello observar las bandas características de este estándar. (46)

ESTANDAR SECUNDARIO DE GLUCOSAMINA

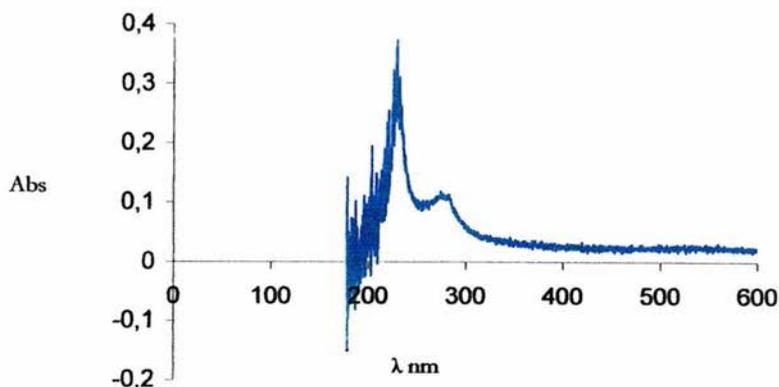


Figura 18. Barrido del estándar de glucosamina (Vartalon)

En la figura 18 se muestra el barrido del estándar utilizado para la elaboración de las curvas de calibración de glucosamina; en esta figura se puede observar la λ máx. de absorción característica de la glucosamina (esta banda corresponde a la glucosamina

tanto como sulfato o clorhidrato), la cual absorbe a una longitud de onda de 270- 274 nm.

Caudal en mL/min.: Para fijar el caudal deseado para la determinación de glucosamina, se busco la información en los textos de FIA, los cuales sugieren que este caudal se encuentre en 2.85 mL / min esto se traduce en una velocidad en la bomba peristáltica de 20 rpm.; este caudal se encontró como óptimo, ya que al realizar las primeras curvas de calibración, se obtuvieron buenos resultados. Se eligió este caudal debido a que la señal obtenida (pico) resulta más alta y el análisis más rápido, ya que a caudales más bajos la señal es menor y el tiempo de análisis más largo; mientras que a caudales más altos la señal es un poco menor y hay mayor gasto de reactivo. (46)

Volumen de Inyección en μL .

Al igual que el caudal, el volumen de inyección fue fijado por medio de los resultados que se citan en los textos de FIA, este volumen de inyección fue de 200 μL .

Longitud del Reactor.

La longitud del reactor se fijo, basándose en la longitud de los reactores que fueron utilizados en diferentes artículos experimentales recomendadas para FIA, de acuerdo a estas referencias se probaron 3 reactores diferentes: 50, 100 y 130 cm, dando el reactor de 100 cm el que mostró mejores señales (picos).

6.9 ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA GLUCOSAMINA

La capacidad de las técnicas de análisis instrumental para manejar un intervalo amplio de concentraciones de analito, significa que se calculan los resultados, y se evalúan los errores aleatorios de una manera concreta, que difiere de la utilizada cuando se repite una sola medición varias veces. El procedimiento habitual es el siguiente: El analista toma una serie de muestras (normalmente de cuatro a cinco, y posiblemente algunas más) en las que se conoce la concentración del analito. Estas calibraciones estándar se miden en el instrumento analítico en las mismas condiciones que las usadas para las muestras problema (es decir, las desconocidas).

Una vez que se ha establecido la gráfica de calibración, se puede obtener la concentración del analito en cualquier muestra problema por interpolación, como se indica en la figura 19. (46)

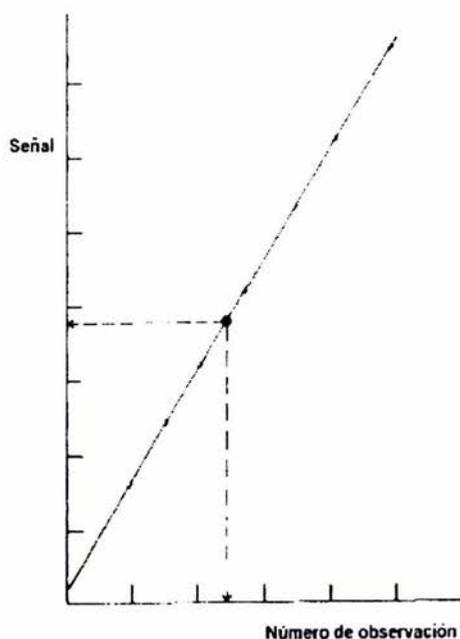


Figura 19. Procedimiento de calibración en análisis instrumental: puntos de calibración (○) y Muestras (*).

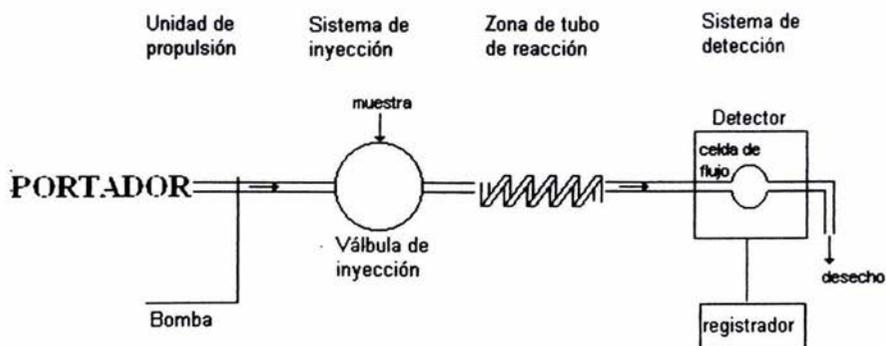


Figura 20. Configuración FIA utilizada para determinar glucosamina.

6.10 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

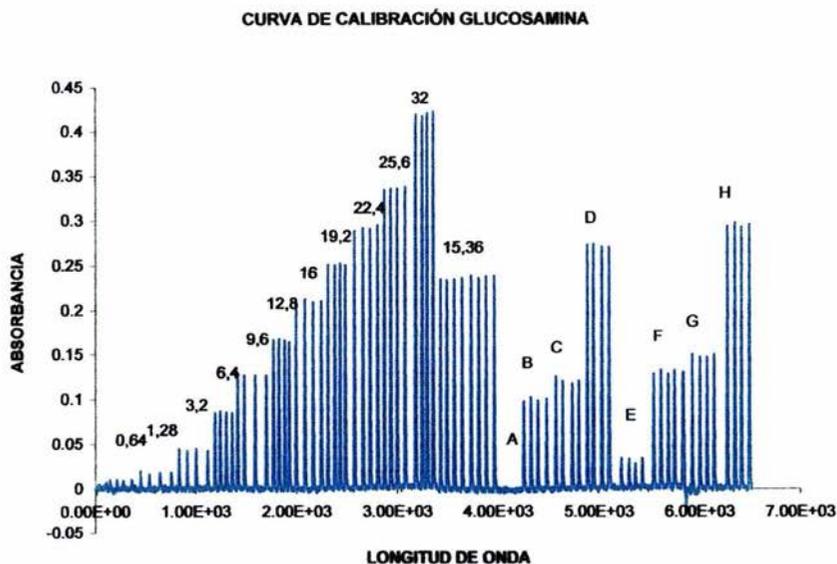
La precisión es el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad. La precisión puede calcularse tanto para el sistema como para el método. La precisión del método puede expresarse como la reproducibilidad y la repetibilidad. La repetibilidad es la concordancia entre determinaciones independientes de soluciones con una concentración cercana al 100% proveniente de una disolución madre. Los ensayos son realizados por un mismo analista y en las mismas condiciones de operación. La diferencia con la reproducibilidad es que los análisis los pueden realizar diferentes analistas en diferentes equipos y/o en diferentes laboratorios.

La repetibilidad es afectada por errores aleatorios, éstos provocan que los resultados individuales caigan a ambos lados del valor medio. Los errores aleatorios no se detectan fácilmente con sólo observar los resultados, sino que tiene orígenes muy distintos en cuanto a la técnica experimental y al equipo que se utiliza.

Para medir la repetibilidad del método en este trabajo, se determino la curva de calibración para glucosamina. Cada uno de los puntos de la curva se determino por cuatriplicado. Al final de la curva de calibración se hizo por septuplicada inyectando una disolución que contenía 15.36 mg/mL de glucosamina con estos valores se calculó la media y la desviación estándar. La precisión del método se representó como la desviación estándar relativa (D.E.R.). (46)

CAPITULO 5

7. RESULTADOS



Figurama 1. Representación gráfica de la curva de calibración de glucosamina, cuyas concentraciones van desde 0.64 mg/mL hasta 32 mg/mL, al igual que la repetibilidad del método a una de concentración 15.36 mg/mL, posteriormente se inyectaron las muestras A) Blanco, B) Sulfato de glucosamina (obtenida en mes de octubre), C) Sulfato de glucosamina (obtenida en mes de noviembre), D) Clorhidrato de glucosamina (obtenida en mes de noviembre), E) Blanco fortificado, F) Sulfato de glucosamina fortificado (obtenida en mes de octubre), G) Sulfato de glucosamina fortificado (obtenida en mes de noviembre), H) Clorhidrato de glucosamina fortificado (obtenida en mes de noviembre).

7.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras analizadas Promedio de las absorbancias					
	Abs	mg/mL (*)	X FD 1:25	mg/g	%
A)	0,000	< L.D.	0		
B)	0,099	7,465	186,62mg	376,04 mg/ g	37,6
C)	0,121	9,102	227,55mg	478,08mg/g	47,8
D)	0,271	20,712	207,12mg	426,97mg/g	42,6
Muestras fortificadas					
E)	0,043	3,133			
F)	0,129	9,776			
G)	0,147	11,104			
H)	0,293	22,406			

Tabla 1. Las muestras se inyectaron en el siguiente orden A) Blanco, B) Sulfato de glucosamina (octubre), C) Sulfato de glucosamina (noviembre), D) Clorhidrato de glucosamina (noviembre), E) Blanco fortificado, F) Sulfato de glucosamina (octubre) fortificado, G) Sulfato de glucosamina (noviembre) fortificado, H) Clorhidrato de glucosamina (noviembre) fortificado.

7.2 CONCENTRACIÓN DE GLUCOSAMINA

Antes de registrar las muestras en el sistema FIA propuesto se inyectaron los blancos de reactivos, los cuales consistieron en un blanco de reactivo con el mismo tratamiento de las muestras y un blanco fortificado con una concentración conocida de glucosamina la cual es igual que en las muestras fortificadas con el mismo tratamiento que las muestras. Las muestras analizadas fueron de dos tipos, esto es se tomaron dos replicas de la misma muestra, una de estas replicas se fortificó con una concentración conocida de glucosamina y la otra sin fortificar, con ello se evaluaron algunos parámetros como son el % de recuperación en las muestras fortificadas, la cuantificación de las impurezas contenidas en las muestras sin fortificar y el comportamiento o la influencia del tratamiento de las muestras en la cuantificación de las impurezas de glucosamina.

(*) Esta concentración se obtuvo por medio de la ecuación de la recta, obteniéndose así la concentración reportada.

Los resultados obtenidos de mg, mg/g y % de glucosamina se realizó a partir de la concentración de cada muestra. Ejemplo del cálculo:

Sulfato de glucosamina (octubre)

7,465mg/mL de glucosamina (25mL dilución)= 186,62 mg de glucosamina

186, 62 mg de glucosamina (2015,0 mg cáscara/1000mg)= 376,04 de glucosamina

1000mg de glucosamina ----- 100%

376,04 mg de glucosamina----- X

X= 37,6 %

CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSAMINA	
Concentración	Abs
0,64	0,011
1,28	0,019
3,2	0,042
6,4	0,084
9,6	0,128
12,8	0,167
16	0,21
19,2	0,254
22,4	0,29
25,6	0,333
32	0,41925

Tabla 2. Absorbancia & Concentración en mg/mL para cada punto de la curva de calibración de glucosamina.

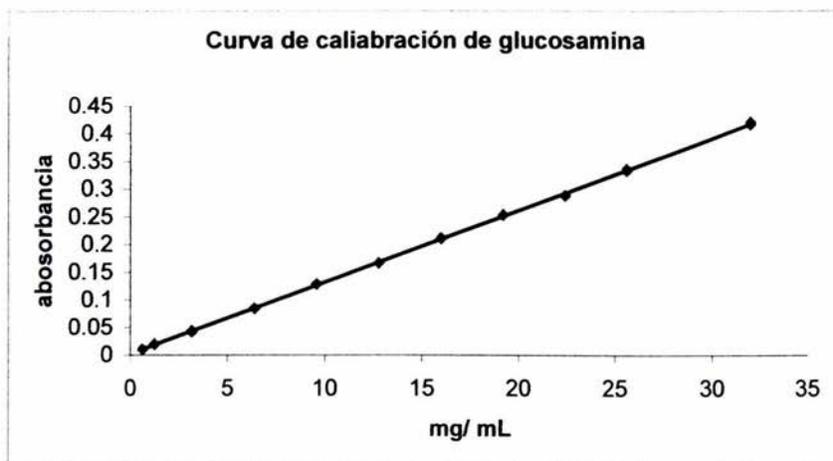


Figura 22. Curva de calibración de la glucosamina.

DER	0,99987035	
Ordenada	0,00231691	$Y = 0,0129846 X + 0,00231691$
Pendiente	0,0129846	

En esta tabla se muestran los resultados de la desviación estándar relativa (DER) la cual es calculada a partir de la siguiente formula:

$$DER = (S/X) \times 100$$

Donde:

S= desviación estándar de la muestra

X= promedio de la muestra

7.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN

En este punto se muestran los resultados obtenidos al realizar la curva de calibración descrita en la sección anterior. La grafica obtenida es lineal, teniendo en cuenta cada uno de los puntos que integran la curva de calibración tenemos una línea recta que pasa por estos puntos, dando como resultado pendientes muy cercanas a uno y ecuaciones de la recta que satisfacen la obtención de las concentraciones del analito de interés en las muestras problema.

Curva de calibración de glucosamina.

Ecuación de la recta: $Y = 0,0129846 X + 0,00231691$

R= 0,9998 (coeficiente de correlación)

Intervalo lineal 0.64 – 32 mg/mL

7.4 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Desviación Estándar Relativa (D.E.R.)

Como ya se ha mencionado anteriormente, para conocer la repetibilidad del método expresada como D.E.R., se determinó la curva de calibración en las condiciones óptimas y después se inyectó 7 veces una disolución de 15.36 mg/mL del analito de glucosamina. Una vez que se obtuvieron los resultados del diagrama 1, se calculó la D.E.R. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada analito.

REPETIBILIDAD		15.36 mg/mL
Abs	Concentración	PROMEDIO
0,228	17,3808233	17,0727661
0,224	17,0727661	0,18255876
0,228	17,3808233	RSD
0,229	17,4578376	1,06929807
0,229	17,4578376	
0,231	17,6118661	
0,231	17,6118661	

Los resultados anteriores muestran la concentración con un valor de 17 mg/mL, indica una diferencia con la concentración esperada que debía ser de 15.36 mg/mL. La diferencia puede ser debida a que no se empleó un estándar certificado, cada

señal es un estándar secundario, si se hubiera empleado un estándar certificado darían valores más cercanos a la concentración a la cual partimos

Los resultados indican que la repetibilidad del método de las D.E.R. es muy buena, ya que se obtuvieron desviaciones menores al 2 %, esto se traduce en una concordancia muy cercana al 100%, (los resultados tienen una concordancia entre el 98.3% y el 99.8%), el rango de concordancia para preciarse como bueno tiene que estar entre el 95 y 105 %.

7.5 LIMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los valores reportados en esta parte del trabajo, están basados en las definiciones mencionadas anteriormente, las tablas muestran el tratamiento de los datos obtenidos y los cálculos necesarios para la determinación del Límite de Detección (L.D.) y del Límite de Cuantificación (L.C.); se muestran enseguida los resultados.

DATOS PARA LOS CÁLCULOS DE LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PARA GLUCOSAMINA										
xi	xi ²	yi	ŷi	[yi - ŷi]	(yi - ŷi) ²	xi - x	(xi - x) ²	No. de puntos	11	
								n-2	9	
32	1024	0,41925	0,41782	0,00143	2E-06	18,44364	340,168	Pendiente	0,0129846	RL 0,99989851
25,6	655,36	0,335	0,33472	0,00028	7,7E-08	12,04364	145,049	Ordenada	0,00231691	
22,4	501,76	0,289	0,29317	0,00417	1,7E-05	8,843636	78,2099			
19,2	368,64	0,25425	0,25162	0,00263	6,9E-06	5,643636	31,8506	t 95%(n-2)	2,36	
16	256	0,2105	0,21007	0,00043	1,8E-07	2,443636	5,97136			
12,8	163,84	0,16625	0,16852	0,00227	5,2E-06	-0,75636	0,57209			
9,6	92,16	0,1285	0,12697	0,00153	2,3E-06	-3,95636	15,6528			
6,4	40,96	0,085	0,08542	0,00042	1,8E-07	-7,15636	51,2135			
3,2	10,24	0,042	0,04387	0,00187	3,5E-06	-10,3564	107,254			
1,28	1,6384	0,0195	0,01894	0,00056	3,2E-07	-12,2764	150,709			
0,64	0,4096	0,01075	0,01063	0,00012	1,5E-08	-12,9164	166,832			
13,55636	36									
	3115,01				3,8E-05		1093,48			

Sy/x =	0,00206									
Sm =	6,2E-05						0,00015			
Sb =	0,00105						0,00257			
r =	0,99990									
LD(mg/L)	0,47538									
LC(mg/L)	1,58459									
Ecuación										
Y=	0,012985		±	0,000147	+	0,002317	±	0,002471		

En esta tabla se muestran los resultados donde Y es el limite de detección dado por $0,002317 + 3 (0,00206)$ es decir $0,008497$ donde $X = (0,008497 - 0,002317)/0,012985 = 0,4729$ mg/mL

El valor de Y es el limite de cuantificación dado por $0,002317 + 10 (0,00206)$ es decir $0,022917$ donde $X = (0,022917 - 0,002317)/0,012985 = 1,5864$ mg/mL

LIMITES DE DETECCIÓN mg/mL	LIMITES DE CUANTIFICACIÓN mg/mL
Glucosamina	
0,47538	1,58459

Considerando los datos obtenidos para los límites de detección, podemos ver que estos valores, para las pruebas, realizadas son muy adecuados, ya que caen por debajo de la concentración del primer punto de la curva de calibración (0.64 mg/mL), para la prueba.

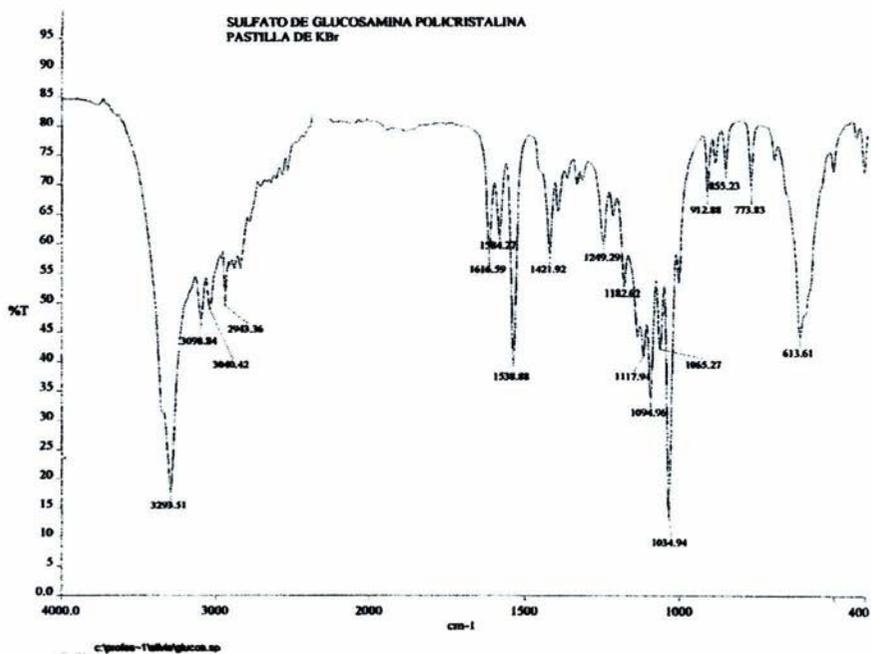
Podemos decir que el sistema es sensible, por lo tanto permite detectar concentración por debajo del primer punto de la curva.

Con los datos obtenidos para los límites de cuantificación, se observa que estos valores caen entre el primer punto y el segundo de la curva de calibración (0,64 a 1.28 mg/mL), esto indica, que a partir de estos valores nuestros resultados son muy aceptables, ya que son cercanos a las concentraciones más bajas de la curva de calibración, lo cual permite asegurar que estamos logrando cuantificar concentraciones muy bajas de analito de forma precisa.

8. CONCLUSIONES

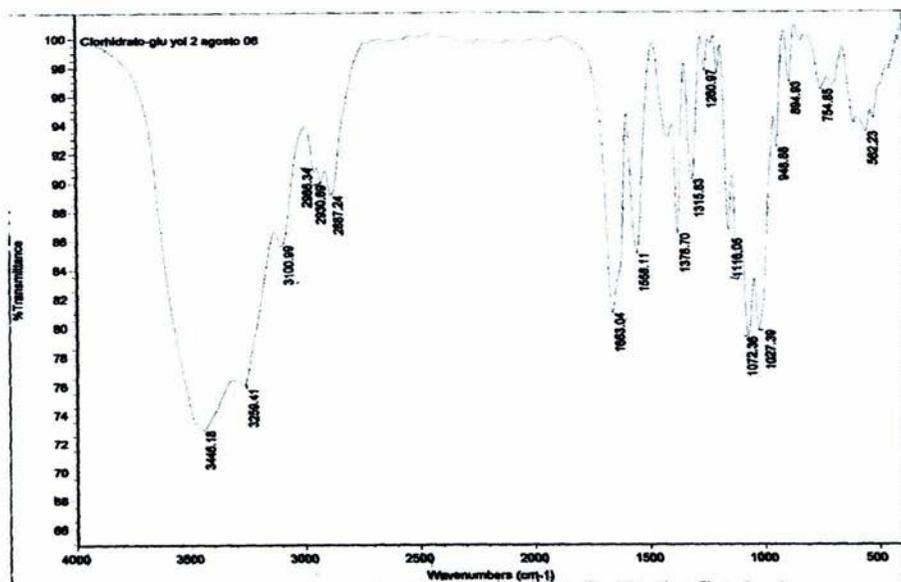
- Se presentan las condiciones óptimas encontradas en este trabajo para obtener glucosamina por hidrólisis ácida de residuos pesqueros de camarón.
- Las condiciones de hidrólisis y el método de análisis presentados hacen posible un mejor aprovechamiento de los residuos pesqueros abundantes en nuestro país.
- El valor agregado que se dé a estos residuos evitara su manejo como basura, traerá beneficios económicos a los recolectores.
- Se desarrollo un método para la detección y cuantificación de la glucosamina empleando la técnica de Análisis por Inyección en Flujo.
- La aplicación de la técnica “Análisis por Inyección en Flujo” como método de análisis, permitió el control de la reacción y la obtención de un producto de alta calidad necesario para la industria alimentaria y farmacéutica.

ANEXOS

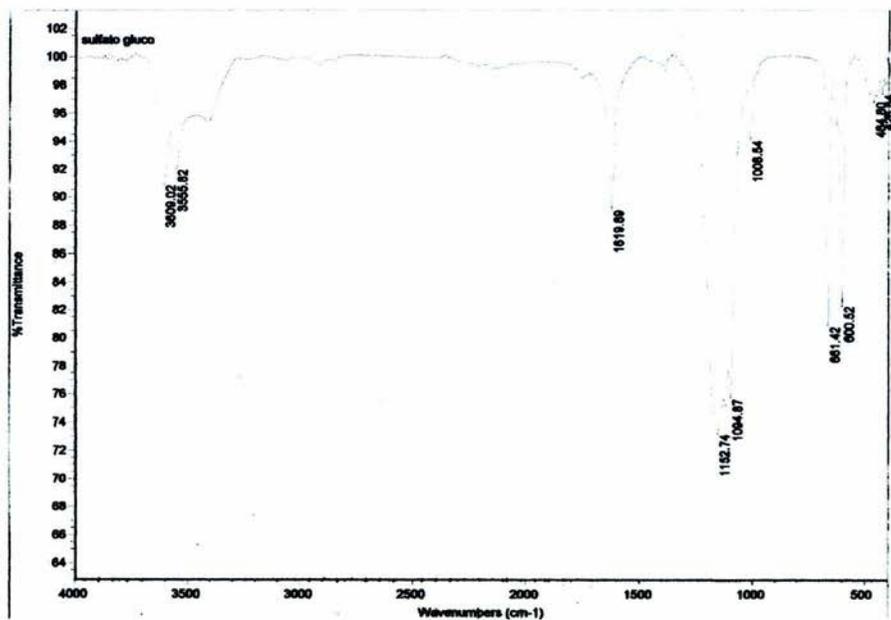


Espectro de IR estándar secundario de sulfato de glucosamina.

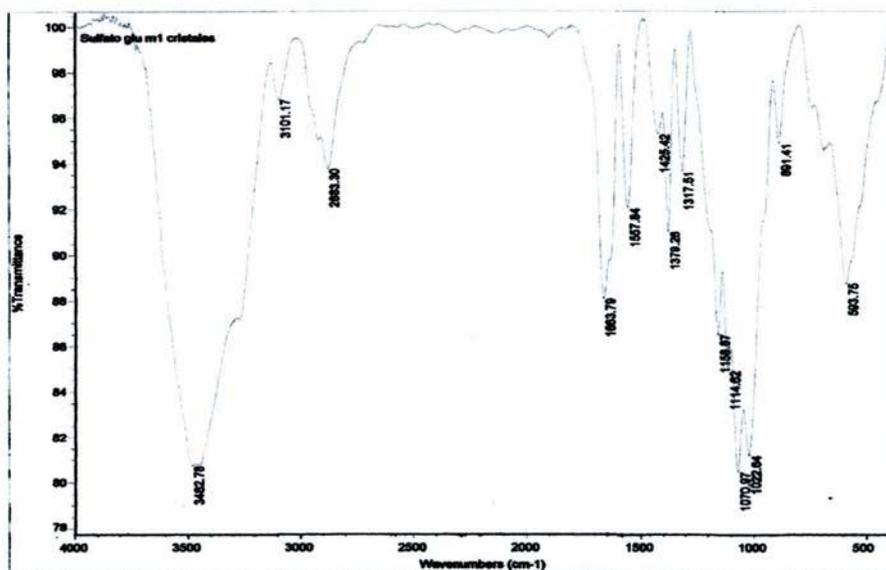
Espectro de IR de clorhidrato de glucosamina (muestra obtenida en noviembre).



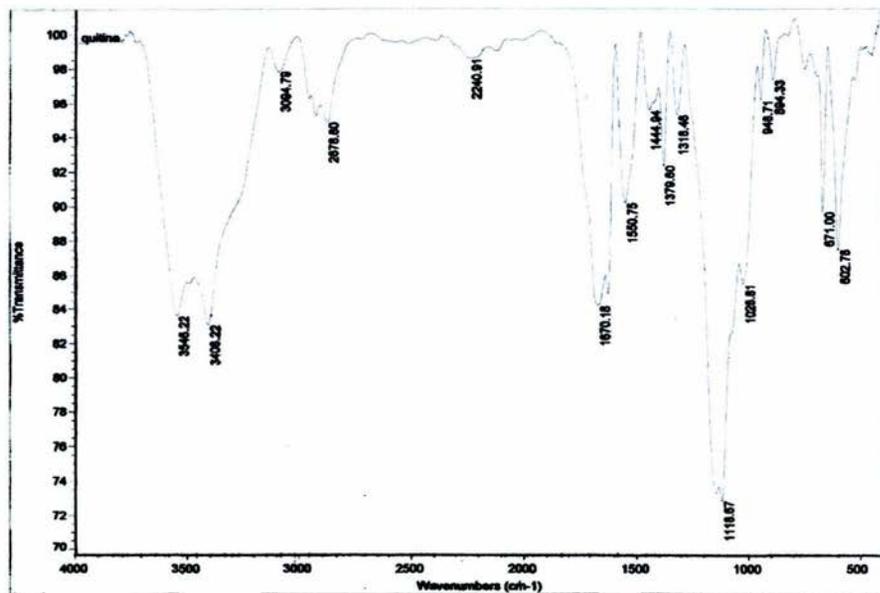
Espectro de IR de sulfato de glucosamina (muestra obtenida en octubre).



Espectro de IR de sulfato de glucosamina (muestra obtenida en noviembre)



Cáscara de quitina residuo en el precipitado resultado de la hidrólisis.



BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Kirk, Raymond E: "Enciclopedia de Tecnología Química" Volumen 13 1ra Edición en Español. Editorial Hispano-Americana. México 1961. Pags. 423-428
- 2 <http://www.soyentrepreneur.com/pagina.hts?N=13297&Ad=S>
- 3) Anuario estadístico de pesca 2003, SAGARPA (secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.), Comisión nacional de acuicultura y pesca.
- 4) Meyers S. P. (1977) Using crustacean meals and carotenoids fortified diets
Feedsffs, 49: 19-23
- 5) Simpson B. K. y Haard N. F. (1985) The use of proteolytic enzyme to extract carotenoproteins from shrimp wastes J. Appl. Biochem., 7: 212-222
- 6) Ong A.S.H. y E. S. Tee. (1992). Natural Sources of carotenoids from plants and oils.
Meth. Enzymol., 213: 142-167
- 7) Borowitzka M. Huisman J. Y Osborn A. (1991) Culture of the astaxanthine producing green algae *Haematococcus pluvialis*. Effects of the nutrients on growth and cell type. J. Appl. Phycol., 3: 295-304
- 8) Boussiba S. y Vonshak A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* Plant. Cell. Physiol., 32: 1077-1082
- 9) Bendich A y Olson J. A., (1989). Biological actions of carotenoids FASEB J. 3 (1): 1927-1932
- 10) Goodwin T. W. (1986) Metabolism, nutrition and function of carotenoids
Annual Review of Nutrition, 6: 273-297
- 11) Czczuga B. (1974). Comparative studies of carotenoids of the fauna of the Gullmar Fjord (Bohuslan, Sweden). II Crustacea: *Eupagurus berhardus*, *Hyas coarctatus* y *Upogebia deltaura*. Mar. Biol., 28: 95-98

- 12) Foss P, Storebakken T, Schiedt K, Liaaen-Jensen S, Austreng E, y Streiff K. (1984). Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin on comparison with cantaxanthin. *Aquaculture*, 41: 213-226
- 13) Gillou A., Khalil M. y M. Adambounou L. (1994). Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acids profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*, 130: 350-361
- 14) Karrer P. y Jucker E. (1950). Carotenoids Elsevier Publishing Company Inc. N.Y. 348 pp.
- 15) Karrer y Jucker, 1950; Jonson E. A. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4): 297-326
- 16) Borowitzka M. A. (1988) Vitamins and fine chemicals from microalgae. In: M. A. Borowitzka and J. Borowitzka (Eds). *Microalgae Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge Pp.153-156
- 17) Boussiba S., Fan L. y Vonshak A. (1992). Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Meth. Enzymol.* 213: 386-391.
- 18) Quinio (N. 81993). Etude técnico-économique d'un pigment caroténoïde: l'astaxanthine. *Chimie Fine et Environnement*. 85 pp.
- 19) Aplicaciones del quitosano en alimentación. Diciembre 2006 - alimentatec © 2007 alimentatec.com; Portal de Tecnologías y Mercados del Sector Alimentario; Txatxarramendi Ugarte a/z/g, 48395 Sukarrieta (Bizkaia) · Tel +34 94 602 94 00. Fax: +34 94 687 00 06
<http://www.alimentatec.com/muestrapaginas.asp?nodo1=0&nodo2=0&idcontenido=565&content=18>
- 20) AZTI-Tecnalia, Centro Tecnológico experto en Investigación Marina y Alimentaria. IRENE PERAL, IRENE GARTZIA. AZTI, Elementos valiosos en los residuos de industrias transformadoras de productos de la pesca: Quitina-Quitosano y sus aplicaciones

<http://www.azti.es/verpagina.asp?nodo1=32&nodo2=0&content=89&pagina=119&lista=si>)

21) <http://www.bioiberica.com/bioibericafarma/noticias.asp?id=7>

22) <http://www.naturalmar.com/glucosamina.html>

23) <http://www.laboratoriosamerica.com.co/web/congreso2001/Html/ManejoMedicoDeOsteoartritis.htm>

24) Braham R, Dawson B, Goodman C. The effect of glucosamine supplementation on people experiencing regular knee pain. *Br J Sports Med.* 2003 Feb;37(1):45-9; discussion 49

25) Bruyere O, Honore A, Ethgen O, Rovati LC, Giacovelli G, Henrotin YE, Seidel L, Reginster JY. Correlation between radiographic severity of knee osteoarthritis and future disease progression. Results from a 3-year prospective, placebo-controlled study evaluating the effect of glucosamine sulfate. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003 Jan;11(1):1-5

26) Mathieu P. [Radiological progression of internal femoro-tibial osteoarthritis in gonarthrosis. Chondro-protective effect of chondroitin sulfates ACS4-ACS6] *Presse Med.* 2002 Sep 14;31(29):1386-90. French

27) Noack W, Fischer M, Forster KK, Rovati LC, Setnikar I. Glucosamine sulfate in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 1994 Mar;2(1):51-9

28) Rubin BR, Talent JM, Kongtawelert P, Pertusi RM, Forman MD, Gracy RW. Oral polymeric N-acetyl-D-glucosamine and osteoarthritis. *J Am Osteopath Assoc.* 2001 Jun;101(6):339-44

29) Thie NM, Prasad NG, Major PW. Evaluation of glucosamine sulfate compared to ibuprofen for the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis: a randomized double blind controlled 3 month clinical trial. *J Rheumatol.* 2001 Jun;28(6):1347-55

30) Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, Lejeune E, Bruyere O,

Giacovelli G, Henrotin Y, Dacre JE, Gossett C. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*. 2001 Jan 27;357(9252):251-6

31) Mazieres B, Combe B, Phan Van A, Tondut J, Grynfeldt M. Chondroitin sulfate in osteoarthritis of the knee: a prospective, double blind, placebo controlled multicenter clinical study. *J Rheumatol*. 2001 Jan;28(1):173-81

32)Bautch JC, Clayton MK, Chu Q, Johnson KA. Synovial fluid chondroitin sulphate epitopes 3B3 and 7D4, and glycosaminoglycan in human knee osteoarthritis after exercise. *Ann Rheum Dis*. 2000 Nov;59(11):887-91

33) <http://www.bioiberica.com/veterinary/cosequinpowdermonograph.htm>

34) <http://www.arthritis.org/espanol/enfermedades/alternativas/glucosamina.asp>

35) El cartilago articular(1) Dr F. San Román* (1)2000 Iams Nutrition Symposium, Chicago *MD, DVM., DDS., PhD, dipl. EVDC. Catedrático de Cirugía del Dpto. de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria Director del Hospital Clínico Veterinario. Universidad Complutense de Madrid.
http://www.colvet.es/infovet/ene01/ciencias_v/articulo1.htm

36) <http://www.health-pages.com/pain/gs-esp.html>

37) Ruzicka J.; Hansen, E.H. *Anal. Chim. Acta* 1975, 78, 145-157.

38) Para monografías sobre métodos automáticos, véase J. K. Foreman y P. B. Stockwell, *Automatic Chemical Analysis*. New York: Wiley, 1975; M. Valcárcel y M. D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis*. New York: Elsevier, 1988; V. Cerda y G. Ramis, *An Introduction to Laboratory Automation*. New York: Wiley, 1990

39) Para las monografías sobre análisis por inyección en flujo, véase J. Ruzicka y E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2.ª ed. New York: Wiley, 1988; M. Valcárcel y M. D. Luque de Castro, *Flow Injection Analysis. Principles and Applications*. Chichester, England: Ellis Horwood, 1987; B. Karlberg y G. E. Pacey, *Flow Injection Analysis. A Practical Guide*. New York: Elsevier, 1989

- 40) Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica Journal of Mexican Chemical Society, abril-junio, año/vol 46, numero 002 Sociedad Quimica de México pp.167-174. Ma.. Del Pilar Cañizares Macías 2002
- 41) J. Ruzicka & E. H. Hansen, Analytica Chimica Acta, 78 (1975) 145 – 157.
- 42) J. Ruzicka & E. H. Hansen, Analytical Chemistry, March 1 (2000) 212^a – 217 A
- 43) Kate Grudpan, Colin Taylor, Ans Sitter & Cornelius Keller; Fresenius J. Anal. Chem. 1993; 346: 882-884.
- 44) K. K. Stewart, G. R. Beecher y P. E. Hare, Anal. Biochem., 1976, 70, 167;
J. Ruzicka y E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta, 1975, 78, 145
- 45) L. Hackman Aust. J. Biol. Sci.7; 168 (1954). Quimica Organica Experimental, Dr. Xorje Alejandro Dominguez S., Director del Depto. de Quimica, I.T.E.S.M. Monterrey N.L., Editorial Limusa, Mexico 1982.
- 46) Desarrollo De Un Método Automatizado para la Determinación de Metales Pesados con Ditzona Micelar por Análisis Por Inyección En Flujo. Tesis presenta José Manuel Orozco Gómez Año 2007