



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Validación para la cuantificación de ácido carmínico en cochinilla de  
nopal (*Dactylopius coccus* Costa) por Cromatografía de Líquidos de  
Alta Resolución

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

Beaz Rivera Jesús Antonio



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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. Francisca Aída Iturbe Chiñas

**Vocal** Prof. Carreño Ortiz Hugo Rubén

**Secretario** Prof. Agustín Reyo Herrera

**1er Suplente** Prof. Hidalgo Torres Miguel Ángel

**2do Suplente** Prof. Sánchez del Ángel Luz Sandra

**SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA**

Departamento de Alimentos y Biotecnología,

Laboratorio 4-A UNAM, Facultad de Química,

**ASESOR DEL TEMA**

\_\_\_\_\_

QFB Agustín Reyo Herrera

**SUSTENTANTE**

\_\_\_\_\_

Beaz Rivera Jesús Antonio

*Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.*

**Albert Einstein** (1879-1955) Científico estadounidense de origen alemán.

*Un error no se convierte en verdad por el hecho de que todo el mundo crea en él.*

**Mahatma Gandhi** (1869-1948) Político y pensador indio.

*Los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran, sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez.*

**Gabriel García Márquez** (1927-?). Escritor colombiano

*Vivir no es sólo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar. Descansar, es empezar a morir.*

**Gregorio Marañón** (1887-1960) Médico y escritor español.



## Agradecimientos

A mis padres Jesús Beaz Palacios y Leticia Rivera Rivera por toda la paciencia y el tiempo que me dedican, el amor que me brindan, los consejos que me han dado y el coraje que han demostrado en tiempos adversos para que lograra realizar a esta etapa tan importante en mi vida.

A Lena por haberme acompañado de la mano durante toda la carrera, por la paciencia y comprensión que me ha dedicado en todo este tiempo.

A mis amigos que me enseñaron que la vida se disfruta más cuando dejamos por siempre un grato recuerdo en la memoria de las personas.

A la M. en C. Lucia Cornejo, y a mi asesor QFB Agustín Reyo Herrera por compartir conmigo sus conocimientos, su confianza y amistad.

A la señora Leticia (Laboratorista de 4A) por brindarme su amistad y confianza.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir ser parte de ellas y proporcionarme los medios para lograr esta meta.

## INDICE

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Introducción .....  | 1  |
| 2     | Objetivos .....   | 3  |
| 2.1   | General .....   | 3  |
| 2.2   | Particular .....  | 3  |
| 3     | Antecedentes .....  | 4  |
| 3.1   | Cochinilla de nopal, principales países productores .....               | 4  |
|       | Costos de explotación .....   | 6  |
|       | Ciclo de vida y morfología de <i>Dacyilopius coccus</i> Costa .....     | 7  |
|       | Desarrollo histórico de la grana cochinilla en México .....             | 9  |
|       | Química del ácido carmínico .....                                       | 12 |
| 3.2   | Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (CLAR) .....               | 12 |
| 3.2.1 | Principios en los que se basa la cromatografía y su clasificación ..... | 12 |
| 3.2.2 | Cromatografía de fase químicamente unida .....                          | 16 |
| 3.2.3 | Cromatografía en fase normal .....                                      | 16 |
| 3.2.4 | Cromatografía en fase reversa .....                                     | 18 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2.4 | Parámetros cromatográficos .....   | 19 |
|       | Eficiencia.....  | 20 |
|       | Selectividad.....  | 22 |
|       | Factor de capacidad.....   | 23 |
|       | Resolución .....   | 23 |
|       | Simetría de picos .....  | 24 |
| 3.2.6 | Instrumentación.....   | 26 |
|       | Columnas (material de empaque) .....   | 26 |
|       | Sistema de detección .....   | 30 |
| 3.2.7 | El cromatograma.....   | 31 |
| 3.3   | Validación .....   | 32 |
| 3.3.1 | ¿Por qué validar un proceso? .....   | 33 |
|       | Regulación Gubernamental.....  | 33 |
|       | Seguridad, Efectividad, Cantidad e Identidad (Aseguramiento de Calidad)..... | 33 |
|       | Reducción de costos .....  | 34 |
| 3.3.2 | Pasos de la validación.....  | 34 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.3.3 | Calificación.....                        | 35 |
|       | Calificación de Instalación.....         | 36 |
|       | Calificación Operacional.....            | 37 |
|       | Calificación de Funcionamiento.....      | 37 |
| 3.3.4 | Métodos analíticos .....                 | 37 |
| 3.3.5 | Guía de Validación.....                  | 40 |
|       | Especificidad.....                       | 41 |
|       | Linearidad del sistema .....             | 43 |
|       | Precisión del sistema .....              | 44 |
|       | Linearidad del método.....               | 44 |
|       | Exactitud del método.....                | 45 |
|       | Precisión del método.....                | 45 |
|       | Estabilidad de la muestra analítica..... | 46 |
|       | Límite de Detección del Método .....     | 46 |
|       | Límite de Cuantificación del Método..... | 47 |
| 4     | Metodología .....                        | 50 |

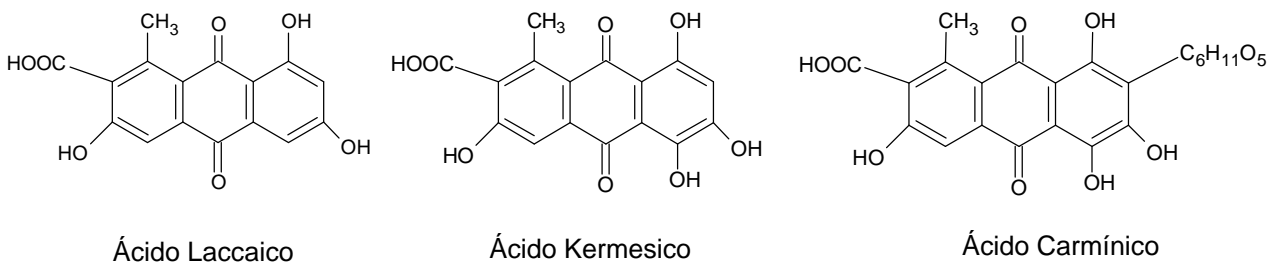
|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.1 | Tratamiento de la muestra.....            | 50 |
| 4.2 | Condiciones de detección y análisis.....  | 52 |
| 4.3 | Linealidad del sistema .....              | 52 |
| 4.4 | Precisión del sistema .....               | 53 |
| 4.5 | Linealidad del método.....                | 54 |
| 4.6 | Exactitud del método.....                 | 54 |
| 4.7 | Precisión (Reproducibilidad).....         | 54 |
| 4.8 | Estabilidad de la muestra analítica ..... | 55 |
| 5   | Resultados y análisis de resultados ..... | 56 |
| 5.1 | Condiciones de análisis.....              | 56 |
| 5.2 | Linealidad del sistema .....              | 58 |
| 5.3 | Precisión del sistema .....               | 60 |
| 5.4 | Linealidad del método.....                | 61 |
| 5.5 | Exactitud del método.....                 | 63 |
| 5.6 | Precisión (Reproducibilidad).....         | 64 |
| 5.7 | Estabilidad de la muestra analítica ..... | 65 |

|     |                        |    |
|-----|------------------------|----|
| 6   | Conclusiones.....      | 67 |
| 7   | Anexo.....             | 69 |
| 7.1 | Cálculos .....         | 69 |
| 7.2 | Material y equipo..... | 73 |
| 7.3 | Reactivos .....        | 74 |
| 8   | Bibliografía .....     | 75 |

# 1 INTRODUCCIÓN

La cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) es un insecto del que se puede aprovechar el ácido carmínico (ácido 7- $\alpha$ -glucopiranosil-9,10-dihidro-3,5,6,8-tetrahidro-1-metil-9,10-dioxo-2-antraceno carboxílico), pigmento natural obtenido de los cuerpos secos de las hembras adultas, siendo uno de los colorantes naturales aprobados actualmente por la reglamentación vigente en la comunidad Europea y por la Administración de Alimentos y Fármacos reconocida mundialmente como la FDA. La FDA define al extracto de cochinilla como: “un colorante en solución concentrada obtenido después de eliminar el alcohol de un extracto agua-alcohólico de cochinilla (*Dactylopius coccus* costa), en donde principal colorante es ácido de carmínico” <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/cfr73100.html> (18 de Junio 2006). El parámetro más importante para una evaluación de la calidad del pigmento de la cochinilla con fines comerciales, es su concentración, por lo que la calidad es mayor cuando el contenido de pigmento es más alto. Se ha encontrado que el extracto de pigmento que se obtiene de la cochinilla no es en su totalidad ácido carmínico, sino una mezcla de ácido carmínico, ácido laccaico y ácido kermésico (Figura 1). Estos dos últimos derivados de la síntesis incompleta del ácido carmínico debido a diversos factores bióticos y abióticos. Haciendo que las determinaciones espectrofotométricas solo cuantifiquen la mezcla de estos tres pigmentos y no haya una cuantificación real de ácido carmínico.

**Figura 1 Estructuras químicas de los principales pigmentos de la cochinilla de nopal**



El uso de la una técnica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) ofrece la ventaja de poder identificar, separar y cuantificar el ácido carmínico de sus análogos.

Una de las necesidades en la Industria Alimentaria es la implementación de métodos analíticos simples, rápidos y confiables para obtener una adecuada evaluación de la calidad y autenticidad del pigmento que produce la cochinilla (*Dactylopius coccus Costa*), haciendo necesaria la validación de un método analítico debido a que cada día en miles de laboratorios se hacen mediciones por diversas razones; pero que al final cada aspecto de la sociedad se apoya de alguna manera por una medida analítica.

Se puede definir la validación de un método analítico como el proceso de establecer las características del desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden cambiar estas características y hasta que nivel. Mediante el uso de información estadística que permita comprobar el margen de incertidumbre con el que se obtienen los resultados de lo que se esta analizando (Ramírez, 2004).

En la industria de alimentos la validación es una obligación, debido a que tiene que cumplir con los requisitos establecidos por los organismos oficiales y en nuestro país la responsable es la Secretaría de Salud (SS). En caso de productos para exportación, la legislación toma como referencia los requisitos que indiquen organismos internacionales, como la FDA de los Estados Unidos de Norteamérica.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 General

Validar la metodología por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para poder separar, identificar y cuantificar el ácido carmínico de sus análogos obtenido del extracto de la cochinilla (*Dactylopius coccus*). Asegurando mediante datos estadísticos generados con diversos ensayos de la metodología su adecuado desempeño.

### 2.2 Particular

- a) Determinar factores que influyen en la validación del método para la cuantificación del ácido carmínico
- b) Determinar que factores influyen en la exactitud durante la validación
- c) Determinar que factores influyen en la precisión durante la validación
- d) Determinar que factores influyen en el método de extracción durante la validación la para la obtención del pigmento y estabilidad de las muestras.

### 3 ANTECEDENTES

#### 3.1 Cochinilla de nopal, principales países productores

En el mercado mundial de la grana cochinilla se producen aproximadamente 500 toneladas por año, con valor estimado en 35 millones de dólares. De esta cantidad el Perú produce alrededor de 425 toneladas anuales, que corresponde al 85% del total de la producción, siendo por lo tanto el principal exportador en el mundo como se muestra en la tabla 3.1, siguiéndole en importancia, con un 10% las Islas Canarias y en el restante 5% participan Chile, Bolivia y Ecuador.

**Tabla 3.1** PERU: EXPORTACION DE ACIDO CARMINICO Y DERIVADOS POR PAIS DE DESTINO 1990 - 1994 ( TONELADAS METRICAS )

| PAIS         | 1990        | 1991        | 1992        | 1993        | 1994        | PROMEDIO '90-'94 |              | TMCA %      |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|--------------|-------------|
|              |             |             |             |             |             | TON              | %            |             |
| USA          | 16.7        | 19.2        | 23.0        | 21.8        | 22.6        | 20.7             | 31.5         | 7.9         |
| FRANCIA      | 9.0         | 11.0        | 15.0        | 13.3        | 13.6        | 12.4             | 18.9         | 10.9        |
| INGLATERRA   | 7.0         | 5.8         | 8.0         | 4.8         | 8.0         | 6.7              | 10.2         | 3.4         |
| ALEMANIA     | 3.0         | 5.5         | 6.4         | 6.0         | 7.5         | 5.7              | 8.7          | 25.7        |
| BRASIL       | 2.1         | 4.9         | 3.0         | 5.2         | 10.3        | 5.1              | 7.8          | 48.8        |
| JAPON        | 2.0         | 4.2         | 3.3         | 4.4         | 1.4         | 3.1              | 4.7          | 18.5        |
| HOLANDA      | 2.0         | 2.8         | 3.6         | 1.4         | 1.5         | 2.3              | 3.5          | 6.9         |
| IRLANDA      | 2.0         | 0.6         | 1.5         | 3.3         | 1.2         | 1.7              | 2.6          | 12.0        |
| ARGENTINA    | 0.7         | 0.8         | 0.3         | 1.0         | 3.2         | 1.2              | 1.8          | 46.2        |
| AUSTRALIA    | 0.5         | 1.0         | 1.0         | 1.6         | 1.5         | 1.1              | 1.7          | 31.6        |
| DINAMARCA    | 0.1         | 0.3         | 1.2         | 1.9         | 1.4         | 1.0              | 1.5          | 93.4        |
| ESPAÑA       | 0.6         | 0.5         | 0.4         | 0.9         | 1.8         | 0.8              | 1.3          | 31.6        |
| CHILE        | 0.5         | 0.6         | 0.1         | 1.0         | 1.6         | 0.8              | 1.2          | 33.7        |
| KOREA        | 0.0         | 1.0         | 0.6         | 1.6         | 0.4         | 0.7              | 1.1          | 26.3        |
| OTROS        | 1.8         | 1.8         | 1.4         | 3.9         | 3.0         | 2.4              | 3.6          | 13.6        |
| <b>TOTAL</b> | <b>48.0</b> | <b>60.0</b> | <b>69.0</b> | <b>72.1</b> | <b>79.0</b> | <b>65.6</b>      | <b>100.0</b> | <b>13.3</b> |

Fuente: Aduana peruana

En el caso de México la producción es insignificante con relación al mercado mundial, ya que se estima una producción de 100 kilos anuales de grana, casi toda se obtiene de la Mixteca, de la zona Central y de la Sierra Norte del Estado de Oaxaca. La producción de los otros centros es

casi inexistente, esto hace que no participe en los mercados internacionales ni de la grana, ni del carmín debido a la insuficiencia de la producción de cochinilla.

El total de la producción nacional se destina al consumo local para usos artesanales, siendo Puebla, Chiapas, Estado de México y Oaxaca las entidades que presentan la mayor demanda. En México no existen plantas transformadoras de cochinilla en carmín, por lo que la totalidad de este colorante natural que requiere la industria nacional se importa.

La producción de colorante con base en la cochinilla desde la primera mitad del siglo XIX se vio reducida en México debido a la competencia internacional y al aumento de la producción de colorantes artificiales en Alemania.

En la primera mitad del siglo XIX, Perú, Guatemala e Islas Canarias entran al mercado internacional y desplazan a México como primer productor mundial de grana, debido a estos cambios aumentó la oferta de ésta y los precios internacionales disminuyeron. Por su parte, Alemania inicia la producción de colorantes artificiales a nivel industrial, resultando una limitada demanda del colorante natural y reduciéndose con ello la producción del insecto.

En la segunda mitad del siglo XIX y a principios del siglo XX la producción del insecto descendió, debido fundamentalmente a la disminución en el precio del producto y de la demanda mundial.

No obstante, a partir de la reglamentación sobre el uso de colorantes sintéticos aprobada en Francia entre 1960 y 1970, se detecta que varios de ellos son nocivos para la salud, por lo que la demanda de carmín aumento rápidamente, incrementándose al doble de lo exportado y provocando un alza considerable en los precios de la cochinilla.

En los últimos años, la demanda de la grana cochinilla se ha incrementado significativamente, debido a que los colorantes sintéticos son nocivos para la salud ya que se ha demostrado que provocan alergias e incluso cáncer en el ser humano. En particular destaca el Rojo Congo, que en el año de 1884 desplazara a la cochinilla en la industria textil; en la actualidad su uso se ha prohibido en la Industria Alimentaria debido a sus posibles efectos teratogénicos (mutaciones) y carcinogénicos (Hernández et al., 2005)

### **Costos de explotación**

La producción de cochinilla solo se lleva a cabo en el estado de Oaxaca y la comercialización también se realiza en esa entidad. La producción en Tlaxcala, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Michoacán es de carácter experimental y no se tiene registros de unidades comerciales.

El costo de inversión en las explotaciones tradicionales en Oaxaca, como única zona productora, es de \$6,000.00 por unidad productiva. Dicha explotación se realiza en una superficie aproximada de 200 m<sup>2</sup> -sin considerar el costo del terreno y la recuperación de la inversión-, se lleva a cabo en 1.3 años. Este tipo de explotación corresponde a pequeños productores que cultivan cochinilla en su “traspatio”.

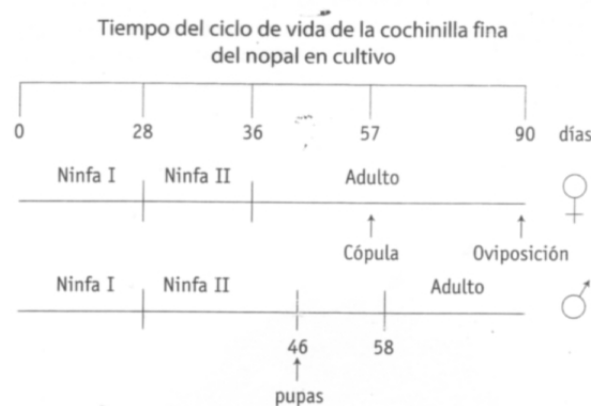
Cabe aclarar que el costo de inversión se refiere a la compra de la cochinilla madre. De aquí que la producción por planta, por metro cuadrado sea de 12 gramos calculando que se obtienen 3 cosechas al año, cada planta produciría 36 gramos al año, por lo tanto la producción de 200 plantas sería de 7.2 kilos de cochinilla al año. El cálculo de 1.5 gramos por penca se refiere al animal ya seco.

El costo de producción solo incluye el de mano de obra que, en estas explotaciones es de carácter familiar [http://www.infoaserca.gob.mx/proafex/COCHINILLA\\_NOPAL.pdf](http://www.infoaserca.gob.mx/proafex/COCHINILLA_NOPAL.pdf) (12 junio 2006)

### Ciclo de vida y morfología de *Dactylopius coccus* Costa

La llamada cochinilla fina del nopal es un insecto originario de México que vive como parásito en la superficie del nopal verdulero (*Opuntia picus-indica*). La cochinilla de nopal se cultiva por ciclos de 80-90 días, tiempo en que completa su ciclo de vida (Figura 2). De ese modo se sincronizan las poblaciones del insecto para su cultivo.

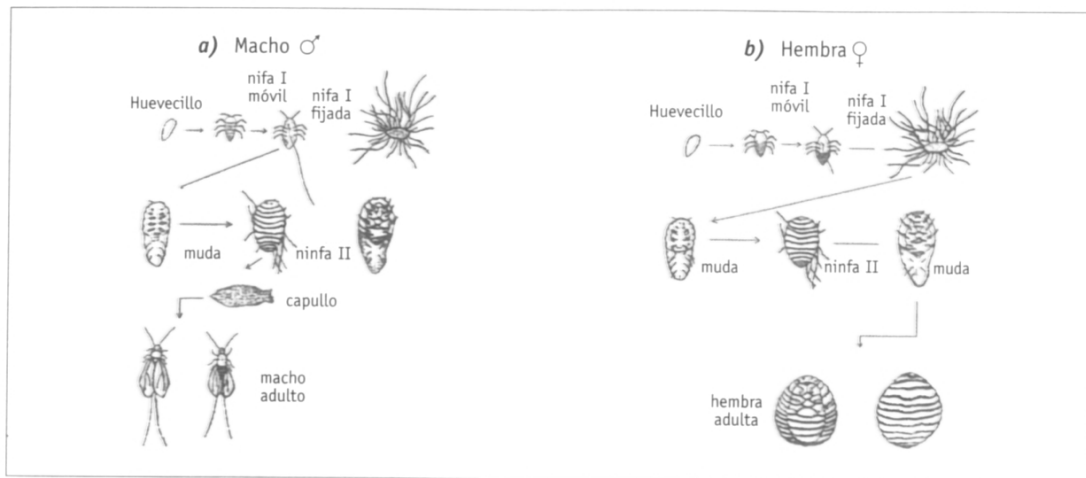
Figura 2 ciclo de vida de hembras y machos



En promedio las hembras miden de 3 a 6mm de largo por 2.5 a 4.5mm de ancho (Biodiversitas, 2001) La hembra madura deposita sus huevillitos (entre 150 y 400 huevos) y después muere (figura 3b). El macho adulto se origina a partir de ninfas que realizan metamorfosis completa, es alado (figura 3a) y muere, de 2 a 3 días luego de copular ya que por tener el aparato bucal atrofiado no pueden alimentarse.

Existen dos tipos de cochinilla: la silvestre y la fina o “grana cochinilla”. La cochinilla fina pertenece a la especie *Dactylopius coccus Costa*. Se cultiva desde tiempos prehispánicos para la producción del colorante rojo ácido carmínico muy cotizado por sus múltiples usos en la tinción de fibras textiles, la industria de los alimentos cárnicos y lácteos, en productos farmacéuticos, cosméticos y para la elaboración de tinciones histológicas y bacteriológicas.

**Figura 3 Comparación del desarrollo de machos y hembras de cochinilla de nopal**



Para la producción de grana se requiere de un cultivo intenso y cuidadoso de la grana fina que implica limpiar, seleccionar y recolectar a mano a los insectos planta por planta. La grana fina se caracteriza por tener un alto porcentaje de ácido carmínico (25 por ciento del peso del insecto) y porque su superficie está protegida por un polvo seroso, secretado por glándulas especiales y que sirve de mecanismo de defensa contra su enemigos naturales (Biodiversitas, 2001). En contraste, la especie silvestre solo posee un 10% de ácido carmínico y está recubierta por fibras de aspecto algodonoso, que dificultan la extracción del pigmento.

## Desarrollo histórico de la grana cochinilla en México

La tintura de la grana cochinilla fue ampliamente utilizada desde épocas prehispánicas; se ha encontrado en las descripciones y representaciones labradas en murales y en pinturas.

Con la llegada de los españoles a América comenzó un intenso intercambio de productos entre ambos continentes y la cochinilla fue uno de los principales. Según León Diguét, en su libro *Las cactáceas útiles de México* publicado en Francia en 1928, la primera exportación de cochinilla a Europa se hizo en 1523, es decir, apenas dos años después de consumada la conquista de Tenochtitlan. El impacto del colorante en Europa fue tan grande que se convirtió en el tercer artículo de exportación de la Nueva España, después de la plata y el oro.

En el año de 1530 la grana fue incorporada al sistema de tributos reales, y para 1550 el consumo en Europa ya se había generalizado; el carmín se utilizaba para teñir los ropajes de la nobleza y de los eclesiásticos. En 1575 en algunos lugares de Oaxaca la cochinilla llegó a adquirir tal importancia que alcanzaban a recolectar cerca de 7000 arrobas (80,542kg) en un año; de esta forma el valor promedio anual del comercio llegaba a los 259 000 pesos, cantidad considerable en esas primeras décadas del siglo XVI.

Mientras tanto, el cultivo de la cochinilla comenzó a probar suerte en otros lugares del mundo. En 1820 llegaron a la Sociedad Económica de Cádiz, procedentes de Veracruz, ocho nopales cargados de cochinilla e inmediatamente fueron enviadas a las islas Canarias en 1825 con un decreto en el que se ordenaba cultivarlo en ese lugar. Con esta acción se saturó el mercado mundial debido al caos administrativo que prevalecía en México poco después de la Guerra de

Independencia. Para el año de 1870 la producción fue de 2,778,400 kg y en 1890 México solo se exporto 6kg de cochinilla.

A mediados del siglo XX se presenta otro factor que reactiva nuevamente el cultivo de la grana. Se detectan casos de alergias provocadas por el uso de colorantes artificiales en alimentos procesados e incluso algunos de éstos son señalados como agentes cancerígenos. Actualmente, en la reglamentación vigente en la comunidad Europea, el carmín y el ácido carmínico aparecen como colorantes inocuos para la salud humana, por lo que a partir de 1960 han tenido una creciente aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica (Biodiversitas, 2001). Al igual que la comunidad europea la FDA exenta de certificación al carmín y al ácido carmínico dentro de su código de regulaciones (Titulo 21 Vol. 1 Cap1 Parte 73) que indica “La certificación de estos colorantes no es necesaria para la protección de la salud pública, y por consiguiente los lotes están exentos de los requisitos de certificación de la sección 721(c) vigente” <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/cfr73100.html> (18 de Junio 2006) siempre y cuando cumpla con ciertas especificaciones que se indican en el mismo código de regulaciones mencionado anteriormente y los cuales se exponen en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2 Especificaciones de la FDA para una solución de ácido carmínico**

|                     |  |
|---------------------|--|
| pH                  | no menos de 5.0 y no más de 5.5 a la 25 °C |
| Proteína (N x 6.25) | no más de 2.2 por ciento                   |
| Sólidos totales     | no menos de 5.7 y no más de 6.3 por ciento |
| Alcohol del metilo  | no más de 150 partes por millón            |
| Plomo (como Pb)     | no más de 10 partes por millón             |
| Arsénico (como As)  | no más de 1 parte por millón               |
| Ácido Carmínico     | no menos de 1.8 por ciento                 |

La empresa Colores Naturales de Chile -país donde actualmente existe una producción intensiva de gran calidad, antecediéndole Perú-, fundada en 1991 por José Antonio



Bustamante, ofrece una amplia variedad de productos derivados de la cochinilla. Entre los que se pueden mencionar: el ácido carmínico líquido de color rojo oscuro que se utiliza como colorantes para yogurt, helados, refrescos, embutidos, cecinas, caramelos, cerezas, licores, harinas, galletas, mermeladas, etc. Las lacas carmínicas insolubles y el polvo de color rojo brillante se utilizan además en cosméticos y fármacos como tabletas, cápsulas y jarabes, entre varias presentaciones de uso más específico.

En este segundo auge del ácido carmínico, México no ha tenido un papel importante en el ámbito internacional y su cultivo se ha mantenido gracias a la acción de los artesanos que como tradición la utilizan para teñir sus productos.

No es de extrañar que a partir de la segunda mitad de los 80's químicos, ingenieros, biólogos, antropólogos y especialistas en arte popular de muy diversas instituciones se dedicaran a la tarea de rescatar el cultivo y el uso de la "grana fina". De 1984 hasta la fecha se han iniciado programas encaminados al rescate del cultivo de la cochinilla en varios estados del país: Oaxaca, Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro, Zacatecas, Jalisco, Hidalgo, Estado de México, Aguascalientes, Morelos, Baja California, sin embargo la producción sigue siendo mínima.

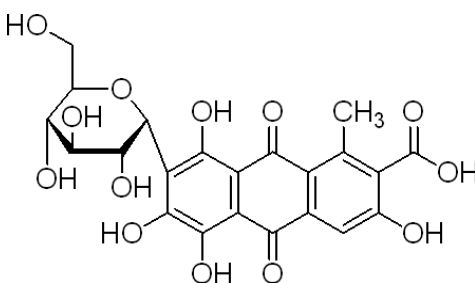
En 1999 el colegio de posgraduados de Chapingo en coordinación con varias dependencias y programas oficiales como SAGAR (Secretaría de Agricultura), SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social) y FONAES (Fondo Nacional de Apoyo a las Empresas en Solidaridad), elaboraron el Programa Nacional de la Grana-Cochinilla, que en una etapa inicial pretendía impulsar el cultivo en 17 estados de la república. Sin embargo, la falta de continuidad en estos

programas de rescate ha llevado a la mayoría de ellos al fracaso y desafortunadamente, no se han traducido en beneficios económicos reales para los productores (Biodiversitas, 2001).

### Química del ácido carmínico

El ácido carmínico es una metil antraquinona hidroxilada, unida a una glucosa por enlace carbono-carbono con un peso molecular de 492.39 g/mol y su fórmula molecular es  $C_{22}H_{20}O_{13}$  (figura 4). Es soluble en metanol y agua, poco soluble en éter e insoluble en éter de petróleo.

Figura 4 Estructura molecular del ácido carmínico

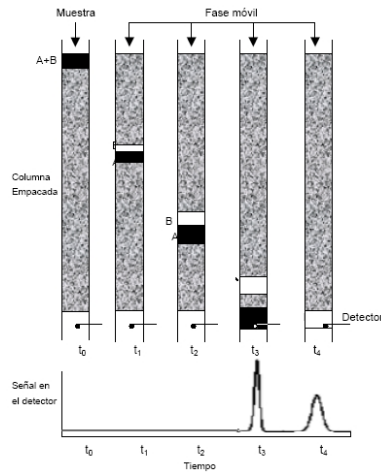


## 3.2 Cromatografía de Líquidos de alta Resolución (CLAR)

### 3.2.1 Principios en los que se basa la cromatografía y su clasificación

La cromatografía es una técnica que nos permite separar, identificar y cuantificar los componentes de la mezcla de compuestos químicos, basado en su distinta adsorción, tamaño molecular o polaridad en superficies sólidas o líquidas de distintos tipos. Se caracteriza por tener una fase móvil y una fase estacionaria. La separación es el proceso de migración diferencial en la cual los componentes de la mezcla son transportados por la fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria, (Figura 5) lo anterior esta relacionado a la constante de equilibrio que presentan los diferentes analitos presentes en la muestra entre estas dos fases.

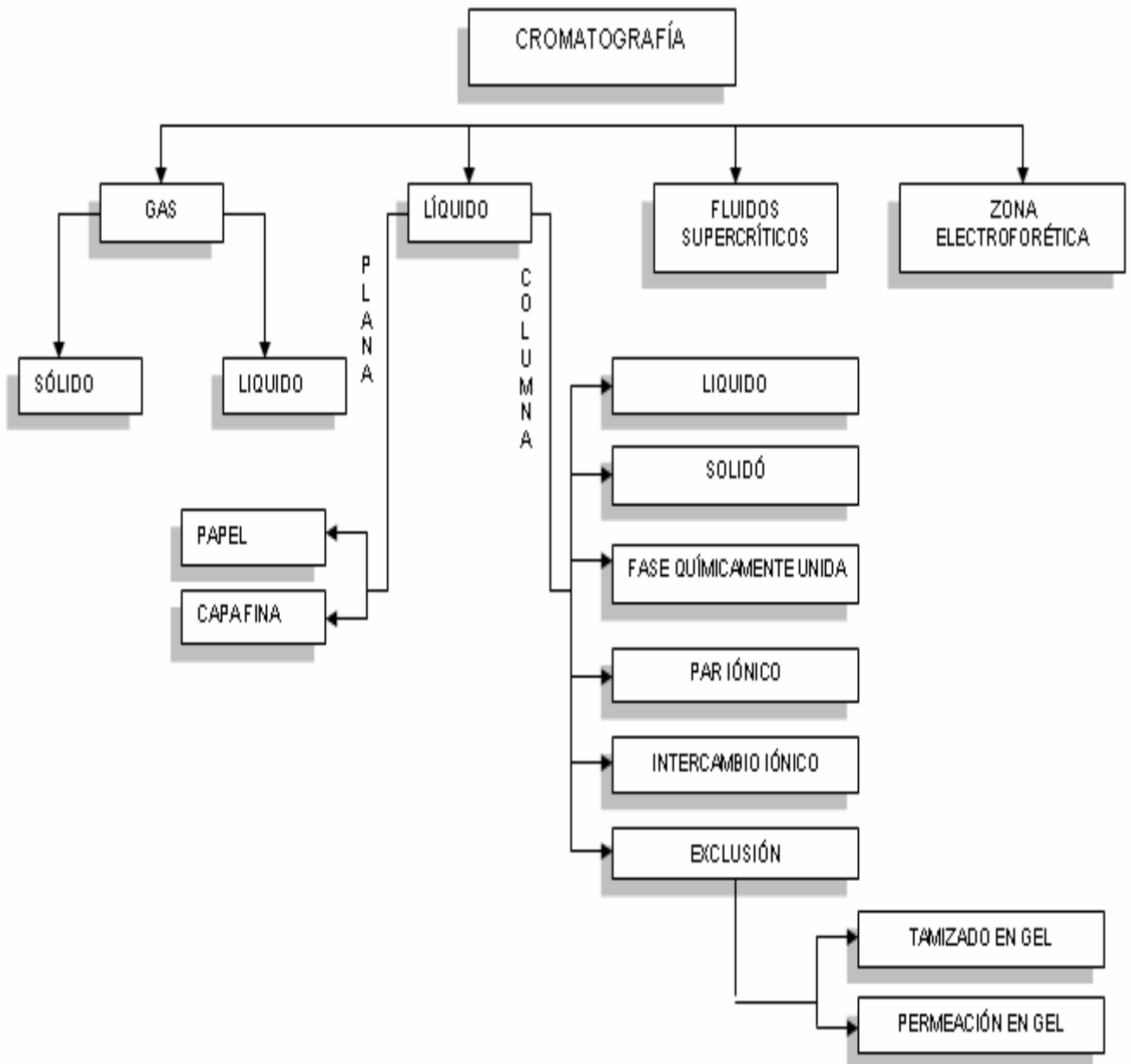
Figura 5 Separación de los compuestos de una mezcla por la retención selectiva de una fase estacionaria



Normalmente la cromatografía se puede dividir de una manera general con respecto a su fase móvil y después realizar una subdivisión por el tipo de fase estacionaria (Figura 6)

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de equilibrios debido a las interacciones entre cada uno de estos componentes, como son las interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones bipolares, electrostáticas, etc., y que son responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Los componentes más afines a la fase estacionaria se retienen más y tardan más en eluir y los más afines a la fase móvil se retienen menos y eluyen más rápido (Ramírez, 2004).

Figura 6 Clasificación general de las técnicas cromatográficas



Para poder seleccionar el análisis cromatográfico adecuado se debe tomar en cuenta la polaridad y solubilidad del analito a separar, tomando como guía el siguiente diagrama de separación (Tabla 3.3)

**Tabla 3.3 Diagrama de separación de distintos analitos en base a sus propiedades de solubilidad y polaridad**

| CARACTERÍSTICAS DEL ANALITO                                       |                                   | TÉCNICA                    | TIPO DE ANALITO   | COLUMNA  |
|---|-----------------------------------|----------------------------|---|--|
| Soluble en agua   | No iónico                         | Fase reversa               | GENERAL (pH 2-7.5)  | C18, C8,RP-Amida C16; Cyano LC-NH <sub>2</sub> |
|   |                                   |                            | GENERAL (pH 2-13)   |  |
|   |                                   |                            | Ácidos orgánicos  |  |
|   |                                   |                            | Aminoácidos   |  |
|   |                                   |                            | Aminas orgánicas  |  |
|   |                                   |                            | Aminas cuaternarias pH $\geq$ 7.5)                        |  |
|   |                                   |                            | Compuestos quelantes                                      |  |
|   |                                   |                            | Farmacéuticos básicos                                     |  |
|   |                                   |                            | Farmacéuticos en suero                                    |  |
|   |                                   |                            | Explosivos  |  |
| Nucleósidos   |                                   |                            |   |  |
| Nucleótidos   |                                   |                            |   |  |
| Péptidos  |                                   |                            |   |  |
| Azucares  |                                   |                            |   |  |
| Antidepresivos triciclicos  |                                   |                            |   |  |
| Vitaminas hidrosolubles   |                                   |                            |   |  |
|   |                                   | Interacciones hidrofóbicas | Péptidos  |  |
|   |                                   | Tamaño de exclusión        | Oligosacáridos<br>Polímeros/oligómeros hidrofílicos       | TSK-GEL  |
|   | Iónico                            | Intercambio iónico         | Aniones orgánicos (carga-)<br>Cationes orgánicos (carga+) | Discovery C18                                  |
|   |                                   | Ion par                    | Ácidos orgánicos<br>Aminas orgánicas                      | Discovery C18                                  |
|   |                                   | Ion exclusión              | Ácidos orgánicos<br>Carbohidratos, Azucares               | SUPELCO GEL C611, K, Pb Ag1<br>Ag2, Ca         |
| Soluble en disolventes orgánicos                                  |                                   | Fase normal                | GENERAL   | Cyano LC-NH <sub>2</sub> , Lc-Si, LC-Diol      |
|   |                                   |                            | Aflatoxinas   |  |
|   |                                   |                            | Esteroides<br>Vitaminas solubles en grasa                 |  |
|   |                                   | Fase reversa               | Ácidos grasos   | C18, C8,RP-Amida C16                           |
| Hidrocarburos poliaromáticos                                      |                                   |                            |   |  |
| Polímeros hidrofílicos<br>Triglicéridos<br>Vitaminas liposolubles |                                   |                            |   |  |
| Tamaño de exclusión   | Polímeros/oligómeros hidrofílicos | TSK-GEL H                  |   |  |

### 3.2.2 Cromatografía de fase químicamente unida

En esta opción la fase estacionaria esta químicamente unida a la superficie de un soporte por lo que la fase móvil difícilmente puede producir deterioro alguno en la fase estacionaria.

Dependiendo de los grupos funcionales que contiene el compuesto que se une químicamente al soporte, se pueden trabajar dos tipos de cromatografía (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4 Tipos de Cromatografía de Líquidos en columna**

|                   | Cromatografía en fase normal   | Cromatografía en fase inversa   |
|-------------------|--|---|
| Fase estacionaria | Polar  | No polar  |
| Fase móvil        | No polar   | Polar   |
|                   | disolventes orgánicos como n-hexano, heptano, cloroformo y alcoholes | mezclas de acuosa con metanol, acetonitrilo y aditivos (buffers, PIC) |

Si los compuestos que se unen al soporte de la fase estacionaria tienen grupos funcionales como el grupo amino ( $-NH_2$ ), el grupo nitrilo ( $-CN$ ) o el grupo hidroxilo ( $-OH$ ) éstas son de tendencia polar y se trabaja por lo tanto la cromatografía en fase normal. Si son de tipo no polar como el grupo octil ( $-C_8H_{17}$ ), octadecil ( $-C_{18}H_{37}$ ), fenil ( $-C_6H_5$ ) se trabaja con cromatografía en fase inversa o reversa.

### 3.2.3 Cromatografía en fase normal

La cromatografía en fase normal es la más clásica de los distintos tipos de cromatografía usando una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar. El soluto es retenido por la interacción de los grupos funcionales polares con los grupos polares de la superficie del empaque. La unión entre la sílica y la alumina son usados para esta aplicación, pero todavía las

uniones polares son usadas por las siguientes ventajas: se equilibran rápidamente, son menos sensibles a concentraciones mínimas de agua en la fase móvil.

En cromatografía en fase normal la polaridad del disolvente es el principal factor que determina los volúmenes de elusión. Cuando los disolventes son mas polares, los solutos se desplazan con más rapidez y se eluyen más pronto. La explicación es sencilla: los disolventes polares compiten mejor por los solutos que los disolventes menos polares. Sin embargo la polaridad del disolvente no es el único factor que permite una elusión más rápida. Otro factor puede ser la capacidad de formación de puentes de hidrogeno del disolvente

**Tabla 3.5 Ejemplos de la aplicación de la cromatografía en fase normal para la cuantificación de compuestos de interés en productos alimenticios**

| Tipo de análisis  | Tipo de muestra                             | Columna  | Fase Móvil   | Detector   |
|---|---|--|--|--|
| Palmitato de vitamina A y acetato   | Leche entera fortificada                    | μPorasil 10μm  | Hexano/CHCl <sub>3</sub> (98:2)  | UV 313 o 340nm<br>Fluorescencia:<br>ex. 340nm em.<br>450nm |
| Vitamina D  | Leche en polvo fortificada                  | LiChrosorb-NH <sub>2</sub> 10 μm   | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /hexano/PrOH (50:50:0.2)               | UV 264 nm  |
| Vitamina E<br>(α-, β-, γ-, δ-T, α-, β-, γ-, δ-T3)   | Aceite de semillas, margarina y mantequilla | LiChrosorb Si-60 5μm<br>(Temperatura de la columna a 60°C para separar todos los vitameros de la vitamina E) | Éter diisopropilico en un gradiente de 8% a 17% en hexano              | Fluorescencia ex. 290nm em. 325 nm                         |
| Vitamina C  | Manzanas y papas                            | Dinamax-60A-NH <sub>2</sub> 8μ   | Acetonitrilo:Amortiguador de acetato de sodio 0.01M (75:25 v/v)        | UV 254 nm  |
| Fosfolipidos (fosfatidiletanolamina, fosfatidil inositol, fosfatidilserina, acido fosfatidico, fosfatidil colina y esfingomielina)  |   | LiChrosorb Si-100 5μm  | Hexano/2-PrOH/H <sub>2</sub> O(60:80:7 v/v/v)                          | UV 206 nm  |
| Carbohidratos excepto Glucosa/galactosa, Glucosa/mannitol, Glucosa/sorbitol, Fructosa/xylitol, (tiempos de retención largos para rafinona y estaquiosa, se pueden usar para oligosácaridos) |   | Sílice Aminada   | CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (80:20)                            | RI   |
| Carbohidratos excepto Glucosa/mannitol, Glucosa/sorbitol, Fructosa/xylitol, (tiempos de retención largos para rafinona y estaquiosa, se pueden usar para oligosácaridos)                    |   | Sílice de aminas modificadas "in situ"   | CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (75/25) + modificador de poliamina | RI   |

Fuente: Mollet L. Leo

### 3.2.4 Cromatografía en fase reversa o inversa

La cromatografía en fase reversa es modo más popular de la cromatografía de líquidos. En la cromatografía en fase reversa la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. La fase estacionaria es sílica unida a hidrocarburos alifáticos y las fases móviles más comunes son mezclas de agua o soluciones amortiguadoras con metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano.

(Tabla 3.6)

El funcionamiento de los empaques en fase reversa depende de la actividad residual de los grupos silanol (Si-OH) en la superficie de la partícula. Los grupos silanol interaccionan con los grupos funcionales polares del soluto. Por consiguiente, los empaques exhiben diferentes selectividades dependiendo de la actividad de los grupos silanol. Además el coleo de picos a menudo es observado en compuestos básicos en empaques con un alto nivel de actividad de grupos silanol. Este coleo resulta de las interacciones de intercambio catiónico posiblemente con analitos cargados básicamente (negativamente) cuando los grupos silanol están desprotonados a un  $\text{pH} > 3$ .

Un paso para modificar la actividad de los grupos silanol es por endcapping, que es la reacción con reactivos de silanización que convierten los grupos silanol en grupos trimetisilano. No obstante la concentración residual de grupos silanol en la superficie es más alta que el total de la concentración de ligandos incluyendo las ligaduras del endcapping. La actividad de los grupos silanol depende del pretratamiento de la sílice (desactivación básica) y de su pureza.



**Tabla 3.6 Ejemplos de análisis de distintos componentes de interés nutricional en productos alimenticios por cromatografía en fase reversa**

| Tipo de análisis  | Tipo de muestra         | Columna (fase estacionaria)       | Fase Móvil   | Flujo | Detector   |
|---|-------------------------|-----------------------------------|--|-------|--|
| Retinol   | Leche y queso           | Nucleosil C <sub>18</sub><br>10µm | ACN/H <sub>2</sub> O (95:5)  |       | UV 328nm   |
| Palmitato de vitamina A y β-caroneto  | Margarina               | µBondapak C <sub>18</sub><br>10µm | ACN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (70:30)                              |       | UV 313nm (palmitato de vitamina A) Vis. 436nm (β-caroteno) |
| Vitamina D <sub>2</sub> y D <sub>3</sub>  | Margarina               | Nucleosil C <sub>18</sub> 5 µm    | MeOH/H <sub>2</sub> O (95:5)   |       | UV 264 nm  |
| Vitamina K (filoquinona)  | Formula infantil        | µBondapak C <sub>18</sub><br>10µm | MeOH/ ACN/THF/H <sub>2</sub> O (39:39:16:6)                              |       | UV 254 nm  |
| Vitamina B6 (PL/PN/PM)  | Alimentos deshidratados | µBondapak C <sub>18</sub>         | Amortiguador de fosfato de potasio 0.33M (pH2.2)                         | 1     | FI 295/370   |
| Rivoflavina   | Leche                   | Cosmosil 5µ C <sub>18</sub>       | Agua/MeOH/Ácido acético (45:65:0.1, v/v/v)                               | 1     | UV 254 nm  |
| Vitamina C  | Dulces                  | Inertsil ODS                      | 0.1% ácido fosfórico (pH 2.2)  | 0.7   | UV 254 nm  |
| Acido fólico  | Dietas comerciales      | µBondapak C <sub>18</sub>         | Acetonitrilo/Amortiguador de acetato de sodio 0.1M (pH 5.7) (6:94 v/v)   | 2     | UV 365 nm  |
| Ácidos grasos libres (18:3 cis, 16:1 cis, 16:1 trans, 18:2 cis, 18:2 trans,18:1 cis, 18:1 trans 18:0) |                         | Supelcosil LC18 5µ                | THF/Acetonitrilo/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.1% (21.6:50.4:28) 35°C | 1.5   | UV 220 nm  |

Fuente: Mollet L. Leo

### 3.2.5 Parámetros cromatográficos

El objetivo de la separación analítica se puede lograr por la optimización de las condiciones de elusión, el empaque de la columna y la configuración de la columna.

Las variables que constituyen las condiciones de elusión son la composición de la fase móvil, el perfil de elusión (isocrático o gradiente lineal), el flujo y en menor grado la temperatura. Las variables del material de empaque de la columna son la forma de separación, la fase de unión, los grupos adyacentes, tamaño de poro, tamaño de partícula, carga de carbono y superficie.

Las variables de la configuración de la columna son: la longitud, diámetro interno y material de construcción.

Frecuentemente la experimentación es la mejor vía para determinar un conjunto de variables, sin embargo si se tiene un modelo teórico desarrollado, ayudara en la separación.

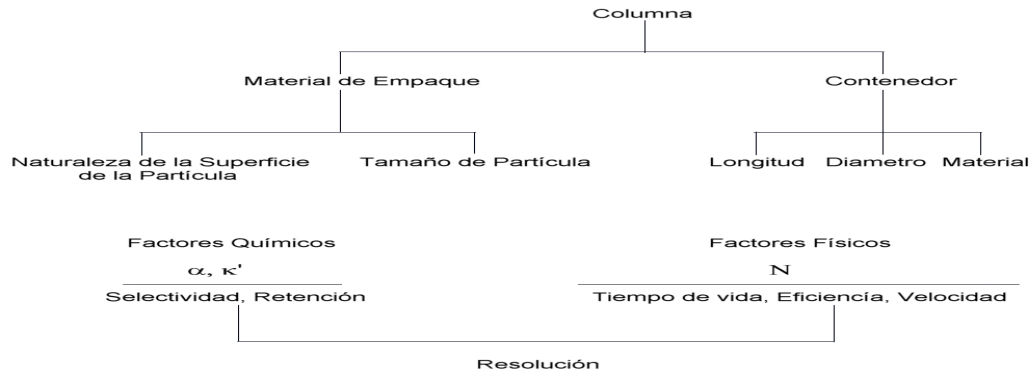
En el modelo teórico, los factores que afectan a la separación son divididos en factores químicos, como la selectividad, la capacidad y los factores físicos como la eficiencia de la columna y número de platos teóricos. (Ramírez, 2004)

- **Eficiencia**

Se define como la capacidad que tiene la columna analítica (tomando en cuenta la fase estacionaria) para separar los compuestos de una mezcla homogénea.

La dispersión es un factor que afecta a la eficiencia de la columna y se refiere a la pérdida de propiedades de la columna (Figura 7). Se produce debido a incrementos en la velocidad del flujo o por una errónea selección de tamaño de partícula. La velocidad de flujo causa dispersión debido a que las partículas viajan más rápido por el centro de columna que por los costados, produciendo un desgaste. Si se incrementa el flujo, puede producir una disminución de la vida media de la columna. Otro factor es el largo de la columna, a mayor longitud se tiene un incremento en la eficiencia.

Figura 7 Propiedades de la columna y algunas contribuciones en el funcionamiento cromatográfico



La eficiencia se puede definir como

**Eficiencia= Número de Platos Teóricos= Número de equilibrios**

Sin embargo, el número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de todo el sistema de CLAR no es necesariamente la eficiencia de la columna. Típicamente, el volumen muerto es una pequeña contribución instrumental, de la columna analítica de cierta longitud y diámetro. Aunque ambas características son reducidas, la contribución instrumental llega a ser significativo. Por lo que podemos definir al número de platos teóricos como una medida indirecta de la relación entre picos y el tiempo de retención específico de cada analito. De manera práctica la ecuación que se utiliza para calcular la eficiencia es:

$$N = 5.545 \left( \frac{tr'}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad N = 16 \left( \frac{tr'}{W} \right)^2$$

Donde:

tr'= tiempo de retención del compuesto – tiempo de retención de fase móvil (tr-t<sub>0</sub>)

W= ancho del pico del compuesto

W<sub>1/2</sub> = ancho a la mitad de la altura del pico (Ramírez, 2004)

- **Selectividad**

Es una medida de la retención relativa de dos compuestos en una mezcla. La selectividad de una columna está en función del material de empaque de la columna (C<sub>18</sub> o CN) y las condiciones de elusión (pH de la fase móvil y la temperatura).

Es una medida de la distancia entre dos picos cromatográficos, un valor de 1 indica que no existe selectividad entre dos componentes (Figura 8), por lo que los picos en el cromatograma aparecen juntos o traslapados, el valor de la selectividad no puede ser menor a uno y aumenta conforme se separan los picos. La ecuación para su cálculo es la siguiente:

$$\alpha = \frac{tr'_2}{tr'_1}$$

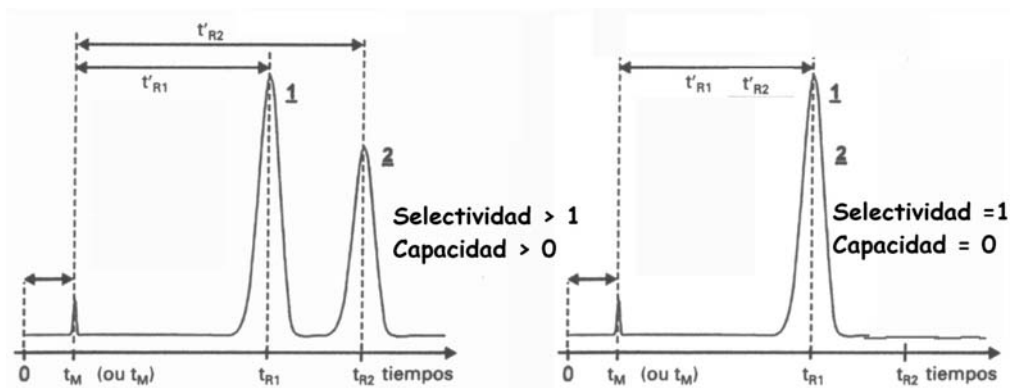
Donde:

$\alpha$ = selectividad

$tr'_2$ = tiempo de retención corregido del compuesto que tarda mas en eluir

$tr'_1$ = tiempo de retención corregido del compuesto que tarda menos en fluir

**Figura 8** Se muestran dos cromatogramas en el de la izquierda la selectividad es > 1 cuando hay una separación entre dos analitos en el de la derecha la selectividad es igual a 1 al no haber separación entre dos analitos,



- **Factor de Capacidad**

El factor de capacidad es una medida que indica que tan bien es retenido el analito en la columna durante una separación isocrática. El factor de capacidad es afectado por el material de empaque de la columna y las condiciones de elusión.

La capacidad de retención es igual el número de moles en la fase estacionaria dividida entre el número de moles de la fase móvil, siendo específico para cada compuesto.

Una molécula que no es retenida en la fase estacionaria, debe de eluir en un volumen de columna junto con la fase móvil obteniendo una  $k$  cercana a cero; a valores altos de  $k$  (figura 8), indican una elevada interacción del analito con la fase estacionaria, lo que produce un incremento en la resolución entre picos cromatográficos.

$$k = \frac{t_r'}{t_0}$$

Donde:

$K$ = capacidad

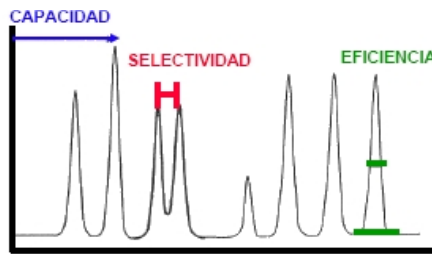
$t_r'$ = tiempo de retención corregido

$t_0$ =tiempo muerto

- **Resolución**

La resolución nos indica que tan separada esta el área de un pico con respecto a otro. Los factores de control de la resolución entre dos señales o picos están dados por la eficiencia, capacidad y selectividad (Figura 9). Siendo el valor deseado para una buena resolución alrededor de 2.0 donde se considera que los picos están bien resueltos, para poder cuantificar el analito (Figura 10).

Figura 9 Cromatograma donde se muestran los factores de determina la resolución



Siendo la ecuación general de la resolución la siguiente:

$$R = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{EFICIENCIA}} \times \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{SELECTIVIDAD}} \times \underbrace{\frac{k'}{1 + k'}}_{\text{CAPACIDAD}}$$

La ecuación práctica para calcularla es:

$$R_s = 2 \left( \frac{tr'_2 - tr'_1}{W_2 + W_1} \right)$$

Donde.

$tr'_2$ = tiempo de retención corregido del compuesto que tarda mas en eluir

$tr'_1$ = tiempo de retención corregido del compuesto que tarda menos en eluir

$W_2$ = ancho del pico del compuesto que tarda mas en eluir

$W_1$ = ancho del pico del compuesto que tarda menos en eluir

- **Simetría de picos**

Los cromatogramas reales están lejos muchas veces de presentar picos de aspecto Gausiano.

Hay varias razones para esto:

- Se produce una irregularidad en la concentración en la zona de depósito de la sustancia que se encuentra en la cabeza de la columna.

- La velocidad de la fase móvil es nula en las paredes de la columna y máxima en el centro de esta.

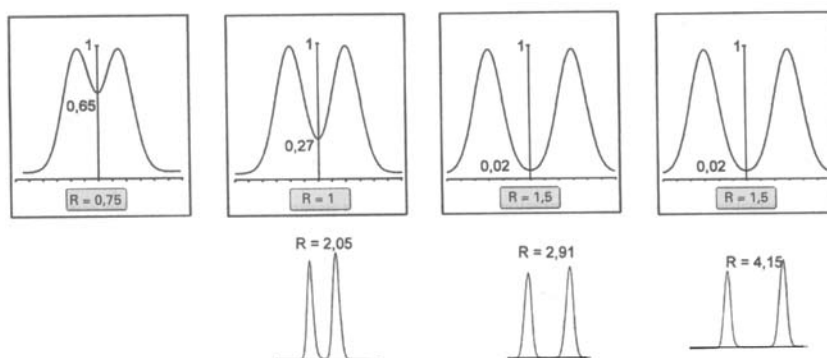
La simetría observada en un pico se traduce por dos parámetros denominados factor de asimetría (Fa) y el factor de cola (Fc) medidos ambos al 10% de la altura del pico (Figura 11).

$$Fa = b/a$$

$$Fc = (a+b)/2^a$$

En la situación de la figura 11a se representa un pico ideal que corresponde a la invariabilidad de la isoterma. En la situación de la figura 11b la fase estacionaria está saturada y debido a este hecho, el ascenso del pico es más rápido que el descenso. En figura 11c el analito está demasiado retenido en la fase estacionaria y el tiempo de retención se prolonga y el ascenso del pico es más lento que el descenso, lo que es una situación normal (Rouessac, 2003).

**Figura 10 Cromatogramas donde se muestra el aumento de la resolución conforme hay una mayor separación entre los picos**

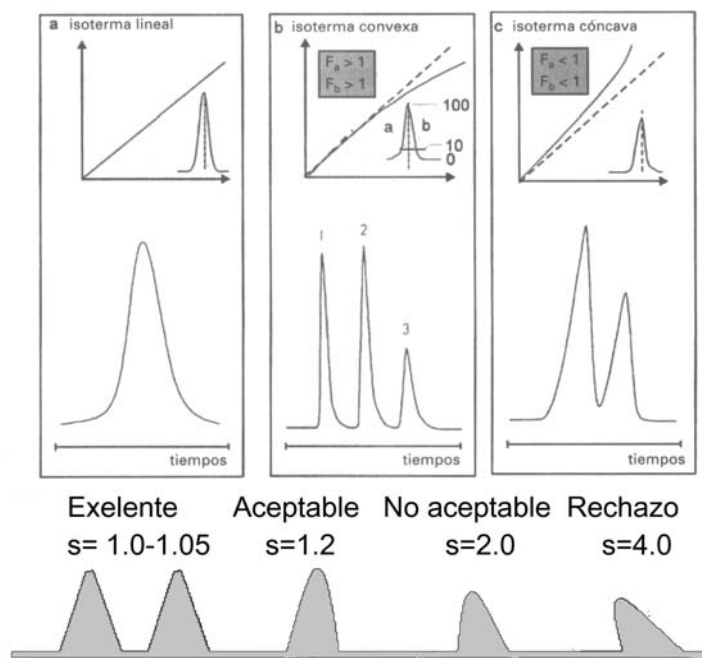


### 3.2.6 Instrumentación

- **Columnas (material de empaque)**

Los empaques o “material de empaque” para CLAR pueden ser principalmente cerámicas inorgánicas o un sustrato polimérico orgánico. Las cerámicas orgánicas usadas más predominantemente son la sílice y la alúmina. Los empaques inorgánicos tienen una alta rigidez y no aumentan su volumen en cualquier disolvente. Los empaques poliméricos grado CLAR son hechos a base de iones cruzados de estiren-divinilbenzeno o metacrilatos. Los empaques poliméricos no tienen la rigidez que los empaques inorgánicos y son mas compresibles. Los disolventes y analitos que pueden penetrar en la matriz polimérica pueden causar un aumento en el tamaño de la partícula y como resultado hay una baja eficiencia de la columna a causa de una baja reducción en la transferencia de masa.

Figura 11 Simetría de los distintos picos cromatográficos





- **Sílica**

La sílica es el material más popular y es la base para los empaques de CLAR, al proveer de una superficie que tiene un amplio rango de ligandos pudiendo ser modificados, usando una técnica bien establecida de silanización (enlaces) en la superficie del grupo silanol. Cuando se modifica ésta técnica se pueden preparar empaques para cromatografía en fase reversa, intercambio iónico, interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas y tamaño de exclusión. Los empaques que tienen como base la sílice son compatibles con un amplio rango de disolventes polares y no polares. Una de sus debilidades es la estabilidad al pH en fases móviles alcalinas, un pH entre 2-8 es el más recomendado. Otra potencial debilidad es la presencia de grupos silanol que causan un severo coleo del pico en analitos básicos, bajo condiciones neutras (pH 7). La severidad de este coleo depende de la fabricación de la partícula.

- **Empaques poliméricos.**

Son empaques con altas uniones de usando como base estiren-divinilbenzeno o metacrilato, siendo compatibles con las presiones típicas en CLAR. Sin embargo, las presiones limite son muy bajas que las que soportan los empaques inorgánicos. La matriz de estiren-divinil benceno es muy hidrofóbica. Siendo compatible con todas las fases móviles, incluyendo las soluciones acuosas dentro de todo el rango de pH. Su compatibilidad con ácidos y bases fuertes es amplia por lo que su limpieza se hace con NaOH o ácidos fuertes. La matriz de metacrilato es intrínsecamente mas hidrofílica que la resina de estiren-divinilbenzeno, pudiéndose hacer mas hidrofóbica con las modificaciones apropiadas en los grupos funcionales (Waters)

La resina de metacrilato no es considerablemente estable como la resina de estiren-divinilbenzeno en los extremos de la escala de pH, pero todavía es lo bastante estable, que se pueden realizar lavados de la columna a pH 13. Todos los empaques poliméricos exhiben un aumento en el volumen y un acortamiento con un cambio en la fase móvil. Dado que los altos enlaces cruzados en los empaques usados para CLAR, el ensanchamiento y el acortamiento es limitado. Debido a la penetración de disolventes y pequeñas moléculas en la matriz polimérica, la transferencia de masa para las pequeñas moléculas es más lenta en los soportes poliméricos que en los empaques cerámicos. Esto lleva una baja eficiencia de separación (menos platos) para pequeñas moléculas. Para grandes moléculas unidas a proteínas o polímeros sintéticos, el funcionamiento de los empaques poliméricos es comparable a los empaque de base cerámica. Por consiguiente los empaques poliméricos son usados extensivamente en la separación de polímeros naturales y sintéticos. Como con los empaques a base de sílica, un amplio rango de superficie química es disponible para cromatografía en fase inversa, intercambio iónico, interacciones hidrofílicas, interacciones hidrofóbicas o exclusión por tamaño. Un beneficio de la base polimérica, es la ausencia de grupos silanol. En general, la forma del pico para analitos básicos es mejor a valores de pH neutros.

- **Híbridos.**

Pocos años atrás, los avances tecnológicos en la base del material han hecho la combinación las propiedades de sílice y polímeros en una partícula híbrida. Esta tecnología incorpora grupos metil (CH<sub>3</sub>-), como una parte de la sílice, entramado en la estructura del material, esto reduce el número de grupos silanol (Figura 12), esta modificación permite una mejora en la forma del pico para analitos básicos a pH 7. En suma, los grupos metil ayudan a proteger las partículas de un

alto valor de pH (pH 8-12) extendiendo la vida de la columna (Figura 13). La modificación de la superficie a través de uniones de ligandos, provee de materiales con excelentes propiedades en fase reversa (Waters)

Figura 12 Se muestra la reducción de los grupos silanol debido al cambio en el proceso de manufactura

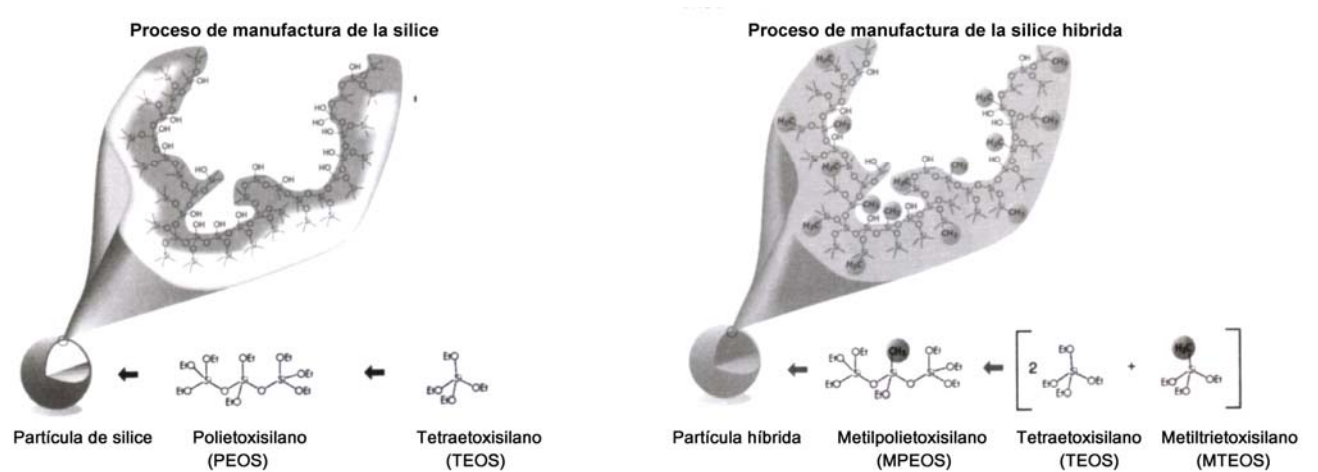
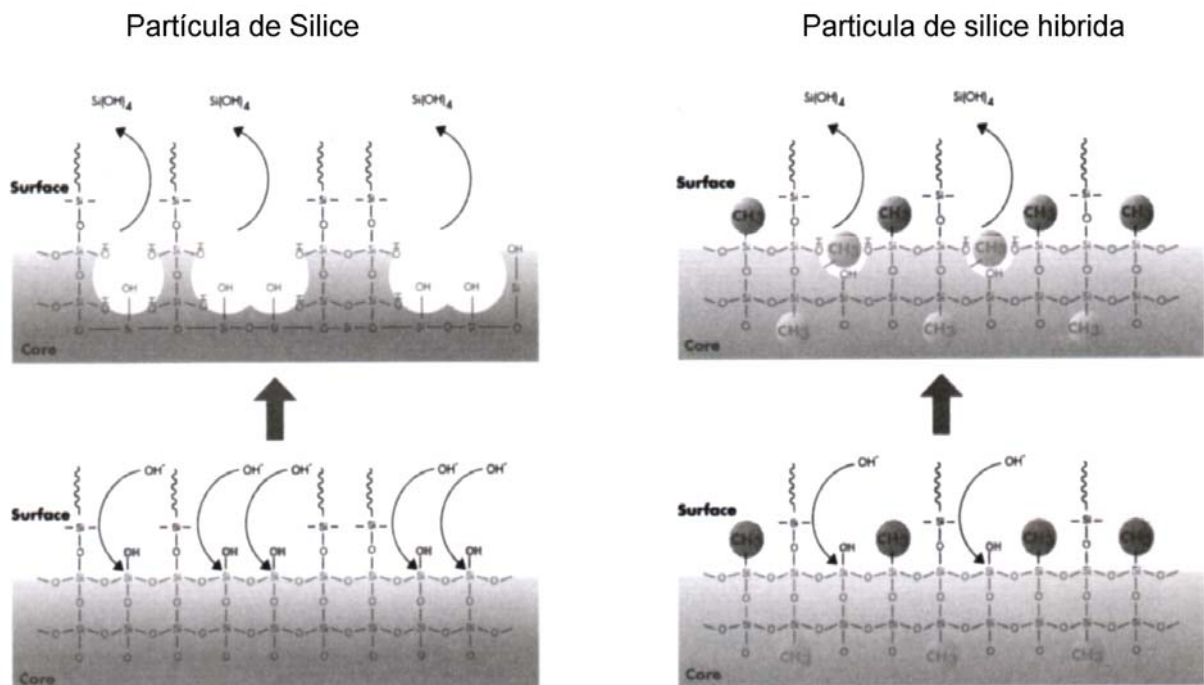


Figura 13 La presencia de los grupos metil siloxano da como resultado un incremento en la resistencia de la sílice a pH altos



- Sistema de detección

Instrumento que forma parte del sistema del cromatográfico en el que se detecta la presencia de un compuesto, proporcionando una señal electrónica al registrador o estación de datos de una computadora.

**Tabla 3.7 Características de algunos detectores para cromatografía de líquidos**

| Tipo  | Límite aproximado de detección <sup>(1)</sup> | Intervalo lineal aproximado <sup>(2)</sup> | Comentarios   |
|---|---|--|---|
| Absorción en el ultravioleta y el visible   | $10^{-11}$ g                                  | $10^4$ g                                   | Específico para compuestos que absorben luz   |
| Índice refractivo diferencial   | $10^{-9}$ - $10^{-10}$ g                      | $10^3$ g                                   | Detector universal. Mide cambios en el índice de refracción. No puede emplearse con gradientes  |
| Electroquímico: conductimétrico   | $10^{-8}$ g/ml <sup>(3)</sup>                 | $10^5$ g/ml                                | Detector específico. Pero que sirve para todos los iones  |
| Electroquímico: amperométrico   | $10^{-10}$ - $10^{-11}$ g                     | $10^5$ g                                   | Detector específico. El compuesto debe ser electroactivo  |
| Fluorescencia   | $10^{-14}$ g <sup>(4)</sup>                   | $10^5$ g                                   | Detector específico. El compuesto debe ser fluorescente   |
| Espectrometría de masas   | $10^{-7}$ - $10^{-9}$ g                       | $10^5$ <sup>(5)</sup> g                    | Detector universal. También puede emplearse para identificar analitos con alto grado de certeza |
| Dispersión de la luz de la solución   | $10^{-6}$ g/ml                                | $10^5$ g/ml                                | Véase la nota 6   |
| Dispersión de la luz evaporativa  | $10^{-9}$ g                                   | $10^6$ g <sup>(7)</sup>                    | Universal excepto para analitos volátiles. No da respuesta lineal                               |
| <p>1 Depende del ancho del pico. Valor para la medición sin preconcentración de la muestra. El límite inferior de su aplicación en cada caso es en el intervalo de trazas a ultratrazas</p> <p>2 De un detector (transductor+dispositivo electrónico) sin interferencias químicas presentes.</p> <p>3 Limitado por la conductancia inherente del eluyente.</p> <p>4 Valor para compuestos que flouescen fuertemente sin interferencias</p> <p>5 Para un instrumento sectorial. Los instrumentos de cuadrupolo, trampa de iones y transformada de Fourier son más angostos</p> <p>6 La dispersión luminosa se emplea para determinar los pesos moleculares de los polímeros (en el intervalo de 500 a <math>10^8</math> daltons) conforme se eluyen. Las concentraciones generalmente están muy por encima del límite de detección</p> <p>7 La respuesta es de la forma (constante*[analito]), de modo que la gráfica de calibración log-log es lineal</p> |   |  |   |

Fuente Rouessac Francis y Rouessac Annick, Análisis Químico

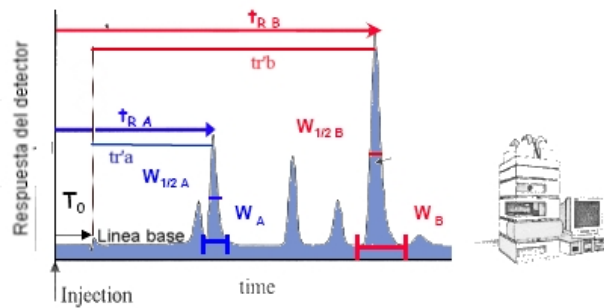
### 3.2.7 El cromatograma

Según la IUPAC se define como “un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente vs el volumen del efluente o tiempo” (Rouessac Francis, 2003)

El cromatograma (Figura 14) comienza en el momento en que es inyectada la muestra. A partir de ese momento se tienen varias señales, a continuación se describen algunas de ellas:

- 1) Línea base: Es la línea que aparece en el cromatograma cuando por el detector no pasa ningún compuesto que se pueda identificar.
- 2) Tiempo muerto ( $t_0$ ): Es el tiempo que tarda en eluir una muestra que no es retenida en la fase estacionaria.
- 3) Tiempo de retención ( $t_r$ ) Es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta el momento en que se obtienen el punto máximo de la señal o pico del compuesto.
- 4) Tiempo de retención ajustado: ( $t_r'$ ) Es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria, se calcula como la diferencia entre el  $t_r$  y el  $t_0$
- 5) Área del pico: Este parámetro permite determinar la concentración de cada componente separado en la fase estacionaria.
- 6) Ancho del pico: Es la medida que se puede tener del ancho en la base del pico ( $W_b$ ) a el ancho a la mitad de l pico ( $W_{1/2}$ )

Figura 14 Cromatograma y algunos parámetros de medición



### 3.3 Validación

La validación de métodos analíticos se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método analítico satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas y es parte fundamental de la técnica de análisis de control de calidad (Mercado, 2001).

Según la FDA la validación es el estableciendo de la evidencia documentada que proporciona un alto grado de seguridad en el que un determinado proceso puede producir un producto con especificaciones predeterminadas y con características de calidad de forma consistente <http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm> (18 de Junio 2006).

Según la comunidad europea el proceso de validación es la acción de proveer, en conformidad de los principios de buenas practicas de manufactura que cualquier procedimiento, equipo, proceso, material o actividad conduce hacia los resultados esperados (Mercado, 2001).

Según la NOM-059-SSA1-1993, es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

### 3.3.1 ¿Por qué validar un proceso?

Existen tres razones para que los procesos sean validados.

- Regulación Gubernamental
- Seguridad, Efectividad, Cantidad e Identidad (Aseguramiento de Calidad)
- Reducción de Costos
  
- **Regulación Gubernamental**

En México la SSA (Secretaría de Salubridad) se encarga de regular la validación, para esto se han emitido varias normas como la NOM-059-SSA1-1993 “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”.

- **Seguridad, Efectividad, Cantidad e Identidad (Aseguramiento de Calidad)**

Frecuentemente la validación de un proceso nos llevara al mejoramiento de la calidad, además de una mayor consistencia en la calidad, para dar una mayor eficiencia al proceso.

Las buenas prácticas de manufactura (GMP's) por sus siglas en ingles, y el proceso de validación son conceptos que no pueden ser separados, son esenciales para asegurar la calidad.

- **Reducción de costos**

La experiencia y el sentido común indican que el proceso de validación hace a un proceso más eficiente, el cuál produce menos rechazos, desperdicios, eliminación de tiempos muertos, etc. Por lo que la principal razón para validar es asegurar la calidad del producto y reducir costos.

### **3.3.2 Pasos de la validación**

La validación es un proceso que consiste en al menos cuatro pasos distintos; en la validación del Software y Hardware, cuales se verifica la capacidad de funcionamiento correcto de un equipo automatizado en conjunto, en la validación de sistema y el método se definen los requerimientos analíticos, y se confirma que la metodología bajo ciertas consideraciones tiene la capacidad de un funcionamiento compatible con la aplicación requerida

<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LTGDL&WT.svl=1> (18 Abril 2006)

- Validación de software
- Hardware (instrumentación) validación/calificación
- Validación del sistema
- Validación de método

El proceso comienza con la validación del software y la validación o *calificación* de un sistema que es llevada a cabo por parte de la empresa encargada de desarrollar el equipo. Entonces para validar un método se deberá utilizar un sistema calificado. Finalmente es una validación total, cuando hay una validación del sistema, siendo cada paso crítico para el éxito total del



proceso <http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LTGDL&WT.svl=1> (18 Abril 2006)

En la validación del método, es necesario invertir algún tiempo para asegurar que el sistema analítico esta *calificado*. La calificación es un subconjunto del proceso de validación que verifica previamente en forma modular y sistemáticamente el funcionamiento del sistema y del instrumento colocado en línea. Si el instrumento no esta calificado antes de su uso, y se encuentra un problema, la fuente del problema será difícil de identificar. En la figura 18, se muestra una línea de tiempo del proceso de validación en orden cronológico de los acontecimientos que ocurren

<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LTGDL&WT.svl=1> (18 Abril 2006)

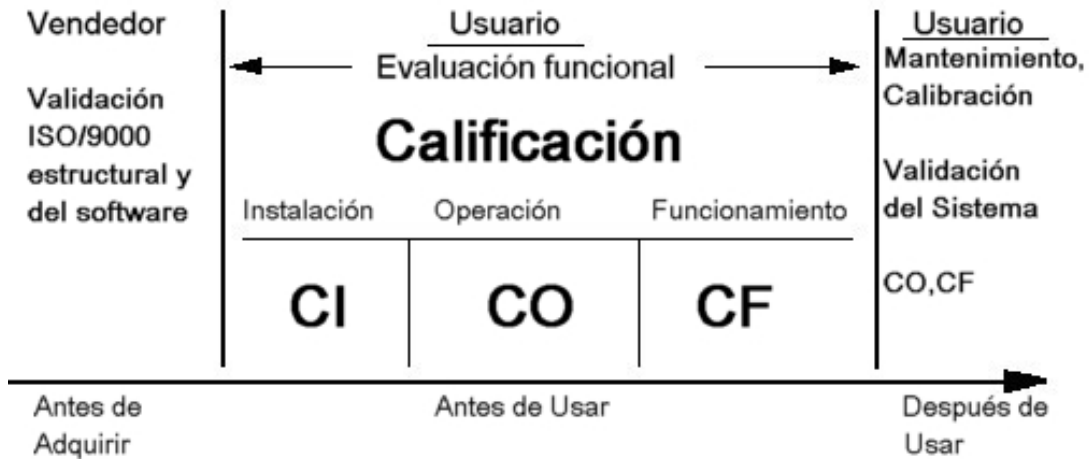
### 3.3.3 Calificación

Como es ilustrado en la figura 15, la validación comienza con el proveedor del sistema cromatográfico o etapa de validación estructural. Durante esta etapa, el instrumento y el software son desarrollados, diseñados y producidos en un ambiente validado según las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), Buenas Prácticas de la Fabricación (BPF), y la norma ISO 9000.

Durante la validación funcional o la etapa de calificación, se realiza la Calificación de Instalación (CI), la Calificación Operacional (CO), y la Calificación de Funcionamiento (CF). Después de que el instrumento es instalado en el laboratorio, y de un período de uso, requiere del

mantenimiento continuo de la calibración y la estandarización, a veces llamada Calificación de Mantenimiento (CM) o procedimientos de mantenimiento

Figura 15 El Cronograma de Validación del equipo



- **Calificación de Instalación (CI)**

El proceso de calificación de instalación (CI) puede ser dividido en dos pasos, *preinstalación* y *la instalación física*. La preinstalación, contempla en la revisión de de los manuales donde se debe contar con toda la información pertinente para la instalación, la operación y el mantenimiento adecuado del sistema. Se confirma especificaciones de ubicación y el recibo de todas las partes, piezas, manuales completos, etc., necesarios de realizar la instalación. Durante la instalación física, los números de serie del equipo son registrados, se revisa que la instalación eléctrica y las conexiones de comunicación sean las indicadas en el manual para el funcionamiento correcto del equipo y los componentes del sistema. Se debe elaborar un informe sobre la instalación de cada equipo, quien realizó la instalación, y otros detalles mixtos, la cuál deberá ser archivada.

- **Calificación Operacional (CO)**

El proceso de calificación operacional (CO) asegura que cada módulo del sistema funciona de acuerdo a los datos específicos definidos para la exactitud, la linealidad y la precisión. Este proceso puede ser tan simple como la verificación del módulo en diagnósticos de rutina o puede ser realizado con más profundidad controlando pruebas específicas para verificar, por ejemplo, la exactitud de longitud de onda de detector, el índice de flujo o la precisión de inyector.

- **Calificación de Funcionamiento (CF)**

El paso de Calificación de Funcionamiento (CF) verifica el funcionamiento de sistema. Las pruebas de CF son realizadas en condiciones de corridas reales de trabajo. En la práctica, sin embargo, CO y CF con frecuencia se mezclan, en particular para pruebas de linealidad y precisión (repetibilidad), que pueden ser realizadas más fácilmente en el nivel de sistema. Para CLAR, la prueba de CF deberá utilizarse un método con una mezcla de analitos, columna, y la fase móvil bien caracterizados. La documentación apropiada deberá ser archivada para apoyar el proceso de CF.

### **3.3.4 Métodos analíticos**

Los Métodos analíticos son usados para determinar la cantidad o la potencia de ingredientes activos, niveles de impurezas o degradación de productos, etc. La calidad de los métodos analíticos requiere la demostración apropiada de que cumple con linealidad, exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad y tolerancia del método. Desde que los métodos analíticos han sido usados en la calificación de otros componentes del proceso, su validación es una de las primeras tareas realizadas.

La validación de un método analítico, puede definirse, como el proceso mediante el cual queda establecido, después del tratamiento estadístico de una serie de experiencias en el laboratorio, que el método analítico es confiable para cuantificar, identificar y/o caracterizar una sustancia, cuando es llevado a cabo por personal capacitado, en cualquier momento. (González, 1999)

El tratamiento estadístico de los datos experimentales tiene como fin la obtención de valores numéricos de cada uno de los parámetros estadísticos que representan la medida del error del método analítico. Los valores de estos parámetros estadísticos experimentales deben ser comparados con criterios teóricos que aparecen en las especificaciones de las guías de validación. Se ha establecido que el método está validado, si los valores obtenidos experimentalmente son menores que los valores teóricos de las especificaciones.

El criterio de aceptación de los valores teóricos dependerá de la complejidad del método y de la matriz del producto alimenticio, debido a que estos contienen diversos compuestos que podrían interferir en la cuantificación del analito.

En el compendio de los procedimientos pueden variar enormemente las determinaciones analíticas para la evaluación de los atributos, considerando esta variabilidad de ensayos es lógica la diferencia de los métodos de las pruebas requeridas para la validación. Por lo que se han diversificado en varias categorías:

- Categoría I. Cuantificación del componente principal o principio activo (incluyendo conservadores).
- Categoría II. Determinación de impurezas o compuestos de degradación. Estos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas límite para su detección.

- Categoría III. Determinación de características de ejecución.

Para toda categoría se necesita diferente información analítica. En la tabla 3.8 se enlistan los elementos que se requieren normalmente para cada categoría.

**Tabla 3.8 Se enlistan las distintas categorías así como los elementos que se requieren para validación de métodos analíticos**

| Parámetro analítico                        | Categoría I | Categoría II |                   | Categoría III |
|--|-------------|--------------|-------------------|---------------|
|  |             | Cuantitativo | Pruebas<br>Limite |               |
| Exactitud                                  | Si          | Si           | *                 | *             |
| Precisión                                  | Si          | Si           | No                | Si            |
| Especificidad                              | Si          | Si           | Si                | *             |
| Limite de detección                        | No          | No           | Si                | *             |
| Limite de<br>Cuantificación                | No          | Si           | No                | *             |
| Linearidad                                 | Si          | Si           | No                | *             |
| Reproducibilidad<br>(precisión del método) | Si          | Si           | Si                | Si            |

Fuente: Mercado 2001

\*Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica

En el libro titulado “Validación de métodos analíticos”, se muestran los parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método (Tabla 3.9) (Mercado 2001).

Más que una simple medida del procedimiento, la validación del método es la medida de la ejecución del sistema analítico total. En otras palabras la investigación debe asegurar que el método, instrumentos, disolventes, reactivos, etc., utilizados durante el ensayo son adecuados para el análisis.

**Tabla 3.9 Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación de método**

| Parámetro                          | Control de Calidad | Indicadores de Estabilidad         |                       | Biodisponibilidad | Revalidación del Método                    |  |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------|--|--|
|                                    |                    | Bajas Concentraciones              | Altas Concentraciones |                   | Sin cambio en las condiciones de operación | Con cambio en las condiciones de operación |
|                                    |                    | Linealidad y Precisión del Sistema | X                     |                   | X  | X  |
| Limite de Cuantificación           |                    | X                                  |                       | X                 |  |  |
| Exactitud y Repetibilidad al 100%  |                    | X                                  |                       | X                 |  |  |
| Linealidad del Método              | X                  | X                                  | X                     | X                 | X  | X  |
| Precisión (reproducibilidad)       | X                  | X                                  | X                     | X                 |  | X  |
| Especificidad (control de calidad) | X                  | X                                  | X                     | X                 | X  | X  |
| Especificidad (estabilidad)        |                    | X                                  | X                     |                   |  |  |
| Tolerancia del sistema             |                    | X                                  | X                     | X                 |  | X  |
| Estabilidad de la muestra          | X                  | X                                  | X                     | X                 |  |  |

Fuente: Mercado 2001

### 3.3.5 Guía de Validación

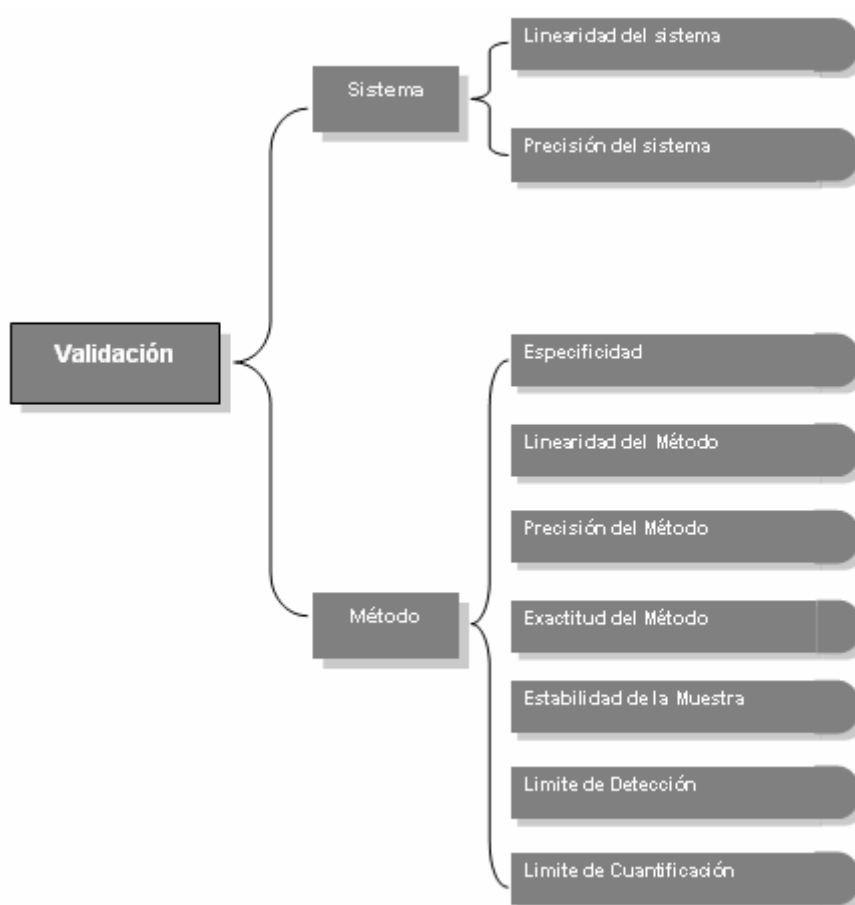
Según la FDA el protocolo de validación es un plan escrito que declara cómo la validación se dirigirá, incluso los parámetros de la prueba, características del producto, equipo de producción, y los puntos decisivos en lo que constituyen resultados de la prueba aceptables.

<http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm> (18 de Junio 2006)

La validación del método es el complemento para asegurar que una metodología analítica es exacta, específica, reproducible y confiable sobre las especificaciones de un compuesto que

será analizado durante su empleo normal. Los laboratorios regulados deben realizar la validación de método para estar en el cumplimiento con regulaciones como de la FDA.

La figura 16: Los pasos de la validación



- **Especificidad**

La especificidad es la capacidad de medir con exactitud el analito de interés en la presencia de otros componentes que pueden estar presentes en la matriz de la muestra. Es una medida del grado de interferencia de tales componentes como otros ingredientes activos, excipientes, impurezas, y productos de degradación, asegurando que una respuesta máxima está prevista a un único componente. Esto es que en un sistema cromatográfico no existan coeluciones con el analito de interés. La especificidad es medida y documentada en una separación por la

resolución, número de platos (la eficacia), y el factor de coleo. También el término especificidad se divide en dos categorías separadas: identificación, y pruebas de ensayo e impureza. En la tabla 3.10 se enlistan los parámetros y los límites recomendados para del análisis de una muestra.

**Tabla 3.10 Parámetros de especificidad y Recomendaciones**

| <b>Parámetro</b>         | <b>Recomendación</b>  |
|--------------------------|---|
| Factor de Capacidad (k') | El pico debería ser bien definido de otros picos y el volumen muerto, generalmente la $k' > 2.0$  |
| Retención relativa       | No esencial mientras la resolución es declarada.  |
| Resolución ( $R_s$ )     | $R_s > 2$ entre el pico de interés y el pico más cercano como interferencia (impureza, excipiente, producto de degradación, estándar interno, etc.) |
| Factor de coleo (T)      | $T \leq 2$  |
| Platos Teóricos (N)      | En general debería ser $> 2000$   |

Para objetivos de identificación, la especificidad es demostrada por la capacidad de discriminar entre los compuestos de estructuras estrechamente relacionadas o por la comparación a los materiales de referencia conocidos. Para el ensayo y pruebas de impureza, la especificidad es demostrada por la resolución de los dos compuestos de elusión más cercanos. Estos compuestos son por lo general el ingrediente principal o activo y algún otro que puede ser una impureza. Si las impurezas están presentes, debe ser demostrado que el ensayo no es afectado



por la presencia de materiales insertados (impurezas y/o excipientes)

<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit= JDRS-5LTGDL&WT.svl=1> (18

Abril 2006)

- **Linealidad del sistema**

La linealidad es la capacidad del sistema o del método de obtener los resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado. La linealidad generalmente está relacionada como la variación en la inclinación de la línea de regresión. El rango es el intervalo entre los niveles de concentración superiores e inferiores del analito que han sido establecidos para ser evaluado con la precisión, la exactitud y la linealidad en el método que se planea utilizar. El rango normalmente es expresado en las mismas unidades que los resultados de prueba obtenidos por el método. Para el ensayo, el mínimo del rango especificado es del 80-120 % de la concentración objetivo. Para una prueba de impureza, el rango mínimo es del nivel que hace un informe de cada impureza, al 120 % de la especificación.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración en función de la respuesta medida) utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. De los resultados obtenidos de la curva de calibración, se determinará el coeficiente de variación, el cuál deberá ser  $\leq 1.5\%$ , el valor de  $r \geq 0.99$  y  $r^2 \geq 0.98$  (Métodos Analíticos Validación, 2000)

- **Precisión del sistema**

La precisión se define como el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema. Los resultados de este ensayo deben tener un coeficiente de variación  $\leq 1.5\%$

Cálculos preliminares para el coeficiente de variación. (Métodos Analíticos Validación, 2000)

- **Linealidad del método**

Lo que se busca durante la realización de este paso es determinar que cantidad del analito que se inserta en el placebo es proporcional a la que se recupera después del tratamiento de extracción y cuantificación que se le da a la muestra. La forma de determinarlo es cuantificando la cantidad que se recupera del analito después de someterlo al mismo tratamiento que se le da a la muestra. La linealidad del método se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés a cuantificar (placebos cargados) cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%. De los resultados obtenidos se realizara una gráfica de cantidad adicionada *vs* cantidad recuperada en donde m debe ser similar a 1, b debe ser similar a 0,  $r^2$  debe ser similar a 0.98, el promedio de recobro deberá estar entre 98%-102% y el CV deberá ser  $\leq 2\%$ . (Métodos Analíticos Validación, 2000)

- **Exactitud del método**

La exactitud es la medida de puntualidad de un método analítico, o es una dispersión entre el valor que se acepta como un valor convencional, o un valor de la referencia y el valor obtenido (coeficiente de recobro). Lo que se busca durante la realización de este paso es determinar que cantidad del analito se recupera durante el tratamiento de extracción y cuantificación que se le da a la muestra. Es medido insertando muestras en un estudio ciego. Se determina de cuando en cuando, seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, aunque la FDA recomienda utilizar las concentraciones entre 80%, 100% y 120% <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf> (18 Junio 2006) utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. El promedio de recobro deberá ser de 98%-102% y el CV  $\leq$  2% de los resultados obtenidos. (Métodos Analíticos Validación, 2000)

- **Precisión del método**

La precisión es la medida del grado de repetibilidad de un método analítico en condiciones de operación normal y es expresada normalmente como el por ciento relativo de la desviación estándar para un número estadísticamente significativo de muestras. La precisión debería ser realizada en tres niveles diferentes: repetibilidad, precisión intermedia, y reproducibilidad. Repetibilidad son los resultados del método que funciona sobre un intervalo de tiempo corto en las mismas condiciones (precisión de inter-ensayo). La precisión intermedia son los resultados dentro de las variaciones acontecidas arbitrarias en el laboratorio como días diferentes, analistas distintos en el mismo equipo, etc.

La reproducibilidad se refiere a los resultados de estudios de colaboración entre laboratorios. La documentación en el apoyo de estudios de precisión y se determina de una muestra homogénea del producto cercano al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado. Los resultados obtenidos deben tener un Coeficiente de variación  $\leq 2\%$  (Métodos Analíticos Validación, 2000)

- **Estabilidad de la muestra analítica**

La estabilidad es la propiedad de de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en bajo ciertas condiciones, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

La muestra es estable si el intervalo de confianza al 95% para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial, incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda un porcentaje de  $\pm 2\%$ . (Métodos Analíticos Validación, 2000)

- **Límite de Detección del Método**

El Límite de Detección del Método (LDM) es definido como la concentración más baja de un analito en una muestra que puede ser detectado pero no cuantificado. Esta es una prueba de límite que especifica si realmente un analito esta por encima o debajo de un cierto valor. Esto es expresado como una concentración por una proporción, por lo general dos - " o tres a uno" de señal-o-ruido especificada.

Para determinar el Límite de Detección del Método (LDM) se elabora una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) en donde se analizaran cuando menos 5 soluciones estándar de concentraciones por triplicado,

Una vez establecido el valor máximo del analito se fijara el valor mínimo de la siguiente manera:

- a. Realizar tres curvas de calibración.
- b. Obtener la ecuación de cada curva de calibración.
- c. Calcular la desviación estándar (DE) de la respuesta mediante el uso de los tres valores de la ordenada al origen (b).
- d. Calcular la pendiente promedio de las tres curvas de calibración ( $\bar{m}$ ).
- e. Con los datos anteriores calcular el LDM mediante la siguiente ecuación:

$$\text{LDM} = 3.3 \times \left( \frac{\text{DE}}{\bar{m}} \right)$$

(Métodos Analíticos Validación, 2000)

- **Límite de Cuantificación del Método**

El Límite de cuantificación (LCM) es definido como la concentración más baja de un analito en una muestra que puede ser determinada con la precisión aceptable y la exactitud en las condiciones indicadas operacionales del método, no es necesaria su determinación cuando el analito a cuantificar es el que esta en mayor proporción y solo se requiere cuando se cuantifican elementos traza. Como LDM, LCM es expresado como la precisión y la exactitud de una medida de concentración. A veces una proporción "de diez a uno" de señal-o-ruido es usada determinar LCM. Esta proporción de señal-o-ruido es una buena regla básica, pero se debe recordar que la

determinación de LCM es una relación entre la concentración y la precisión requerida y la exactitud. Si una mejor precisión es requerida, una concentración más alta debe ser informada para el LCM.

Para determinar el Límite de Cuantificación del Método (LCM) se elabora una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) en donde se analizaran cuando menos 5 soluciones estándar de concentraciones por triplicado.

Una vez establecido el valor máximo del analito se fija el valor mínimo de la siguiente manera:

1. Realizar tres curvas de calibración.
2. Obtener la ecuación de cada curva de calibración.
3. Calcular la Desviación Estándar (DE) de la respuesta mediante el uso de los tres valores de la ordenada al origen (b).
4. Calcular la pendiente promedio de las tres curvas de calibración ( $\bar{m}$ ).
5. Con los datos anteriores calcular el límite de cuantificación del método (LCM) mediante la siguiente ecuación:

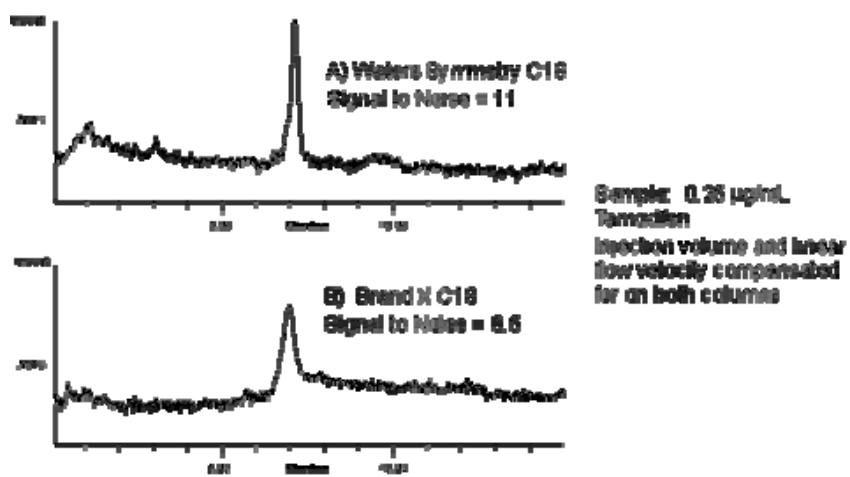
$$\text{LCM} = 10 \times \left( \frac{\text{DE}}{\bar{m}} \right)$$

Un detalle adicional también deberá ser considerado; que tanto el LCM como el LDM pueden ser afectados por el cromatógrafo. La figura 17 se muestra como la eficacia y la forma del pico puede afectar la proporción de señal-a-ruido

<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit= JDRS-5LTGDL&WT.svl=1> (18

Abril 2006)

Figura 17 Efecto de la forma del pico en el LDM/LCM



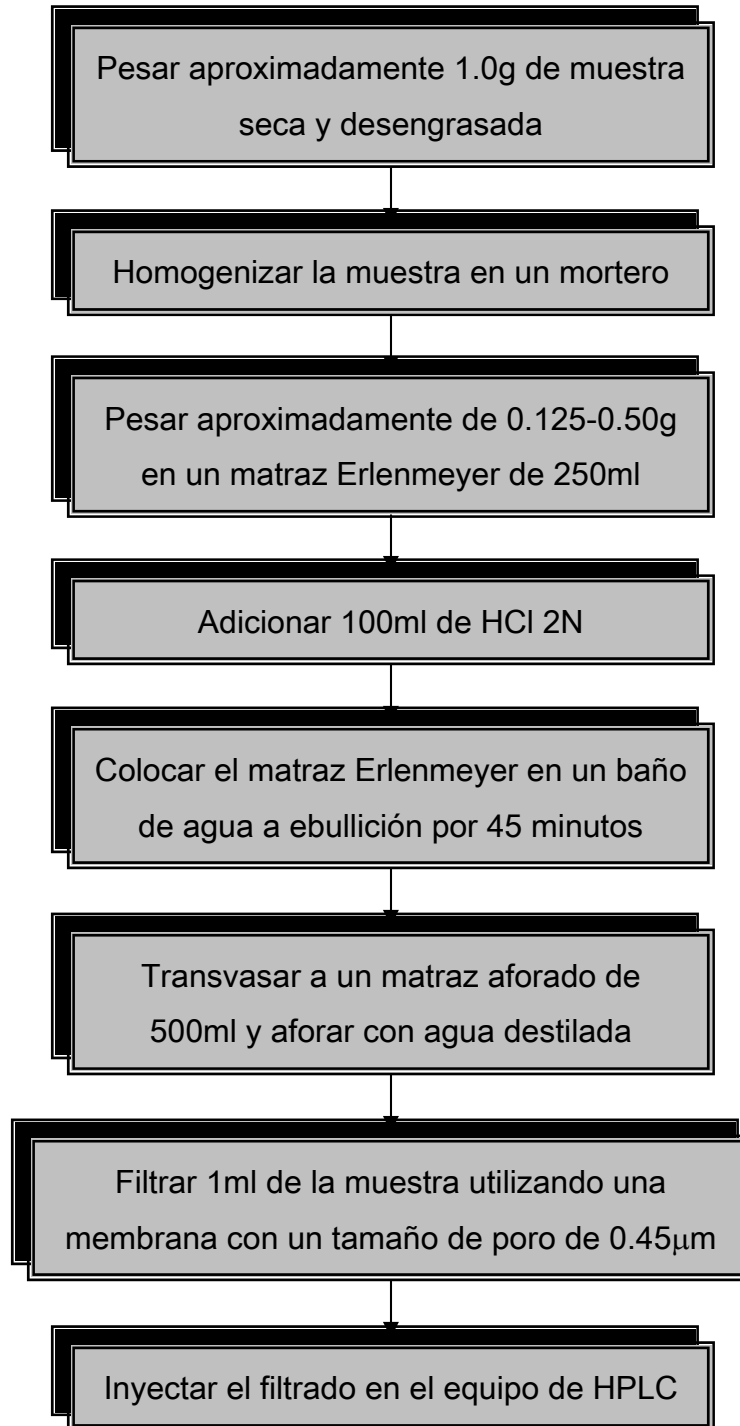
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tratamiento de la muestra

Para la cuantificación del ácido carmínico en la muestra de cochinilla de nopal se debe de realizar su extracción mediante una hidrólisis ácida como muestra en el siguiente diagrama. De una muestra de cochinilla de nopal, la cuál previamente se le ha eliminado la capa de fibrosa que la cubre y ha sido secada por el sol, es pesada en una cantidad aproximada de 1.0g y se homogeniza moliéndola en un mortero, esto se hace ya que los insectos son de diverso tamaño haciendo que el análisis sea más representativo de la muestra. De está muestra homogenizada se pesa 0.125-0.150g, se mezcla con 100 ml de HCl 2N en un matraz Erlenmeyer de 250ml y se coloca en un baño a ebullición durante 45 minutos. Se retira el matraz Erlenmeyer y se deja enfriar para después transvasarlo a un matraz aforado de 500 ml y se afora con agua destilada. Se filtra 1ml de la muestra utilizando una membrana de 0.45 $\mu$ m. Posteriormente este filtrado se analiza en el equipo de CLAR el cual se describe en el anexo 7.2.



### Diagrama de extracción del ácido carmínico



## 4.2 Condiciones de detección y análisis

Se registro el espectro de UV- Vis del ácido carmínico utilizando un espectrofotómetro UV-Vis marca GBC Modelo 911-A de un solo haz para determinar las longitudes máximas de absorción del compuesto, como se muestran en el espectro de absorción (Figura 22) en la sección de resultados y análisis de resultados.

Para asegurar que el ácido carmínico no eluye en el volumen muerto, se preparó una solución de ácido carmínico de 100 ppm en un matraz aforado de 200ml en la fase móvil A ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5%: $\text{H}_2\text{O}$  40:10:50), antes de aforar se le adiciono 1ml de acetona, ya que la acetona al ser un compuesto muy polar eluye antes que el ácido carmínico, ésta disolución se inyectó en el sistema cromatográfico bajo las condiciones que se señalan más adelante y se registro su cromatograma (figura 23) el cual se muestra en la sección de resultados.

El estándar de ácido carmínico (SIGMA 14205EB) (anexo 7.3) se disolvió en la fase móvil A ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5%: $\text{H}_2\text{O}$  40:10:50). Se empleo la técnica sugerida por Méndez, González et al., 2002 con algunas modificaciones, debido a que se utilizo una columna distinta (X-Brige® C18 de 50 mm de longitud y 3.0 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 3.5  $\mu\text{m}$  de forma esférica) a la que propone en su metodología. Así mismo se ajustaron los tiempos del gradiente que permiten la elusión del resto de los componentes que se encuentran en la muestra y eluyen después del ácido carmínico (Figura 24). }

## 4.3 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó analizando por triplicado soluciones estándar en un intervalo de concentración de 50 a 90ppm.

Para la curva patrón se peso 20.1mg de ácido carmínico y se aforó a un volumen de 100ml con la fase móvil A, obteniéndose una solución stock de 201ppm, de la solución se tomaron cinco alícuotas diferentes para preparar cinco soluciones estándar en un intervalo de 50ppm a 90ppm, las concentraciones finales de la solución se encuentran en la tabla 4.2, de los resultados obtenidos se encuentran en la tabal 5.2 y están representados en la gráfica 5.1, en el anexo 7.1 se describe como realizar el análisis estadístico y se muestran los resultados obtenidos en la tabla 5.3.

**Tabla 4.2 Preparación de la distintas diluciones para cada punto de la curva patrón**

| Concentración (ppm) | Volumen del Stock (ml) | Volumen de aforo (ml) |
|---------------------|------------------------|-----------------------|
| 90.45               | 4.5                    | 10                    |
| 80.40               | 4.0                    | 10                    |
| 70.35               | 3.5                    | 10                    |
| 60.3                | 3.0                    | 10                    |
| 50.25               | 2.5                    | 10                    |

#### 4.4 Precisión del sistema

Se calculó la precisión del sistema preparando dos soluciones estándar de concentraciones de 60ppm y 70ppm e inyectando estas por sextuplicado. Los valores de estas disoluciones se eligieron por ser partes medias de la curva patrón que se realizo.

Para las soluciones se peso 19.5mg de ácido carmínico y se aforo a un volumen de 100ml con fase móvil A obteniéndose una solución stock de 195ppm, de la cual se tomaron dos alícuotas, una de 3ml y otra de 3.5ml, se llevaron a un aforo de 10ml, obteniéndose una concentración final de 58.5ppm y 68.25ppm respectivamente. Los resultados de precisión para cada una de las soluciones estándar se encuentran en las tablas 5.4 y 5.6, en el anexo 7.1 se describe como

realizar el análisis estadístico y se muestran los resultados obtenidos en las tablas 5.5, 5.7 respectivamente para cada concentración.

#### **4.5 Linealidad del método**

Se determinó analizando tres placebos utilizando glucosa como vehículo con diferentes concentraciones de ácido carmínico que se encuentran dentro del intervalo de linealidad (placebos cargados) cada uno de manera independiente, los cuales se sometieron a las mismas condiciones de extracción y cuantificación que la muestra, haciéndose los análisis por triplicado. Los resultados de las concentraciones analizadas de los placebos cargados se representan en la gráfica 5.2 y en la tabla 5.8, en el anexo 7.1 se describe como realizar el análisis estadístico y se muestran los resultados obtenidos en la tabla 5.9.

#### **4.6 Exactitud del método**

Se determinó analizando seis placebos cargados con cantidades diferentes de ácido carmínico y haciendo un análisis por triplicado de cada uno, bajo las mismas condiciones de extracción y cuantificación que la muestra y por el mismo analista. Las concentraciones utilizadas están dentro del intervalo de 60-70ppm (valor denominado como el 100%) como se muestra en la tabla 5.10, en el anexo 7.1 se describe como realizar el análisis estadístico y se muestran los resultados obtenidos en la tabla 5.11.

#### **4.7 Precisión (Reproducibilidad)**

Se determinó la precisión con dos analistas con el mismo entrenamiento, donde cada uno preparó un placebo en dos días diferentes y analizándolo por triplicado. Tales placebos se sometieron a las mismas condiciones de extracción y cuantificación que la muestra. Los

resultados de esta prueba se encuentran en la tabla 5.12, 5.13, en el anexo 7.1 se describe como realizar el análisis estadístico y se muestran los resultados obtenidos en la tabla 5.14.

#### 4.8 Estabilidad de la muestra analítica

Para realizar la prueba se prepararon tres placebos, con una concentración cercana a los 60 ppm. Las cuales se almacenaron en condiciones de refrigeración en frasco de color ámbar, después de haber sido sometidas a las condiciones de extracción que la muestra. Se inyectaron por triplicado dentro del periodo de una semana. La preparación de las soluciones se encuentra en las tablas 4.3 mientras que los resultados de la prueba de estabilidad de la muestra, en el anexo 7.1 se describe como realizar el análisis estadístico y se muestran los resultados obtenidos en la tabla 5.15.

**Tabla 4.3 Preparación de las diluciones para determinar la estabilidad de la muestra**

| <b>Muestra</b>                          | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> |
|---|----------|----------|----------|
| <b>Cantidad de Ácido Carmínico (mg)</b> | 19.9     | 20.2     | 20.6     |
| <b>Volumen de aforo (l)</b>             | 0.1      | 0.1      | 0.1      |
| <b>Concentración (ppm)</b>              | 199      | 202      | 206      |
| <b>Diluciones</b>                       |          |          |          |
| <b>Volumen del Stock (ml)</b>           | 3        | 3        | 3        |
| <b>Volumen de aforo (ml)</b>            | 10       | 10       | 10       |
| <b>Concentración final (ppm)</b>        | 66.3     | 67.3     | 68.7     |

## 5 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Después de llevar a cabo la validación del método para la cuantificación del ácido carmínico, continuación se muestran los resultados obtenidos y su correspondiente análisis estadístico que nos permitirá corroborar si la metodología analítica propuesta confiable.

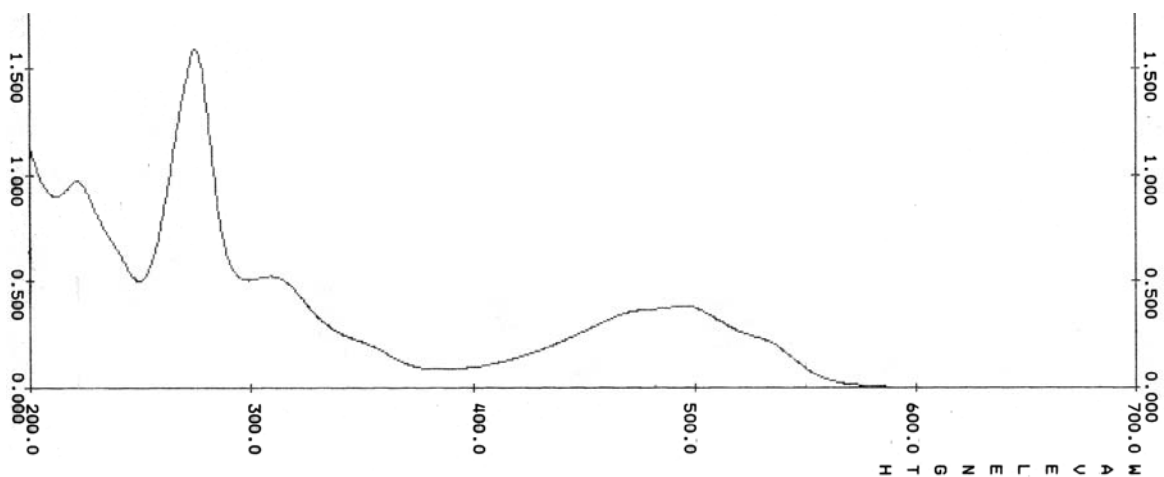
### 5.1 Condiciones de detección y análisis

En esta parte se llevo a cabo para determinar la máxima longitud de onda a la que absorbe el ácido carmínico.

Intervalo de longitud de onda: 200-700nm

Velocidad de barrido 250 nm/min

Figura 18 Espectro de absorción UV/Vis del ácido carmínico



En el espectro de absorción (figura 18) se observa que la  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción es de 275nm, lo cual coincide con lo propuesto en la bibliografía (Méndez, González et al., 2002) por lo que se decide llevar a cabo la validación con dicha longitud de onda.

En el cromatograma (figura 19), se observa que la acetona eluye primero que el ácido carmínico lo que indica que este compuesto está siendo retenido en la columna.

Figura 19 Cromatograma de la mezcla del ácido carmínico y acetona

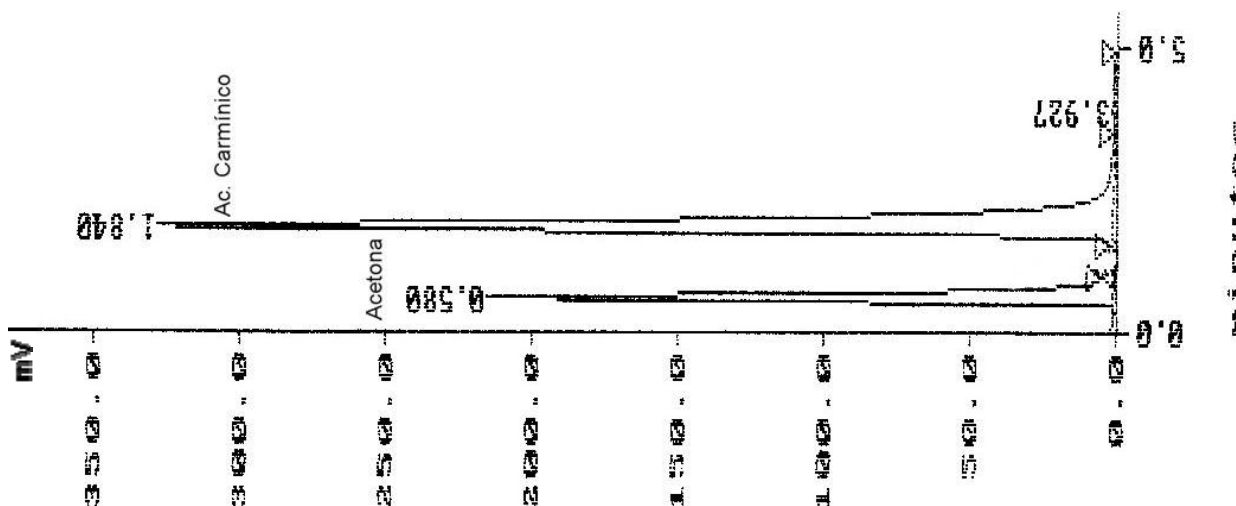


Tabla 5.1 Resultados de los tiempos de retención del ácido carmínico y la acetona

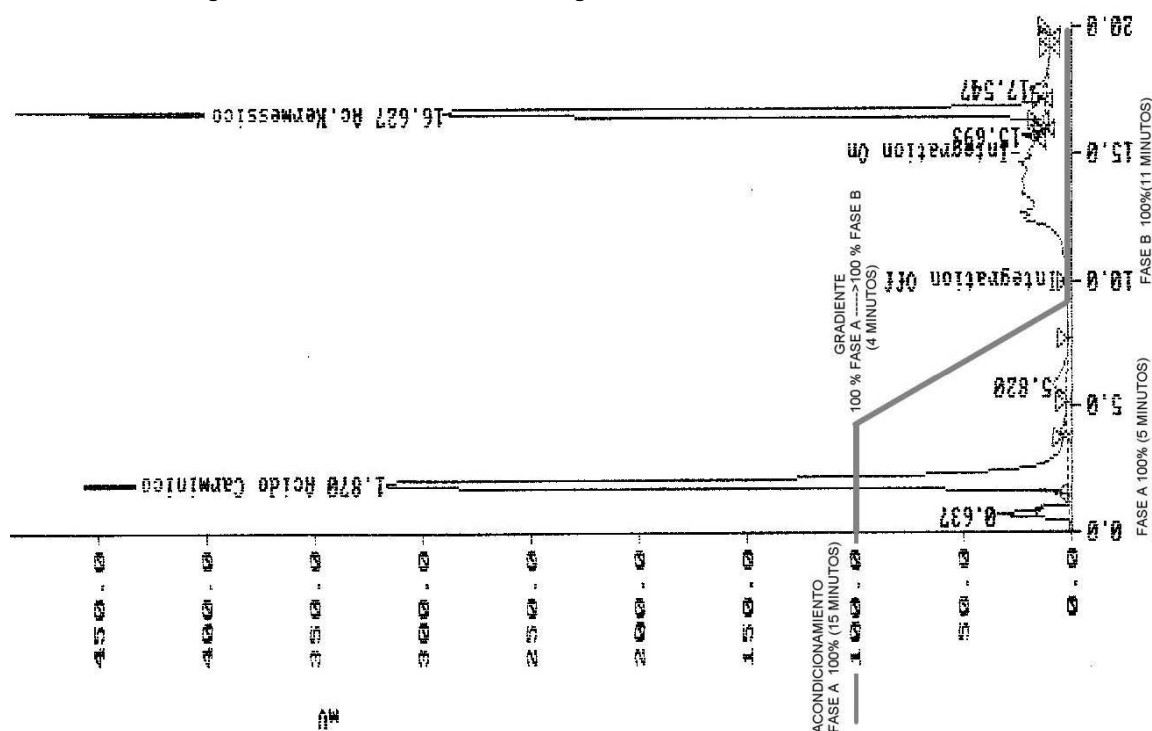
| Compuesto                 | tr (min.) | W (min) |
|---------------------------|-----------|---------|
| Acetona (t <sub>0</sub> ) | 0.580     | 0.610   |
| Ácido carmínico           | 1.840     | 0.463   |

Como se puede observar con los datos expuestos en la tabla 5.1, el sistema cromatográfico tiene una buena separación del ácido carmínico, con respecto a la acetona, siendo esta la que tiene menos afinidad por la fase estacionaria, garantizándonos que el ácido carmínico no eluye en el volumen muerto.

En el siguiente cromatograma (Figura 20) se muestra el análisis de un extracto de cochinilla donde se observa la elusión de otros componentes precursores del ácido carmínico, como el ácido kermessico, mediante el uso de la fase móvil B. Aunque para cuantificar el ácido carmínico solo se necesita la fase móvil A para hacerlo eluir, hay que tomar en cuenta que

cuando se trabaja con la muestra de cochinilla quedan en la columna otros compuestos entre los que se encuentran los precursores del ácido carmínico; que si no eluyen provocan la pérdida de resolución de la columna debido a que se satura el grupo funcional octadecil  $[-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3]$ . Por lo que se hace necesario el uso de la fase móvil B ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4$  al 5%: $\text{H}_2\text{O}$  90:10:0). El flujo fue de 0.5 ml/min, menor que al propuesto, para evitar que la presión ejercida por la fase móvil en el sistema superara los 3000 psi, siendo esta presión la que recomienda el fabricante de la columna no sobrepasar.

Figura 20 Se muestra el cromatograma de una muestra de cochinilla



## 5.2 Linearidad del sistema

Con este primer paso lo que se intenta demostrar es que la propiedad medida (concentración) es directamente proporcional a la respuesta obtenida (área) mediante el cálculo de  $r$  y  $r^2$  que deben de ser cercanos al valor de 1 el cual indica que la curva de calibración es lineal.



Tabla 5.2 Datos de la curva patrón del ácido carmínico

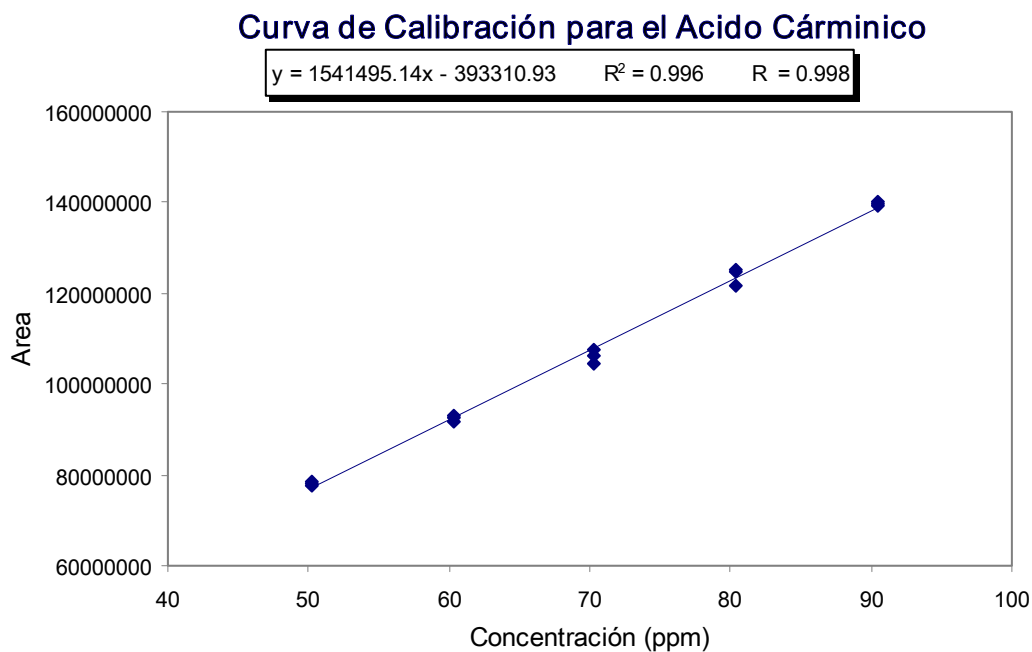
| Concentración (ppm) | Área      | F (Área/Concentración) |
|---------------------|-----------|------------------------|
| 90.45               | 139218512 | 1539176.47             |
| 90.45               | 139668336 | 1544149.65             |
| 90.45               | 140310608 | 1551250.50             |
| 80.40               | 121666608 | 1513266.27             |
| 80.40               | 124903552 | 1553526.77             |
| 80.40               | 125361824 | 1559226.67             |
| 70.35               | 106149840 | 1508881.88             |
| 70.35               | 107690240 | 1530778.11             |
| 70.35               | 104356248 | 1483386.61             |
| 60.30               | 92852032  | 1539834.69             |
| 60.30               | 92525480  | 1534419.24             |
| 60.30               | 91931000  | 1524560.53             |
| 50.25               | 77627952  | 1544834.87             |
| 50.25               | 78189392  | 1556007.80             |
| 50.25               | 78311456  | 1558436.94             |

Tabla 5.3 Análisis estadístico para el cálculo del coeficiente de variación  $r^2$  y  $r$

|             |                       |              |                       |              |          |
|-------------|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|----------|
| $\bar{F}$   | 1536115.80            | $\Sigma F$   | 23041737.00           | $\Sigma F^2$ | 3.54E+13 |
| N           | 15                    | DE           | 21268.77              | CV           | 1.38     |
| $\Sigma x$  | 1055.25               | $\Sigma x^2$ | 77266.91              | T            | 5        |
| $\Sigma y$  | 1620763080            | $\Sigma y^2$ | $1.82 \times 10^{17}$ | n            | 3        |
| $\Sigma xy$ | $1.19 \times 10^{11}$ | $r^2$        | 0.996                 | r            | 0.998    |

En este caso el estándar de ácido carmínico presentó un comportamiento casi lineal dentro de un intervalo de 50 a 90ppm, tales resultados se observan en la tabla 5.2 y en la gráfica 5.1 en donde los valores de  $r$  y  $r^2$  son del orden de 0.99, muy cercanos al valor de 1, Esta linealidad de 1 no se cumple debido a que se obtiene un coeficiente de variación de 1.38% lo que nos indica la desviación que hay entre la propiedad medida/respuesta obtenida entre cada análisis que se realizo para la curva de calibración.

Grafica 5.1 Regresión lineal de la curva de calibración del ácido carmínico



### 5.3 Precisión del sistema

En el desarrollo de este paso de la validación se utilizaron dos concentraciones intermedias de la curva de calibración (60 y 70ppm)

Tabla 5.4 Datos obtenidos del análisis de la solución estándar de ácido carmínico (60ppm)

| Concentración | Área     |
|---------------|----------|
| 58.50         | 87952112 |
| 58.50         | 88900640 |
| 58.50         | 89363864 |
| 58.50         | 90149776 |
| 58.50         | 87715360 |
| 58.50         | 88395880 |

Tabla 5.5 Análisis estadístico para el cálculo del coeficiente de variación de la solución estándar de ácido carmínico (60ppm)

|              |             |           |          |    |           |
|--------------|-------------|-----------|----------|----|-----------|
| $\Sigma y$   | 532477632   | N         | 6        | DE | 915567.26 |
| $\Sigma y^2$ | 4.72596E+16 | $\bar{y}$ | 88746272 | CV | 1.03      |

**Tabla 5.6 Datos obtenidos del análisis de la solución estándar de ácido carmínico (70 ppm) y su respectivo análisis estadístico para el cálculo del coeficiente de variación**

| Concentración | Área      |
|---------------|-----------|
| 68.25         | 98847888  |
| 68.25         | 99886424  |
| 68.25         | 98300456  |
| 68.25         | 100602840 |
| 68.25         | 100572104 |
| 68.25         | 100353576 |

**Tabla 5.7 Análisis estadístico para el cálculo del coeficiente de variación de la solución estándar de ácido carmínico (70ppm)**

|              |             |           |          |    |           |
|--------------|-------------|-----------|----------|----|-----------|
| $\Sigma y$   | 598563288   | N         | 6        | DE | 969579.58 |
| $\Sigma y^2$ | 5.97177E+16 | $\bar{y}$ | 99760548 | CV | 0.97      |

Como se puede observar en las Tablas 5.5 y 5.7 se demostró que la variación de la propiedad medida (area) entre repeticiones del mismo estándar concuerdan entre si con un coeficiente de variación de 1.03% para la concentración de 60ppm y 0.97% para la concentración de 70ppm por lo que el método es exacto.

#### **5.4 Linealidad del método**

Lo que se busco durante la realización en este punto de la validación, es determinar que cantidad del analito que se inserto en el placebo fue proporcional a la que se recupero después del tratamiento de extracción y cuantificación que se le dio al estándar del ácido carmínico.

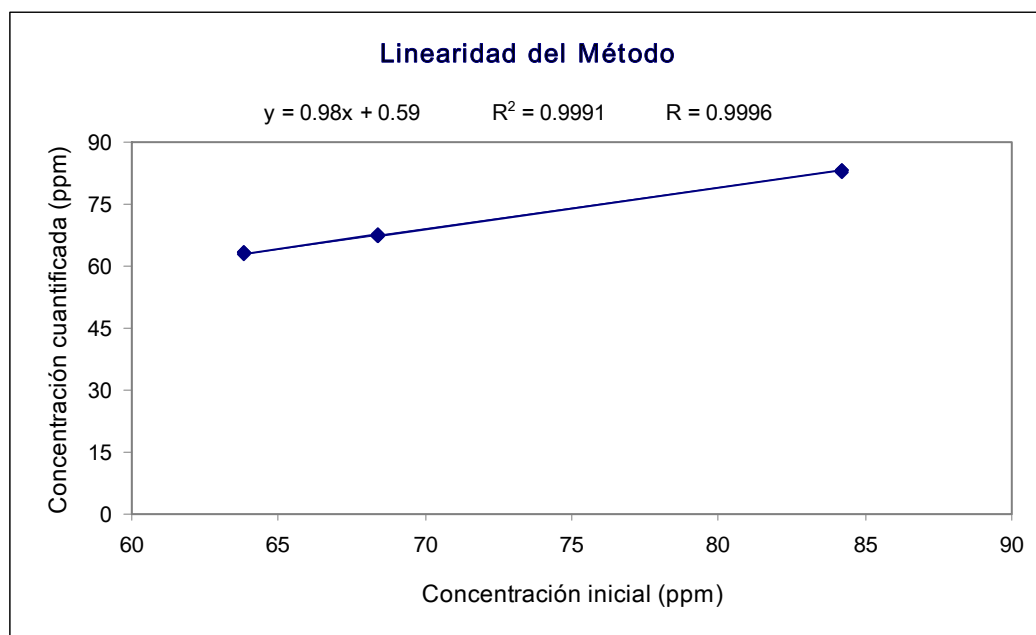
Tabla 5.8 Concentraciones analizadas de los placebos cargados que encuentran dentro del intervalo de linealidad del sistema

| Concentración inicial (ppm) | Concentración final (ppm) | Áreas     | Por ciento Recuperado |
|-----------------------------|---------------------------|-----------|-----------------------|
| 63.8                        | 63.28                     | 97153104  | 99.19                 |
| 63.8                        | 63.18                     | 97007312  | 99.04                 |
| 63.8                        | 63.10                     | 96880352  | 98.91                 |
| 68.4                        | 67.70                     | 103956400 | 98.97                 |
| 68.4                        | 67.20                     | 103205960 | 98.26                 |
| 68.4                        | 67.26                     | 103285456 | 98.33                 |
| 84.2                        | 83.08                     | 127686696 | 98.68                 |
| 84.2                        | 83.44                     | 128234752 | 99.10                 |
| 84.2                        | 82.68                     | 127051096 | 98.19                 |

Tabla 5.9 Análisis estadístico de la linealidad del método

|              |          |           |        |
|--------------|----------|-----------|--------|
| $\Sigma x$   | 649.2    | m         | 0.98   |
| $\Sigma x^2$ | 23757.96 | b         | 0.59   |
| $\Sigma xy$  | 23452.16 | r         | 0.9996 |
| $\Sigma y$   | 640.92   |           |        |
| $\Sigma y^2$ | 23150.6  | $\bar{R}$ | 98.74  |
| n            | 3        | DE        | 0.39   |
| t            | 3        | CV        | 0.39   |

Gráfica 5.2 Cantidad de Acido carnínico recuperada de ácido carnínico.



Los resultados obtenidos, se muestran en la tabla 5.8 con el coeficiente de recobro para cada concentración de trabajo, en la gráfica 5.2 se observa una pendiente  $m= 0.98$  y  $b= 0.59$  estos valores nos indican que la concentración final es muy similar a la concentración inicial, por lo que no hay una gran pérdida de la muestra indicándonos que el sistema es lineal, el análisis estadístico se muestra en la tabla 5.9, teniendo un coeficiente de variación de 0.39%.

### 5.5 Exactitud del método

En la realización de este paso se logro determinar que la cantidad que se recupera del placebo de ácido carmínico durante el tratamiento de extracción y de cuantificación que se le daría una muestra de cochinilla de nopal expresado como coeficiente de recobro.

**Tabla 5.10 Resultados obtenidos para la exactitud del método**

| <b>Datos del Stock</b>           |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                  | <b>Placebo 1</b> | <b>Placebo 2</b> | <b>Placebo 3</b> | <b>Placebo 4</b> | <b>Placebo 5</b> | <b>Placebo 6</b> |
| Acido Carmínico (mg)             | 22.40            | 22.30            | 23.40            | 23.10            | 22.40            | 21.20            |
| Volumen de aforo (l)             | 0.10             | 0.01             | 0.10             | 0.10             | 0.10             | 0.10             |
| Concentración (ppm)              | 224              | 223              | 234              | 231              | 224              | 212              |
| <b>Datos de la dilución</b>      |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| Volumen del Stock (ml)           | 3                | 3                | 3                | 3                | 3                | 3                |
| Volumen de aforo (ml)            | 10               | 10               | 10               | 10               | 10               | 10               |
| Concentración inicial (ppm)      | 67.20            | 66.90            | 70.20            | 69.30            | 67.20            | 63.60            |
| <b>Áreas obtenidas</b>           |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|                                  | 102285360        | 101528424        | 106817432        | 104684472        | 102716626        | 97153104         |
|                                  | 102555504        | 103624776        | 108265440        | 105835448        | 103148224        | 99007312         |
|                                  | 102645448        | 101003208        | 107369056        | 106667015        | 105094248        | 96880352         |
| <b>Concentración final (ppm)</b> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|                                  | 66.60            | 66.12            | 69.54            | 68.16            | 66.90            | 63.27            |
|                                  | 66.78            | 67.47            | 70.50            | 68.91            | 67.17            | 64.47            |
|                                  | 66.84            | 65.79            | 69.90            | 69.45            | 68.43            | 63.09            |
| <b>Por ciento recuperado (R)</b> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|                                  | 99.12            | 98.83            | 99.07            | 98.36            | 99.54            | 99.50            |
|                                  | 99.38            | 100.87           | 100.41           | 99.44            | 99.95            | 101.39           |
|                                  | 99.47            | 98.32            | 99.58            | 100.22           | 101.83           | 99.22            |

Tabla 5.11 Análisis estadístico para la exactitud del método

|              |           |           |       |    |      |
|--------------|-----------|-----------|-------|----|------|
| $\Sigma R$   | 1794.50   | N         | 18    | DE | 0.95 |
| $\Sigma R^2$ | 178917.00 | $\bar{R}$ | 99.69 | CV | 0.95 |

En los resultados obtenidos se observa que hay una pérdida de 0.31% del analito siendo este valor aceptable para la validación

### 5.6 Precisión (Reproducibilidad)

Tabla 5.12 Se muestran los resultados obtenidos por el analista uno en dos días diferentes

|                            |              |            |
|----------------------------|--------------|------------|
| <b>Analista 1</b>          |              |            |
| <b>Día 1</b>               |              |            |
| Glucosa (mg)               | 90.5         |            |
| Ácido Carmínico (mg)       | 30.4         |            |
| Volumen de aforo (l)       | 0.5          |            |
|                            |              |            |
| <b>Concentración (ppm)</b> | <b>Áreas</b> | <b>F</b>   |
| 60.8                       | 94210472     | 1549514.34 |
| 60.8                       | 93747856     | 1541905.53 |
| 60.8                       | 90680528     | 1491456.05 |
| <b>Promedio</b>            | 1527625.31   |            |
| <b>Desviación Estándar</b> | 31553.68     |            |
| <b>% CV</b>                | 2.07         |            |
| <b>Analista 1</b>          |              |            |
| <b>Día 2</b>               |              |            |
| Glucosa (mg)               | 90.4         |            |
| Ácido Carmínico (mg)       | 28.4         |            |
| Volumen de aforo (l)       | 0.5          |            |
|                            |              |            |
| <b>Concentración (ppm)</b> | <b>Áreas</b> | <b>F</b>   |
| 56.8                       | 89853728     | 1581931.83 |
| 56.8                       | 88067816     | 1550489.72 |
| 56.8                       | 88351832     | 1555490    |
| <b>Promedio</b>            | 1562637.18   |            |
| <b>Desviación Estándar</b> | 16895.66     |            |
| <b>% CV</b>                | 1.08         |            |

Tabla 5.13 Se muestran los resultados obtenidos por el analista dos en dos días diferentes

|                            |              |            |
|----------------------------|--------------|------------|
| <b>Analista 2</b>          |              |            |
| <b>Día 1</b>               |              |            |
| Glucosa (mg)               | 90.1         |            |
| Ácido Carmínico (mg)       | 29.6         |            |
| Volumen de aforo (l)       | 0.5          |            |
|                            |              |            |
| <b>Concentración (ppm)</b> | <b>Áreas</b> | <b>F</b>   |
| 59.2                       | 92715872     | 1566146.49 |
| 59.2                       | 92066880     | 1555183.78 |
| 59.2                       | 88067816     | 1487632.03 |
| <b>Promedio</b>            | 1536320.77   |            |
| <b>Desviación Estándar</b> | 45520.47     |            |
| <b>% CV</b>                | 2.77         |            |
| <b>Analista 1</b>          |              |            |
| <b>Día 2</b>               |              |            |
| Glucosa (mg)               | 90.2         |            |
| Ácido Carmínico (mg)       | 29.8         |            |
| Volumen de aforo (l)       | 0.5          |            |
|                            |              |            |
| <b>Concentración (ppm)</b> | <b>Áreas</b> | <b>F</b>   |
| 59.6                       | 91584016     | 1536644.56 |
| 59.6                       | 93062632     | 1561453.56 |
| 59.6                       | 91516336     | 1535508.99 |
| <b>Promedio</b>            | 1544535.70   |            |
| <b>Desviación Estándar</b> | 14662.29     |            |
| <b>% CV</b>                | 0.95         |            |

**Tabla 5.14 Se muestran el análisis estadístico correspondiente a la precisión del método**

|              |             |           |            |    |          |
|--------------|-------------|-----------|------------|----|----------|
| $\Sigma F$   | 18513356.88 | N         | 18         | DE | 27984.52 |
| $\Sigma F^2$ | 2.85706E+13 | $\bar{F}$ | 1542779.74 | CV | 1.81     |

Lo que se trata de demostrar en este punto es la confiabilidad y variabilidad en los resultados del método al ser desarrollado por otra persona que este familiarizado con el uso del equipo de CLAR y la técnica utilizada, obteniéndose en esta parte de la validación un CV de 1.8 %. Se puede observar que el coeficiente de variación es menor en el segundo día en ambos analistas debido a se adquiere experiencia y practica durante el primer día y se ve reflejado en el segundo día de análisis. Aunque el primer analista muestra un mejor manejo de la metodología en el primer día ya que tiene un CV menor que el segundo analista en el primer día, es claro que ambos en el segundo día muestran un manejo similar en la metodología ya que el coeficiente de variación en ambos es muy similar.

### 5.7 Estabilidad de la muestra analítica

**Tabla 5.15 Resultados y análisis estadístico de la estabilidad de la muestra**

|                               | Lectura Inicial | 2° día                    | 5° día                    | 7° día                    |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Muestra 1</b>              | 92715464        | 90774168                  | 90686654                  | 90612576                  |
| <b>Muestra 2</b>              | 94077640        | 93833576                  | 93774218                  | 93766728                  |
| <b>Muestra 3</b>              | 95645704        | 97845056                  | 97732476                  | 95222384                  |
| <b>Promedio</b>               | 94146269.3      | 94150933.33               | 94064449.33               | 93200562.67               |
| <b>Varianza</b>               | 2.1501E+12      | 1.25749E+13               | 1.24741E+13               | 5.55299E+12               |
| <b>Varianza Ponderada</b>     |                 | 4.90834E+12               | 4.87473E+12               | 2.5677E+12                |
| <b>Intervalo de confianza</b> |                 | 5178201.22<br>-5168873.22 | 5073974.96<br>-5237614.96 | 2796196.24<br>-4687609.57 |
| <b>Factor I</b>               |                 | 97.90                     | 97.81                     | 97.73                     |
|                               |                 | 99.74                     | 99.68                     | 99.67                     |
|                               |                 | 102.30                    | 102.18                    | 99.56                     |
| <b>Promedio (I)</b>           |                 | 99.98                     | 99.89                     | 98.98                     |

El objetivo de este punto es determinar la estabilidad de que tiene el ácido carmínico al ser expuesto a las condiciones de tratamiento químico durante el proceso de extracción y cuantificación.

De los resultados obtenidos podemos decir que el ácido carmínico es lo suficientemente estable al tratamiento químico y a las condiciones de almacenamiento mencionadas, ya que el IC se incluye el valor de cero y la media para el factor I se encuentra entre el 99.98 y 98.98 % hasta el séptimo día por lo que el tratamiento de extracción y cuantificación del pigmento es adecuada.



## 6 CONCLUSIONES

Los objetivos particulares y generales se cumplen satisfactoriamente cumpliendo con los parámetros que se exigen para validar la técnica para la cuantificación de ácido carmínico por CLAR.

- En la evaluación de linealidad del sistema, se logro demostrar que el intervalo de concentración entre 50-90 ppm tiene un comportamiento lineal ya que se obtuvo un valor del coeficiente de correlación de 0.99, además de que el coeficiente de variación nos indica que la variación existente entre la concentración/área obtenida dentro los distintos puntos del sistema lineal es del 1.38% siendo menor al valor que se exige en una validación (1.5%).
- En la evaluación de la precisión del sistema se determino que la repetición de un análisis de la misma concentración, tiene una variación de aproximadamente el 1% entre cada análisis siendo menor al valor máximo que se pide (1.5%).
- En la evaluación correspondiente a la linealidad del método se demuestra que no existen grandes pérdidas de ácido carmínico al tratamiento de la muestra, esto se observa cuando se obtiene el coeficiente de recobro (aproximadamente de 99% para las tres concentraciones de trabajo), el cuál tuvo un coeficiente de variación de 0.393%.
- En la evaluación de la exactitud del método se puede decir que hay una concordancia del 99.69% (con un CV del 0.95%) entre las mediciones obtenidas experimentalmente y los valores teóricos para las concentraciones con las que se trabajaron.
- En la evaluación de precisión del método se demostró la confiabilidad y variabilidad en los resultados del método al ser desarrollado por cualquier persona que este capacitada

con el uso del equipo de CLAR y la técnica desarrollada obteniéndose una variación entre los resultados reportados por los dos analistas del 1.8%.

- En la evaluación de estabilidad de la muestra se logro demostrar que el ácido carmínico permanece estable al ser expuesto bajo las mismas condiciones de tratamiento químico que la muestra y a las condiciones de almacenamiento en un periodo de siete días en refrigeración, ya que el intervalo de confianza se incluye el valor de cero y la media para el factor I se encuentra entre el 99.98% y 98.98% para las muestras trabajadas.
- Con los resultados obtenidos se puede decir que el método propuesto para la cuantificación del ácido carmínico es confiable ya que se ha demostrado que mientras se trabaje dentro de un intervalo lineal, el sistema tendrá variaciones de aproximadamente el 1% en todos sus puntos y ser preciso entre las repeticiones de las lecturas de la misma concentración con una variación del 1.03%
- En cuanto al método se demuestra que es lineal y exacto, ya que se recupera un 99% del ácido carmínico al ser sometido al método de extracción utilizado, además de que se demostró su estabilidad hasta el séptimo día en condiciones de refrigeración.
- Es posible que una persona que este familiarizada con el uso del equipo para CLAR pueda realizar la extracción y cuantificación del pigmento con una variación del 1.8% del resultado obtenido en comparación con el de otro analista.

## 7 ANEXO

### 7.1 Cálculos

Cálculo de m, b, r y r<sup>2</sup> para linealidad del sistema y linealidad del método

$$r = \sqrt{\frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

$$m = \frac{nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{nt(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - m(\sum x)}{nt}$$

Donde:

- n= Número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón
- t= Número de diluciones (concentraciones)
- x= Concentración de la dilución de solución de la curva patrón
- y= Propiedad medida (Área)
- m= pendiente de la recta
- b= ordenada al origen

## Cálculo del coeficiente de variación (CV) para linealidad del sistema y precisión del método

$$F = \frac{y}{x}$$

$$\bar{F} = \frac{\sum F}{N}$$

$$DE = \sqrt{\left[ \frac{N(\sum F^2) - (\sum F)^2}{N(N-1)} \right]}$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \times 100$$

Donde:

- y= Propiedad medida (Área)
- x= Concentración de la dilución de solución de la curva patrón
- F= Factor de respuesta
- $\bar{F}$  = Media de F
- N= Número de puntos de la linealidad del sistema
- DE= Desviación estándar

## Cálculos del coeficiente de variación CV para precisión del sistema

$$DE = \sqrt{\left[ \frac{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}{N(N-1)} \right]}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{N}$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

Donde:

N= Número de replicaciones de la propiedad medida

y= Propiedad medida

$\bar{y}$  = Media de y

DE= Desviación estándar

## Cálculo del coeficiente de variación (CV) y recobro (R) para linealidad y exactitud del método

$$R = \frac{y}{x} \times 100$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{N}$$

$$DE = \sqrt{\left[ \frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right]}$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{R}} \times 100$$

Donde:

x= Cantidad adicionada

y= Cantidad recuperada

R= Por ciento de recobro

$\bar{R}$  = Media del por ciento de recobro

DE= Desviación estándar

N= Número de total de determinaciones

## Cálculos para estabilidad de la muestra analítica

|                                     |             |   |   |   |
|-------------------------------------|-------------|---|---|---|
| Media para cada<br>condición/tiempo | $\bar{Y}_0$ | $\bar{Y}_1$   | $\bar{Y}_2$   | $\bar{Y}_m$   |
| Varianza                            | $S_0^2$     | $S_1^2$   | $S_2^2$   | $S_m^2$   |
| Varianza<br>ponderada               |             | $Sp_1^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(c+1)}$   | $Sp_2^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c+1)}$   | $Sp_m^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_m^2}{2(c+1)}$   |
| Intervalo de<br>confianza           |             | $(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_0) \pm t^* \times \sqrt{Sp_1^2 \left[ \frac{2}{3} \right]}$ | $(\bar{Y}_2 - \bar{Y}_0) \pm t^* \times \sqrt{Sp_2^2 \left[ \frac{2}{3} \right]}$ | $(\bar{Y}_m - \bar{Y}_0) \pm t^* \times \sqrt{Sp_m^2 \left[ \frac{2}{3} \right]}$ |

Donde:

$t^*$ = valor de la t de Dunnett con c comparaciones

$2(c+1)$  grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

### 7.2 Material y equipo

- Matraces aforados marca Pirex, volumen nominal 10.0 ml, tolerancia de  $\pm 0.02$  ml
- Matraces aforados marca Pirex, volumen nominal 100.0 ml, tolerancia de  $\pm 0.02$  ml
- Micropipeta de embolo marca PIPETMAN de intervalo de volumen de 0.01-5.0 ml
- Probeta marca Pirex, volumen nominal 100 ml, con numero de lote 3022
- Pipeta graduada marca Pirex, volumen nominal de 5.0 ml, numero de lote 37035-K
- Sonicador Brason Mod. 3210
- Bomba binaria Perkin-Elmer Serie 250,
- Detector UV-Vis Waters Mod. 2487 con longitu de de onda variable
- Integrador Perkin Elmer Serie 220

- Válvula de inyección Rheodyne con un loop de 20 (I Mod. 7125NS-005)
- Columna empacada de fase estacionaria químicamente unida X-Brige C18 de 50 mm de longitud y 3.0 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 3.5  $\mu\text{m}$
- Espectrofotómetro UV-Vis marca GBC Modelo 911-A de un solo haz
- Balanza analítica Marca Mettler Toledo, modelo AG245 peso máximo de 210g y sensibilidad de 0.1mg

### 7.3 Reactivos

| Compuesto       | Formula   | Grado                      |
|-----------------|---|----------------------------|
| Metanol         | CH <sub>3</sub> OH                              | HPLC                       |
| Acido fosfórico | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                  | Reactivo                   |
|                 |   | Analítico                  |
| Agua            | H <sub>2</sub> O                                | HPLC (0.45 $\mu\text{m}$ ) |
| Acido Carmínico |   |                            |
|                 | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub> | 95%                        |
| (SIGMA 1420EB)  |   |                            |
| Acetona         | CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>               | HPLC                       |



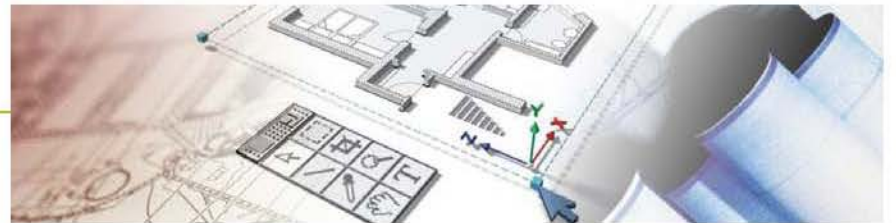
## 8 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Biodiversitas, La cochinilla. Año 6, Num. 36, Mayo 2001, pp. 1-8.
- 2) Campos Figueroa Manuel, Llanderal Cazares Celina. Producción de Grana Cochinilla *Dactylopius coccus* (homoptera: dactylopiidae) en Invernadero. Agrociencia 37, número 2, marzo-abril 2003 pp. 149-155
- 3) Castro Galván Esther, Mercader Trejo Flora E., Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas. El Márquez, México Querétaro, 1996.
- 4) Chimeos J. M., Fernández A. I., Villalba G., Segarra M., Urruticoechea A., Artaza B., Espiell F. Removal of Ammonium and Phosphates from Waste Water Resulting from the Process of Cochineal Extraction Using Mg-O Containing by-product. Water Research. 2003, 37, pp. 1601-1607.
- 5) Métodos Analíticos Validación, Métodos Analíticos Validación 2000.
- 6) EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. December 1998.
- 7) G. Atun, G. Hisarli, Adsorption of Carminic Acid, a Dye on to Glass powder. Chemical Engineering Journal 95 (2003), pp. 241-249
- 8) González Martínez Valentina Donaji, Validación de un Método Espectrofotométrico de Uv/vis para Determinar Ácido Benzoico en Bebidas de Frutas, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D. F., 1999.
- 9) Hernández Hernández Fidel de la Cruz, García Gil de Muñoz Fernando, Rio Dueñas Ignacio, Lanz Mendoza Humberto. La Cochinilla Fina del Nopal, Colorante Mexicano para el Mundo. Ciencia. 2005, octubre-diciembre, pp. 78-86.

- 10) Le Houérou, Henry N. The Role of Cacti (*Opuntia* spp.) in Erosion Control, and Reclamation, Rehabilitation and Agricultural Development in the Mediterranean Basin. *Journal of Arid Environments* (1996), 33, pp. 135–159
- 11) Méndez J.; González M.; Lobo M. G.; Carnero A. Color Quality of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus Costa*). Geographical Origin Characterization Using Multivariate Statical Analysis. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 52, pp. 1331-1337.
- 12) Méndez Jesús; González Mónica; Lobo M. Gloria; Carnero Aurelio, Alfonso Ana. Optimizing Conditions for the Extraction of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus Costa*) Using Response Surface Methodology. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, pp. 6968-6974.
- 13) Méndez Jesús; Gonzáles Mónica; Lobo M. Gloria; Carnero Aurelio. Color Quality of Pigments (*Dactylopius coccus Costa*). Geographical Origin Characterization Using Multivariate Statistical Analysis. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, pp. 1331-1337.
- 14) Mercado Servin Ana Lilia, Perspectiva de la Validación en México. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D. F. 2001.
- 15) Mollet L. Leo, Food Análisis by HPLC, Marcel Deckker, INC. U.S.A., New York 1992.
- 16) Ramírez Hernández Adriana, Validación de la Técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP) para la Cuantificación de Vitamina A. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D. F. 2004.

- 17) Rouessac Francis y Rouessac Annick, Análisis Químico, Mc. Graw-Hill, España, 2003
- 18) Wouters Jan, Verhecken André. The Chemical Nature of Flavokermesic Acid. Tetrahedron Letters. 1987, 28, pp. 1199-1202.
- 19) Waters, Chromatography Columns and Supplies Catalog 2004-2005.
- 20) <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/cfr73100.html> (18 de Junio 2006)
- 21) [http://www.infoaserca.gob.mx/proafex/COCHINILLA\\_NOPAL.pdf](http://www.infoaserca.gob.mx/proafex/COCHINILLA_NOPAL.pdf) (12 junio 2006)
- 22) <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/cfr73100.html> (18 de Junio 2006)
- 23) [http://www.xrite.com.mx/support\\_glossary.html#f](http://www.xrite.com.mx/support_glossary.html#f) (19 de Junio 2006)
- 24) <http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm> (18 de Junio 2006)
- 25) <http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LTGDL&WT.svl=1> (18 Abril 2006)
- 26) <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf> (18 de Junio 2006)

PLANOS

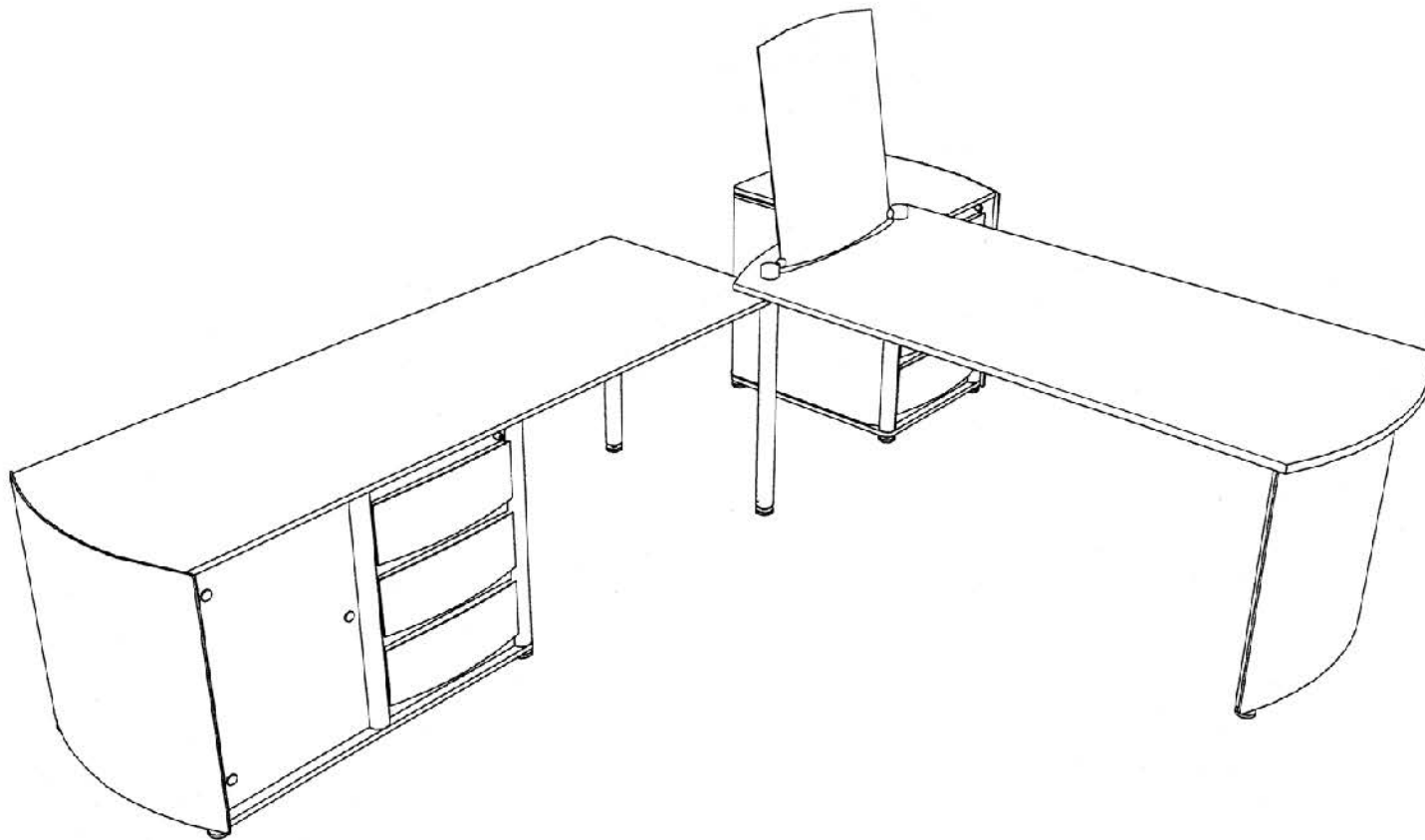


Para la producción del mueble se desarrollaron los planos técnicos correspondientes y que se encuentran organizados en el siguiente orden:

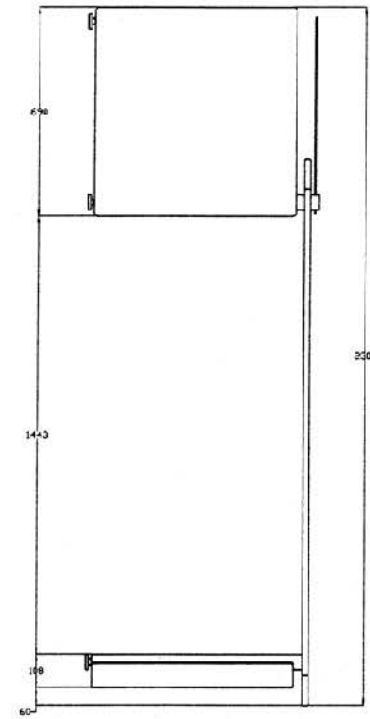
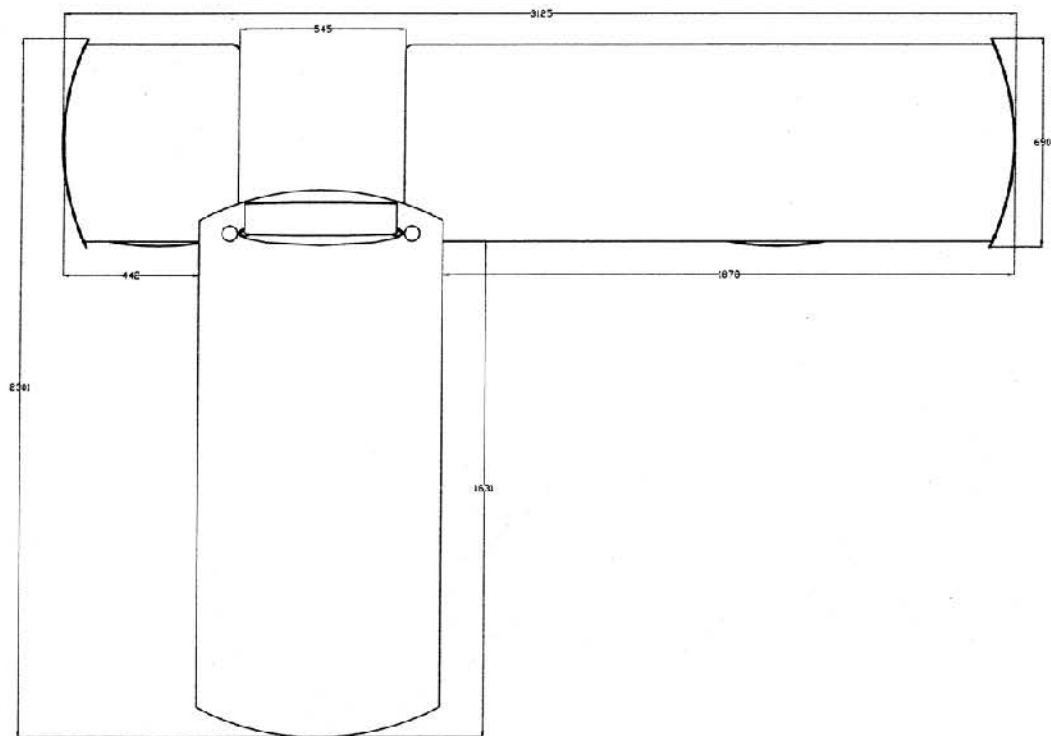
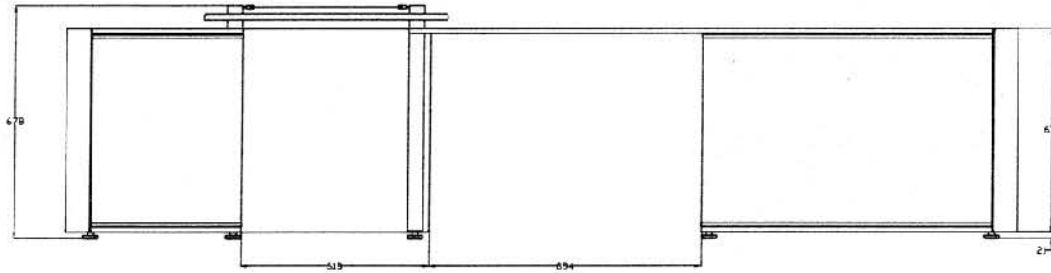
Planos generales por conjunto  
 Planos generales por mueble  
 Despieces por mueble  
 Planos por pieza  
 Detalles de ensambles

Asimismo se anexa una tabla con las claves de las piezas y su respectiva descripción para su mejor uso y comprensión.

| Clave | Descripción                             |
|-------|---|
| A01   | cubierta superior del modulo sencillo   |
| A02   | cubierta inferior del modulo sencillo   |
| A03   | mesa del escritorio                     |
| A04   | pantalla del escritorio                 |
| A05   | entrepañó del módulo sencillo           |
| A06   | cubierta larga del módulo doble         |
| A07   | cubierta inferior del módulo doble      |
| A08   | entrepañó del módulo doble              |
| A09   | cubierta superior del módulo doble      |
| P01   | poste A de los módulos                  |
| P02   | poste B de los módulos                  |
| P03   | patas del escritorio                    |
| P04   | patas de la mesa de trabajo con vitrina |
| P05   | patas del biombo                        |
| P06   | poste superior del biombo               |
| P07   | poste horizontal del escritorio         |
| P08   | pinza                                   |
| PU01  | puerta de la vitrina                    |
| B01   | cajón                                   |
| B02   | archivero                               |
| T01   | tela del módulo sencillo                |
| T02   | borde de la tela                        |
| T03   | tela del modulo doble                   |
| T04   | tela del biombo                         |
| L01   | cubierta lateral                        |
| L02   | lámina de protección                    |
| L03   | lámina de separación                    |
| L04   | lámina basurero                         |
| L05   | base basurero                           |
| R01   | regatón                                 |
| U01   | ángulo                                  |
| U02   | brazo del escritorio                    |
| U03   | boton de la puerta                      |
| U04   | barras centrales del biombo             |
| U05   | barras laterales del biombo             |
| Co... | piezas comerciales                      |



|   |                                     |               |   |
|---|-------------------------------------|---------------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | <b>IXILKA</b> |  |
|   | estacion estandar                   |               |   |
|  | escala 1:20                         | cotas mm      | plano 1   |

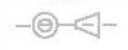


noe **ceron** / o a

IXILKA



estacion estandar / vistas generales



escala 1:20

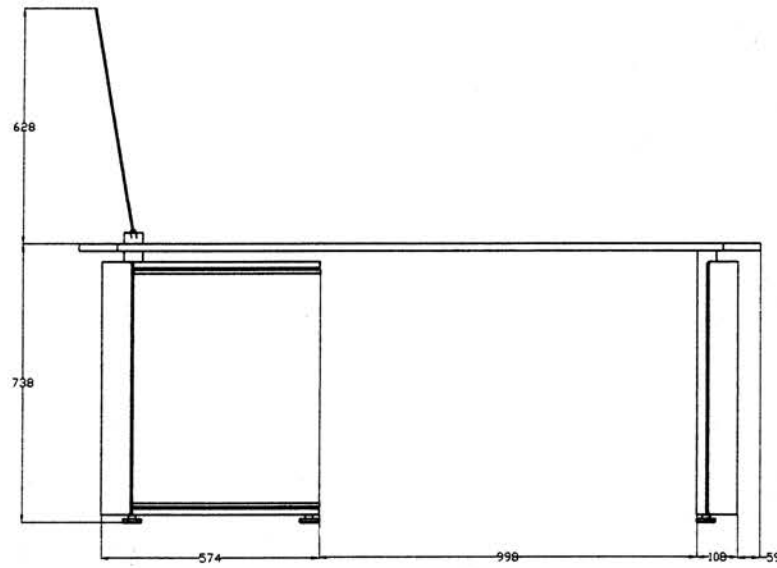
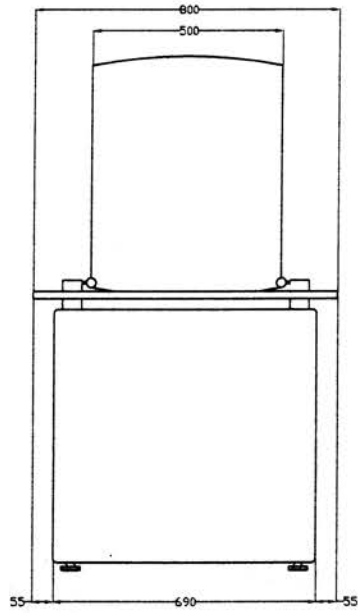
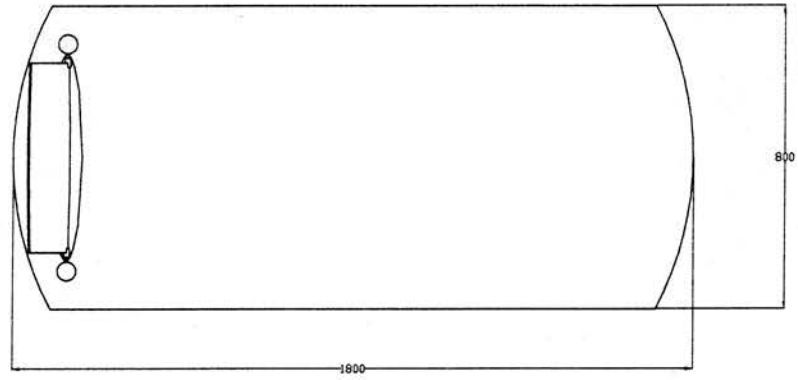
cotas mm

plano 2



|   |                      |          |   |
|---|----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |  |
|   | estacion basica      |          |   |
|  | escala 1:20          | cotas mm | plano 3   |





noe **ceron** roa

IXILKA

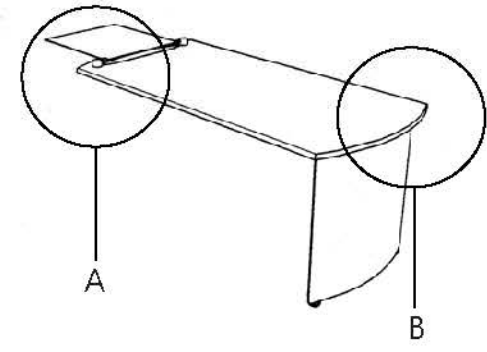
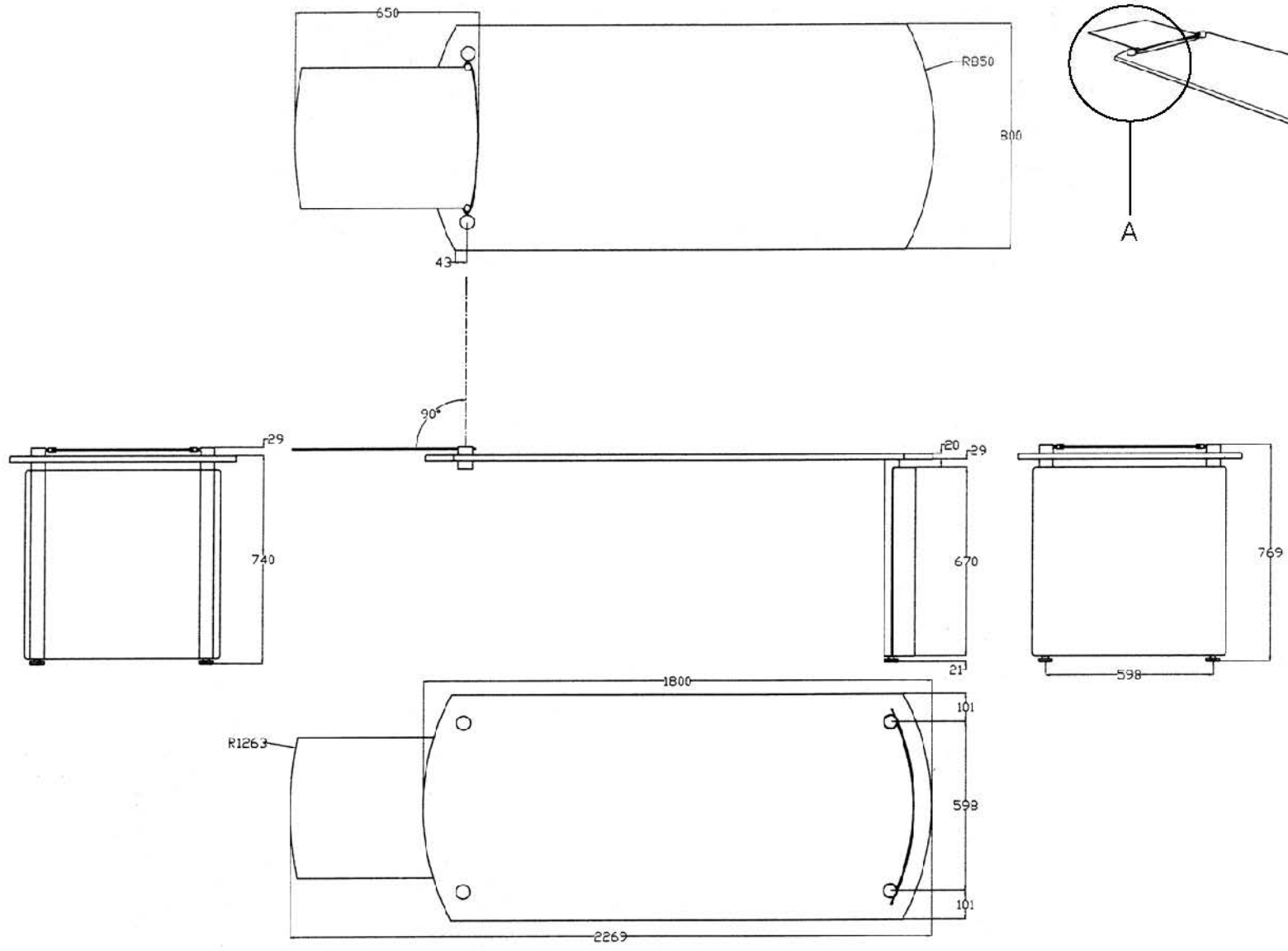
estacion basica / vistas generales



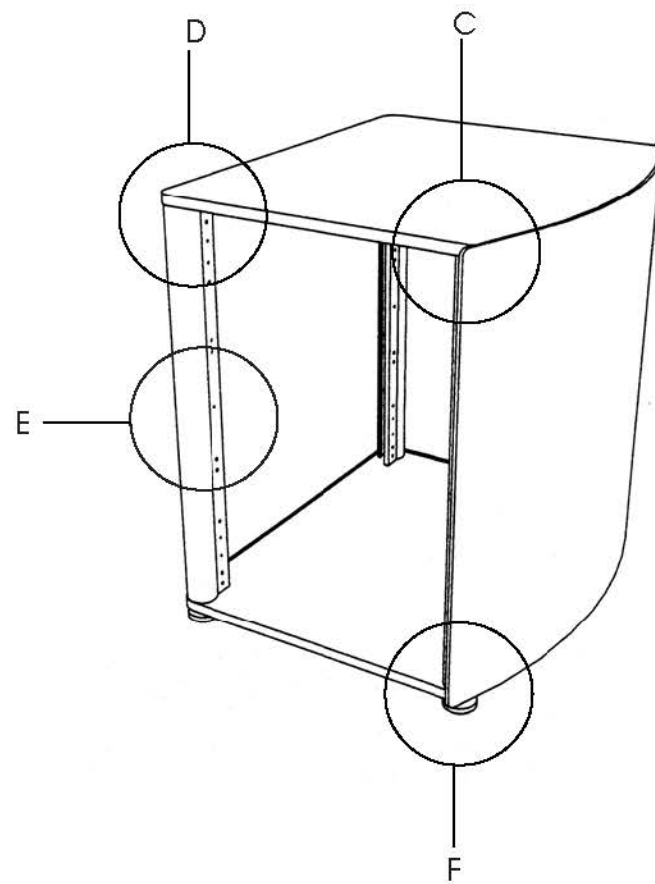
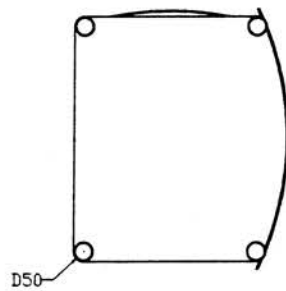
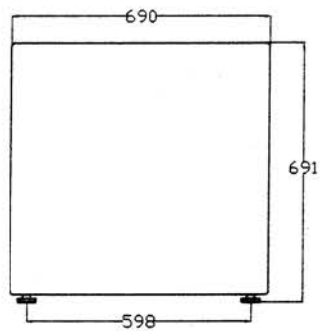
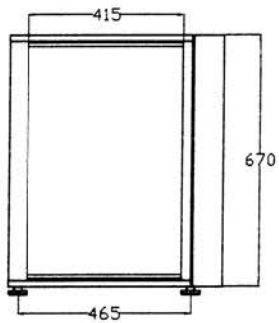
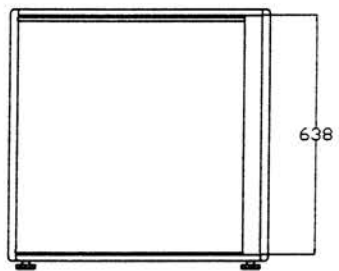
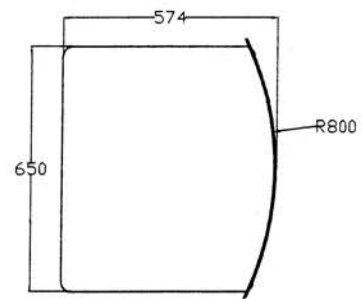
escala 1:20

cotas mm

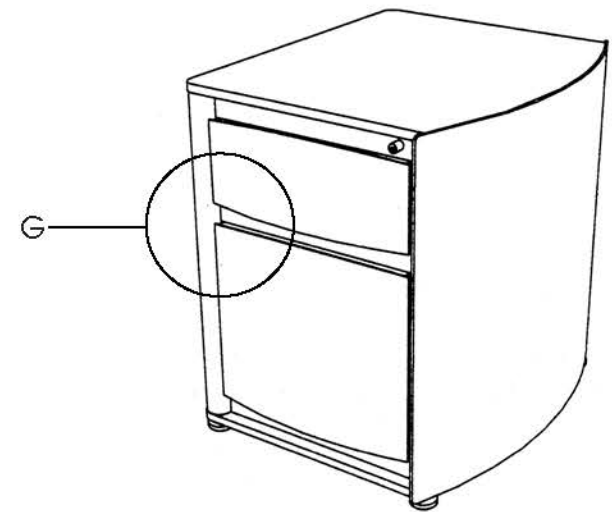
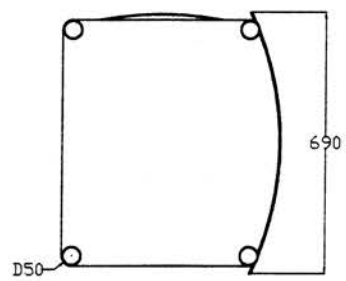
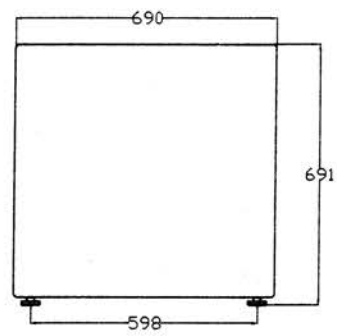
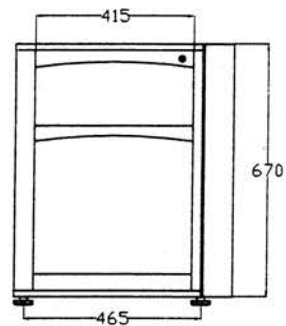
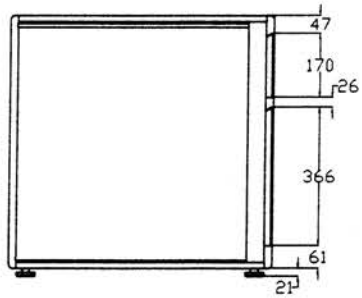
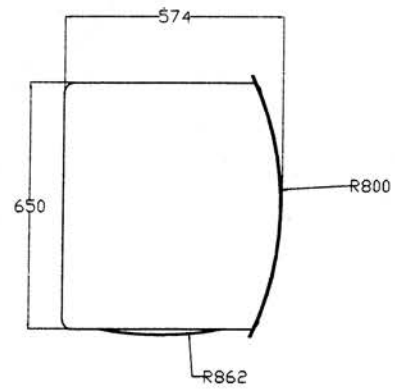
plano 4



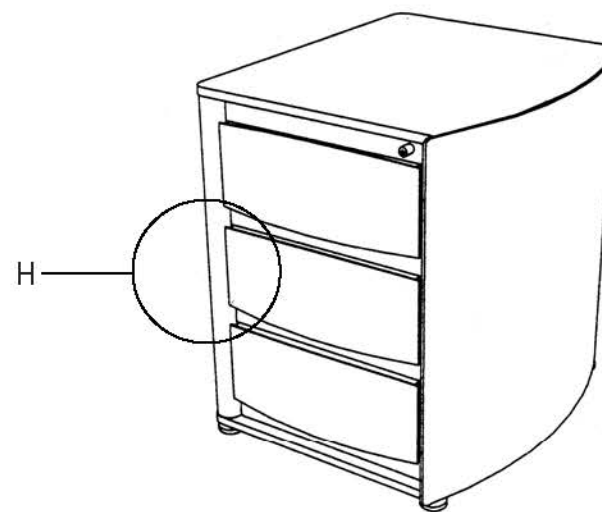
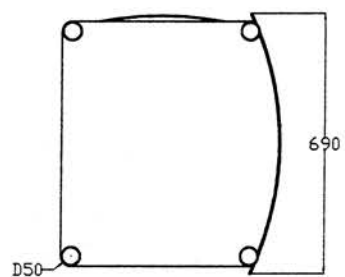
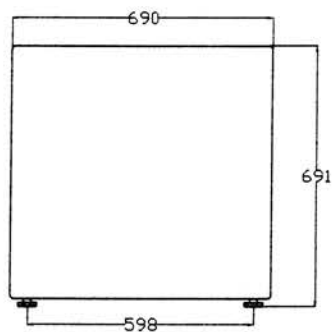
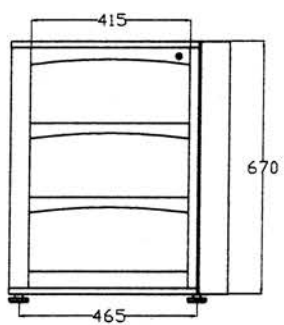
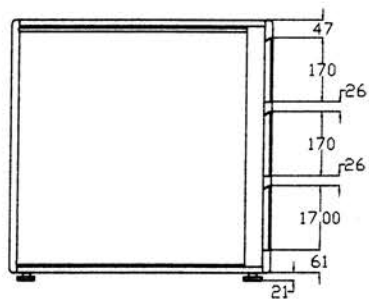
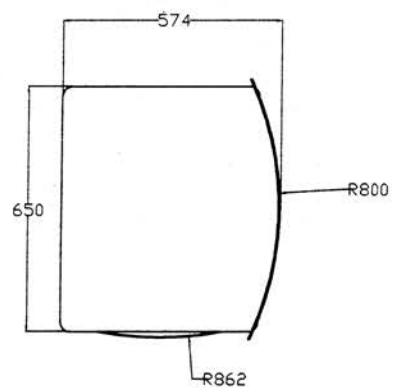
|  |                             |               |         |
|--|-----------------------------|---------------|---------|
|  | noe <b>ceron</b> <i>roa</i> | <b>IXILKA</b> |         |
|  | escritorio                  |               |         |
|  | escala 1:20                 | cotas mm      | plano 5 |



|  |                      |          |         |
|--|----------------------|----------|---------|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |         |
|  | modulo sencillo      |          |         |
|  | escala 1:20          | cotas mm | plano 6 |



|  |                             |               |         |
|--|-----------------------------|---------------|---------|
|  | noe <b>ceron</b> <i>o.a</i> | <b>IXILKA</b> |         |
|  | archivero                   |               |         |
|  | escala 1:20                 | cotas mm      | plano 7 |



noe **ceron** roa

IXILKA



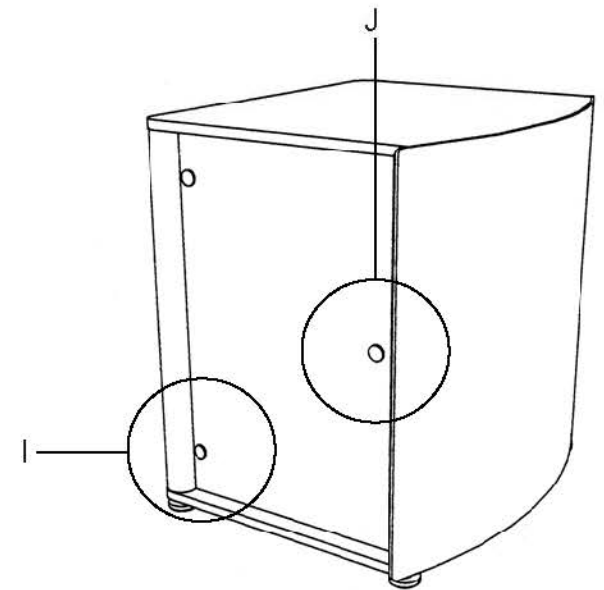
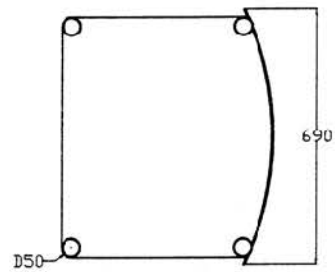
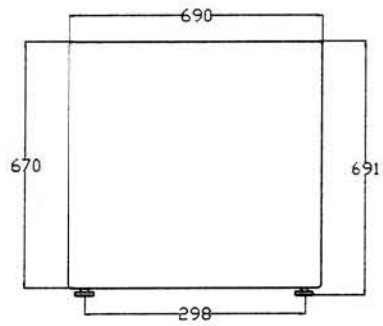
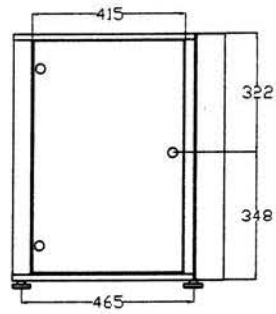
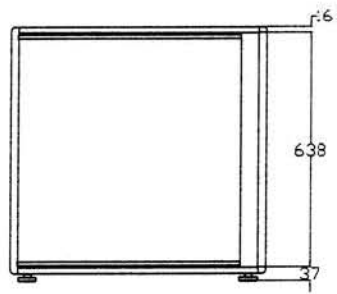
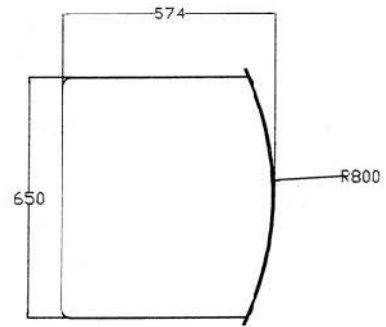
cajonera



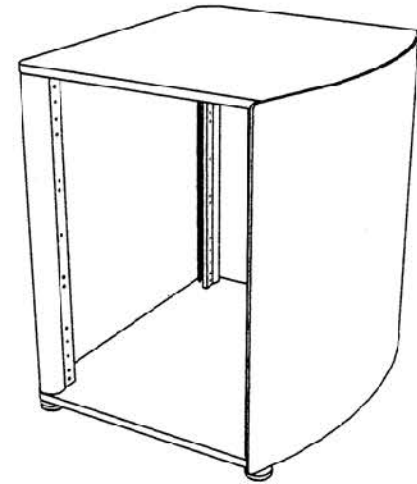
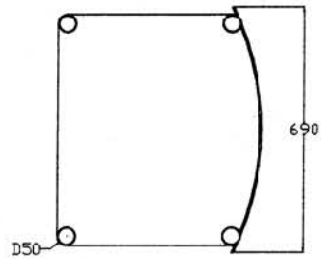
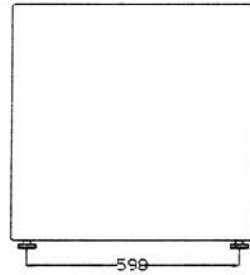
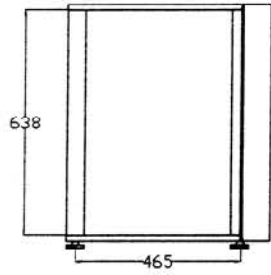
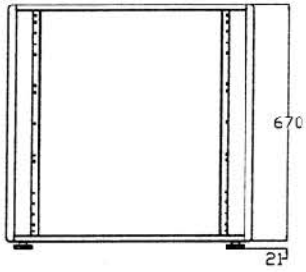
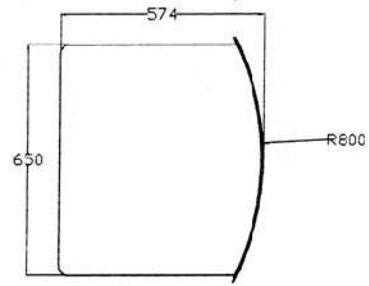
escala 1:20

cotas mm

plano 8



|   |               |          |   |
|---|---------------|----------|---|
|  | noe ceron roa | IXILKA   |  |
|   | vitrina       |          |   |
|  | escala 1:20   | cotas mm | plano 9   |



noe **ceron** roa

IXILKA



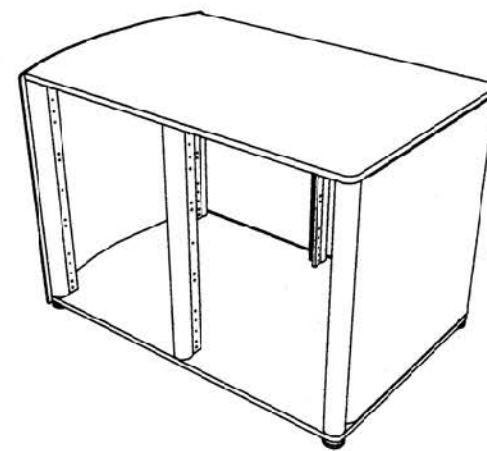
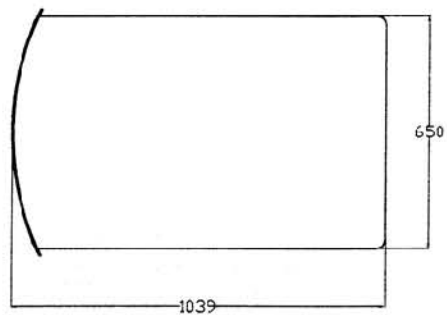
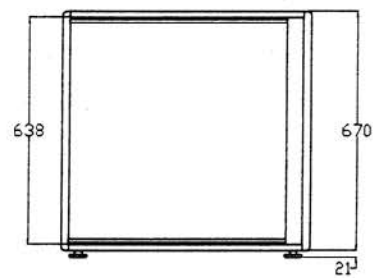
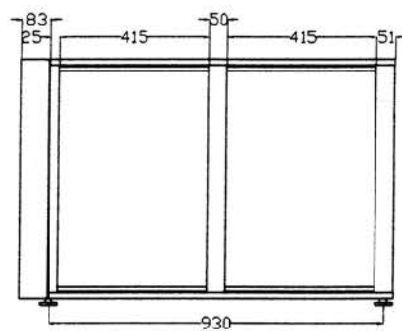
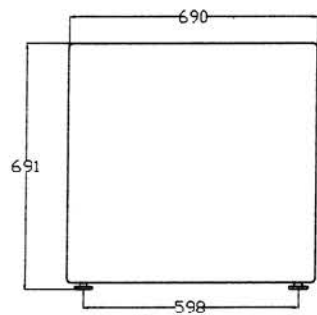
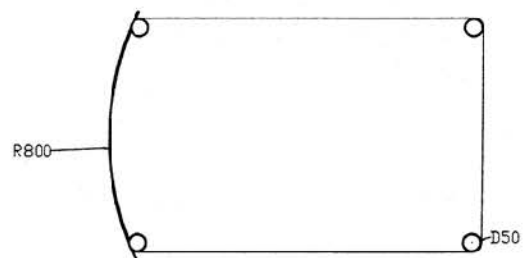
mesa de apoyo



escala 1:20

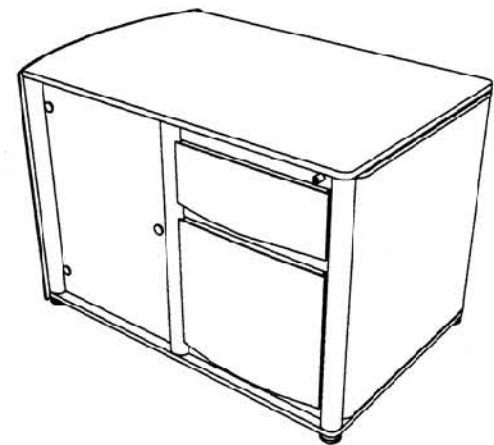
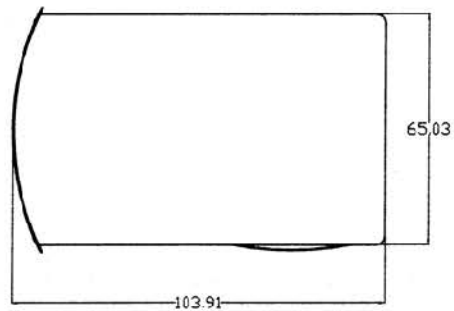
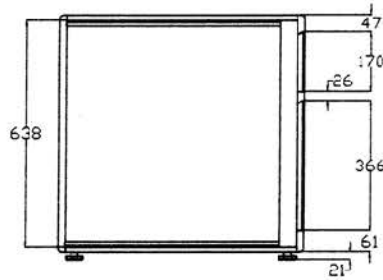
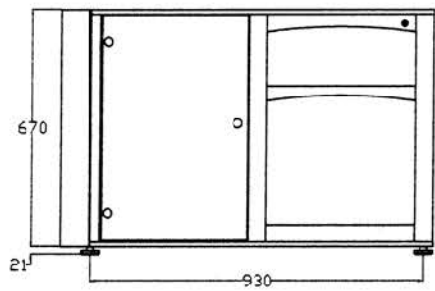
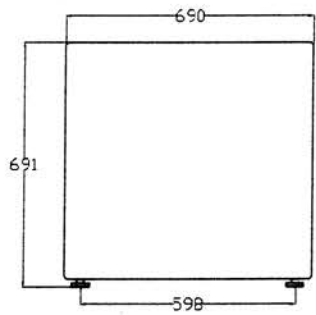
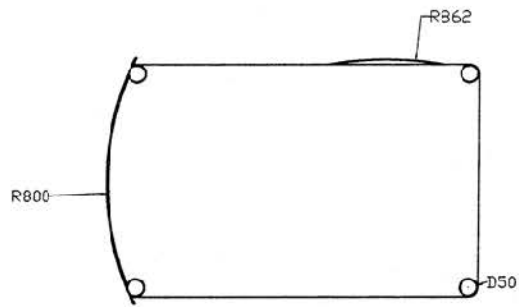
cotas mm

plano 10



|   |                                     |               |   |
|---|-------------------------------------|---------------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | <b>IXILKA</b> |  |
|   | módulo doble                        |               |   |
|  | escala 1:20                         | cotas mm      | plano 11  |





noe **ceron** roa

IXILKA



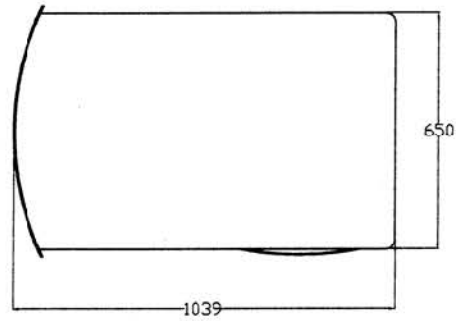
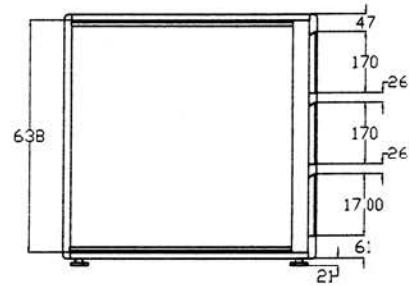
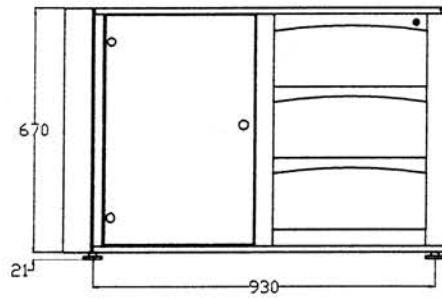
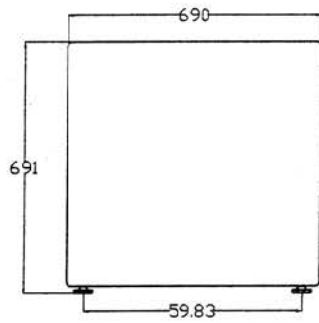
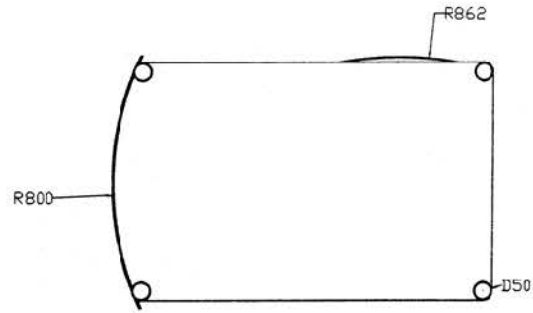
vitrina y archivero



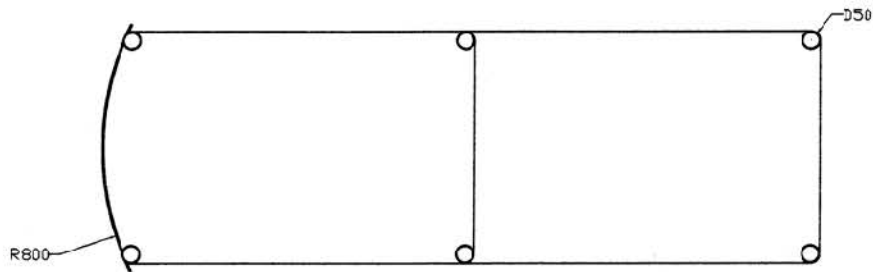
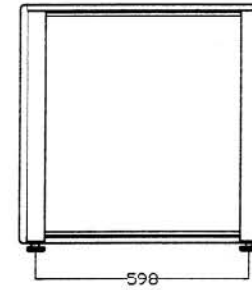
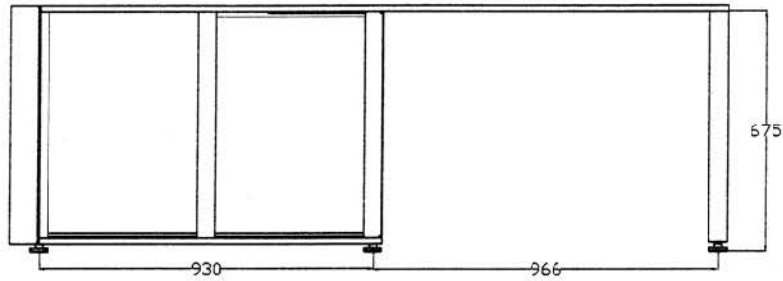
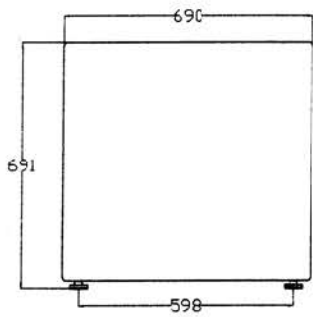
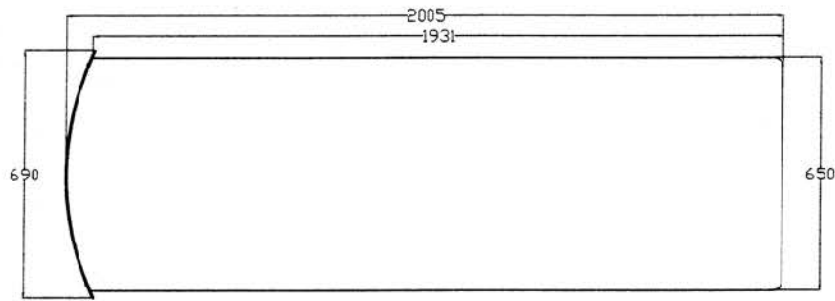
escala 1:20

cotas mm

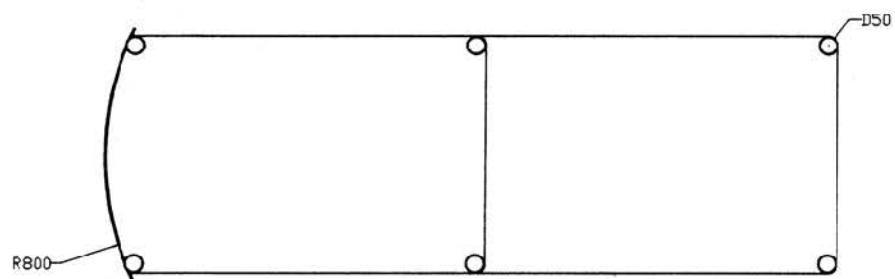
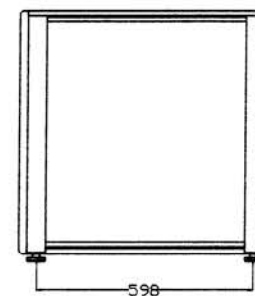
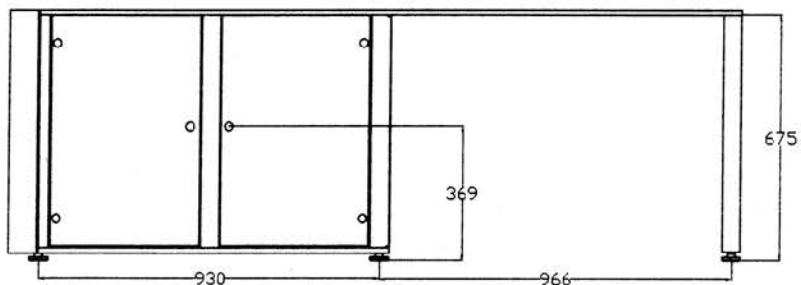
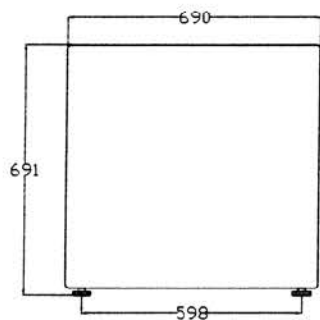
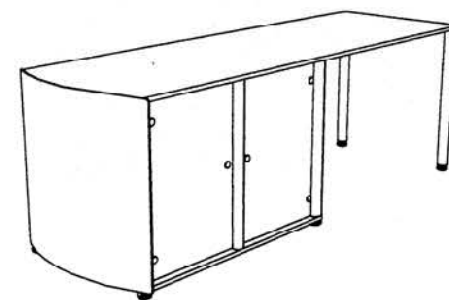
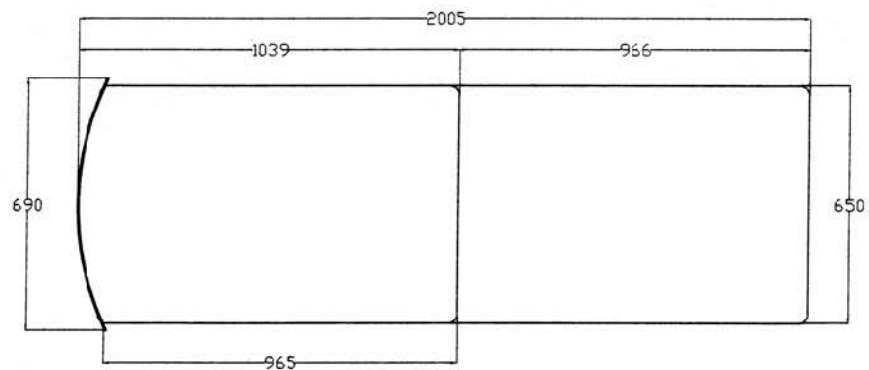
plano 12



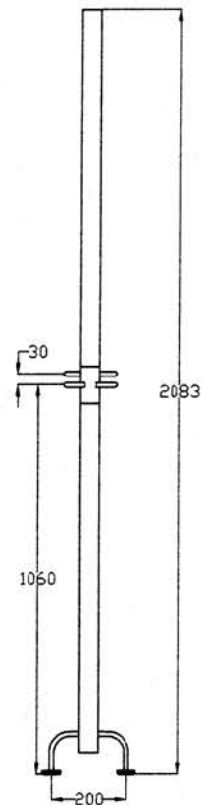
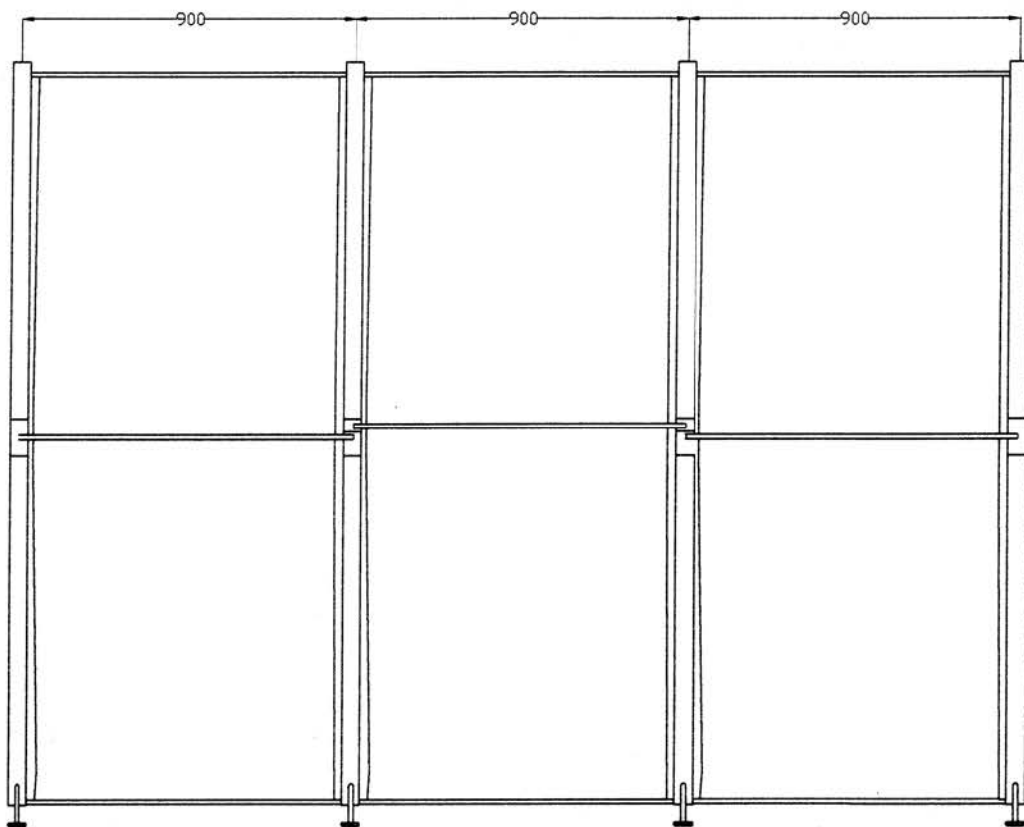
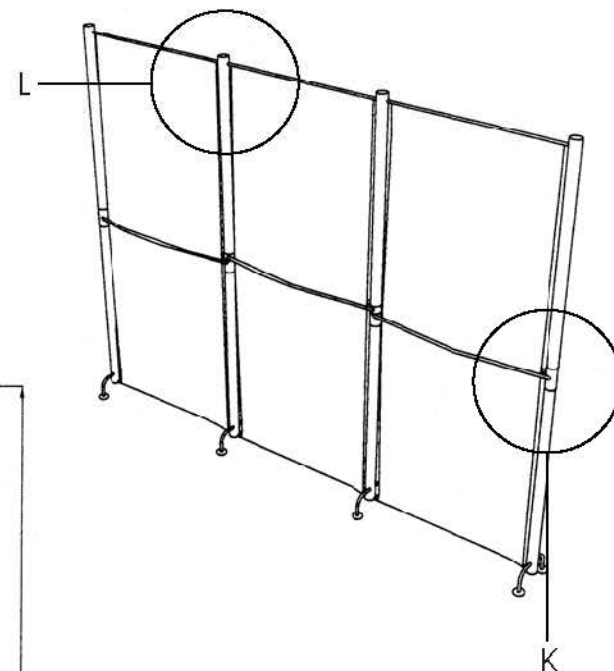
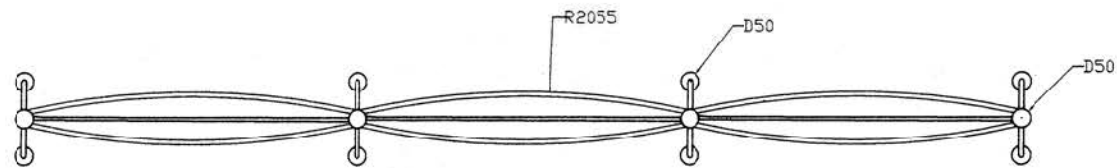
|  |                             |               |          |
|--|-----------------------------|---------------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> <i>roa</i> | <b>IXILKA</b> |          |
|  | vitrina y cajonera          |               |          |
|  | escala 1:20                 | cotas mm      | plano 13 |



|  |                      |          |          |
|--|----------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |          |
|  | modulo doble largo   |          |          |
|  | escala 1:20          | cotas mm | plano 14 |



|   |                      |          |   |
|---|----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |  |
|   | vitrina doble        |          |   |
|  | escala 1:20          | cotas mm | plano 15  |



noe **ceron** roa

IXILKA



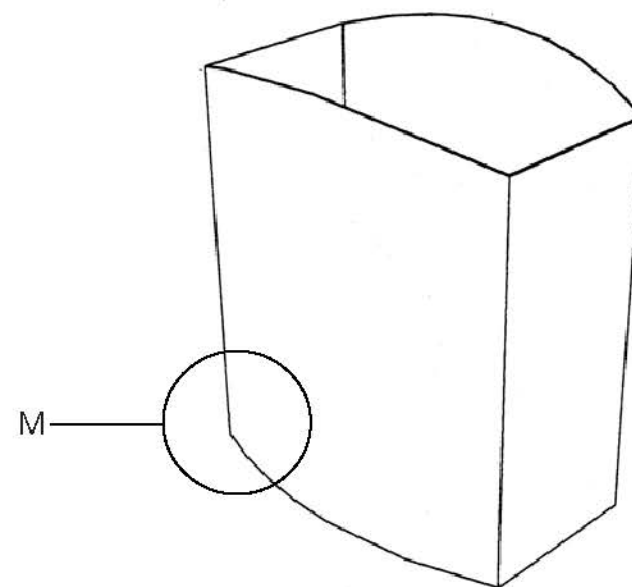
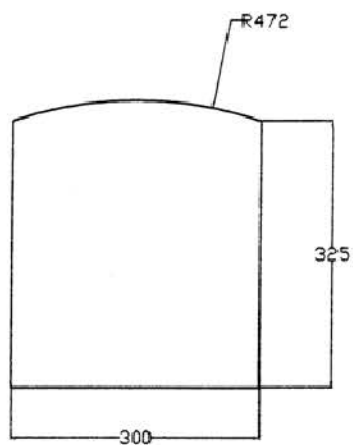
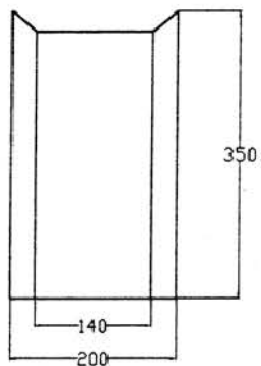
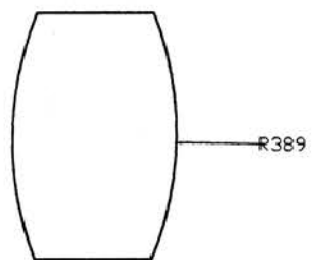
blamba



escala 1:20

cotas mm

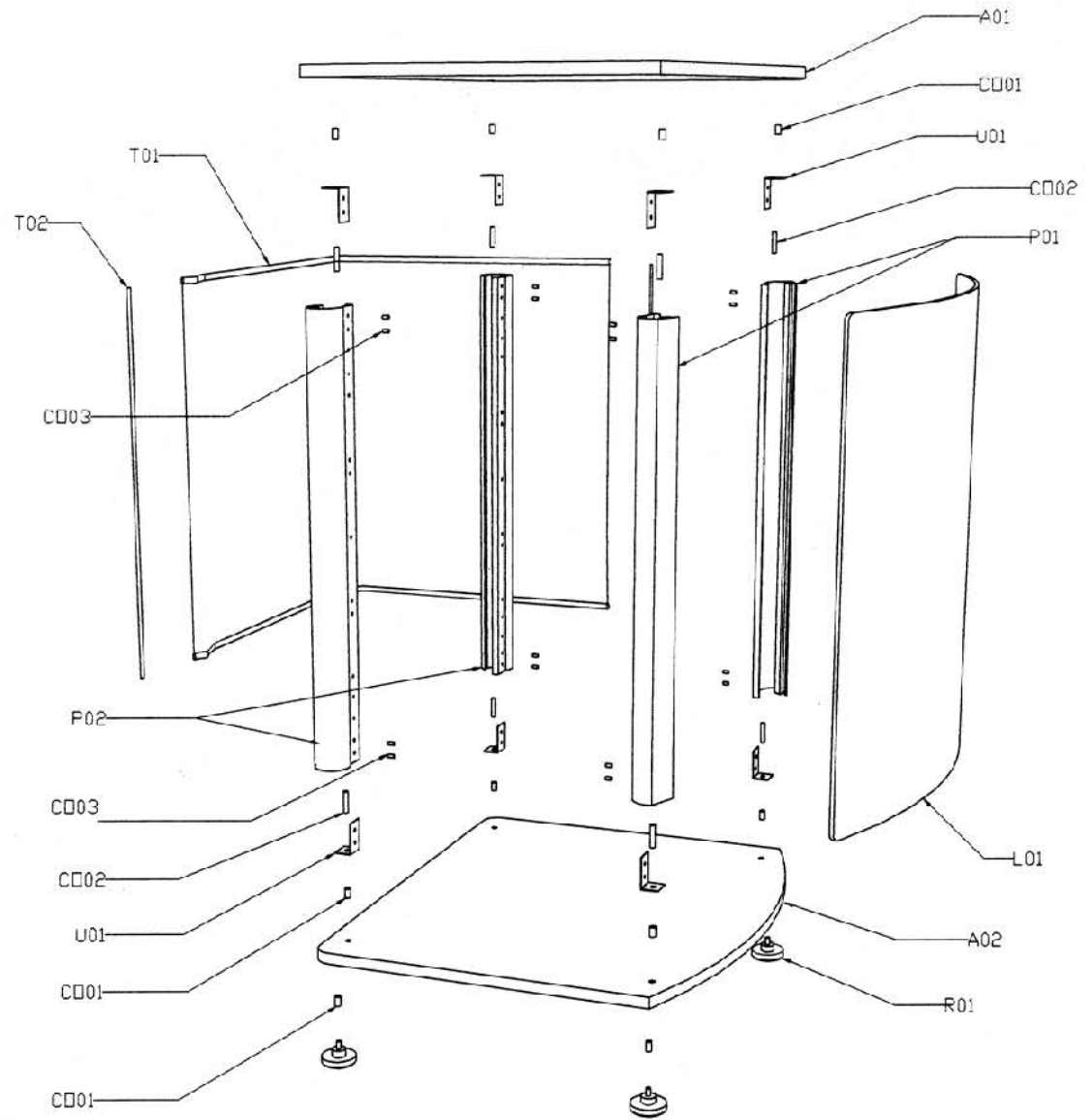
plano 16



|  |  |          |          |
|--|--|----------|----------|
|  | noe <sup>ce</sup> ron <sup>ia</sup> o <sup>a</sup> | IXILKA   |          |
|  | basurero   |          |          |
|  | escala 1:10  | cotas mm | plano 17 |

## PIEZAS COMERCIALES

- Co01 - 12 tuercas inserto tipo E Zammck de 1/4" - 20x13mm
- Co02 - 8 tornillos conectores de 1/4" x 1/2"
- Co03 - 16 tornillos p/lámina de 3/16" x 1/2"



noe **ceron** roa

IXILKA



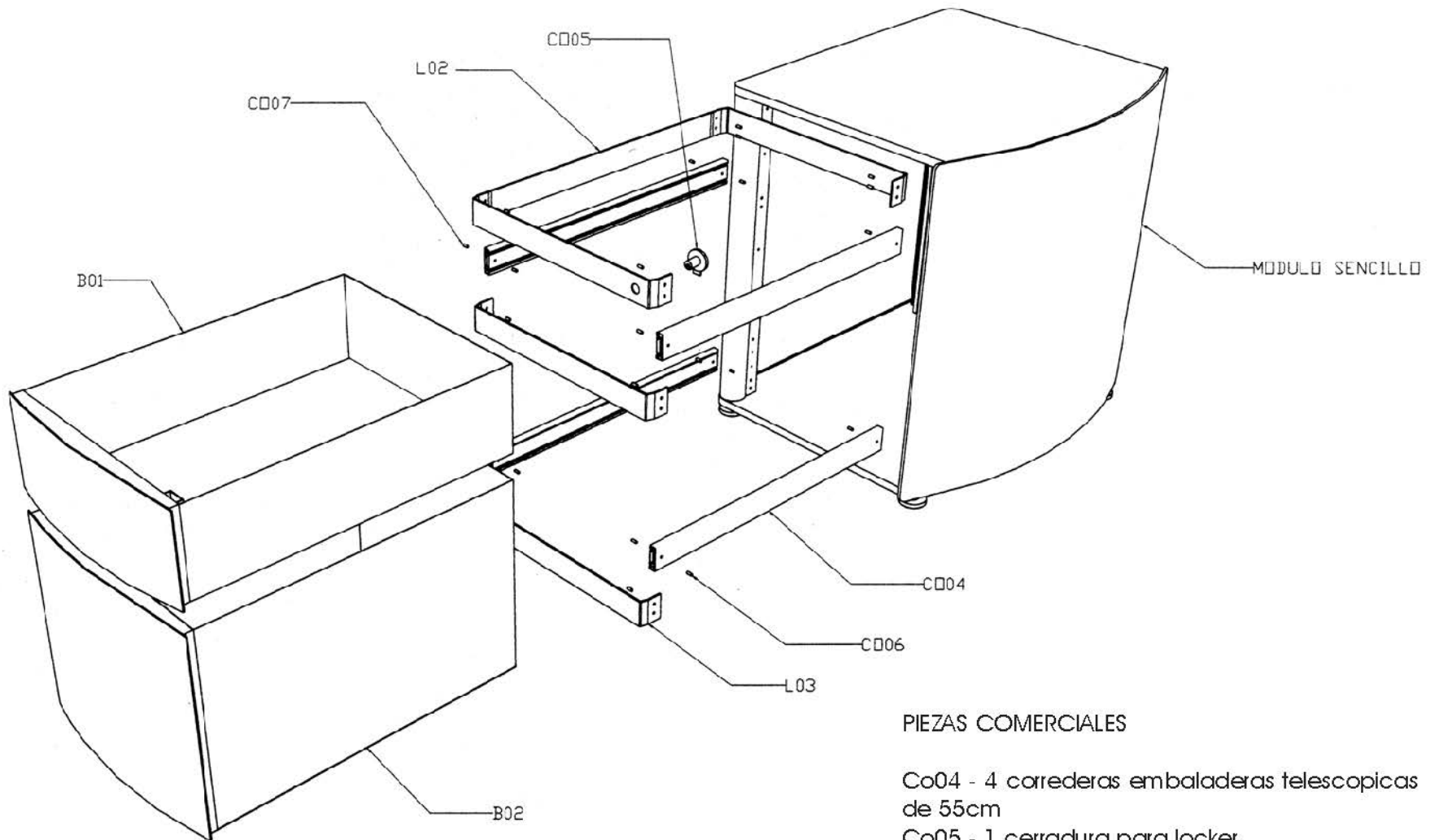
despiece modulo sencillo



escala 1:10

cotas mm

plano 18



#### PIEZAS COMERCIALES

Co04 - 4 carreteras embaladeras telescopicas de 55cm

Co05 - 1 cerradura para locker

Co06 - 16 tornillos p/lámina de 5/32" x 1/2"

Co07 - 16 tornillos p/lámina de 3/16" x 1/2"

|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |  |
|   | desplece archivero                  |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 19  |



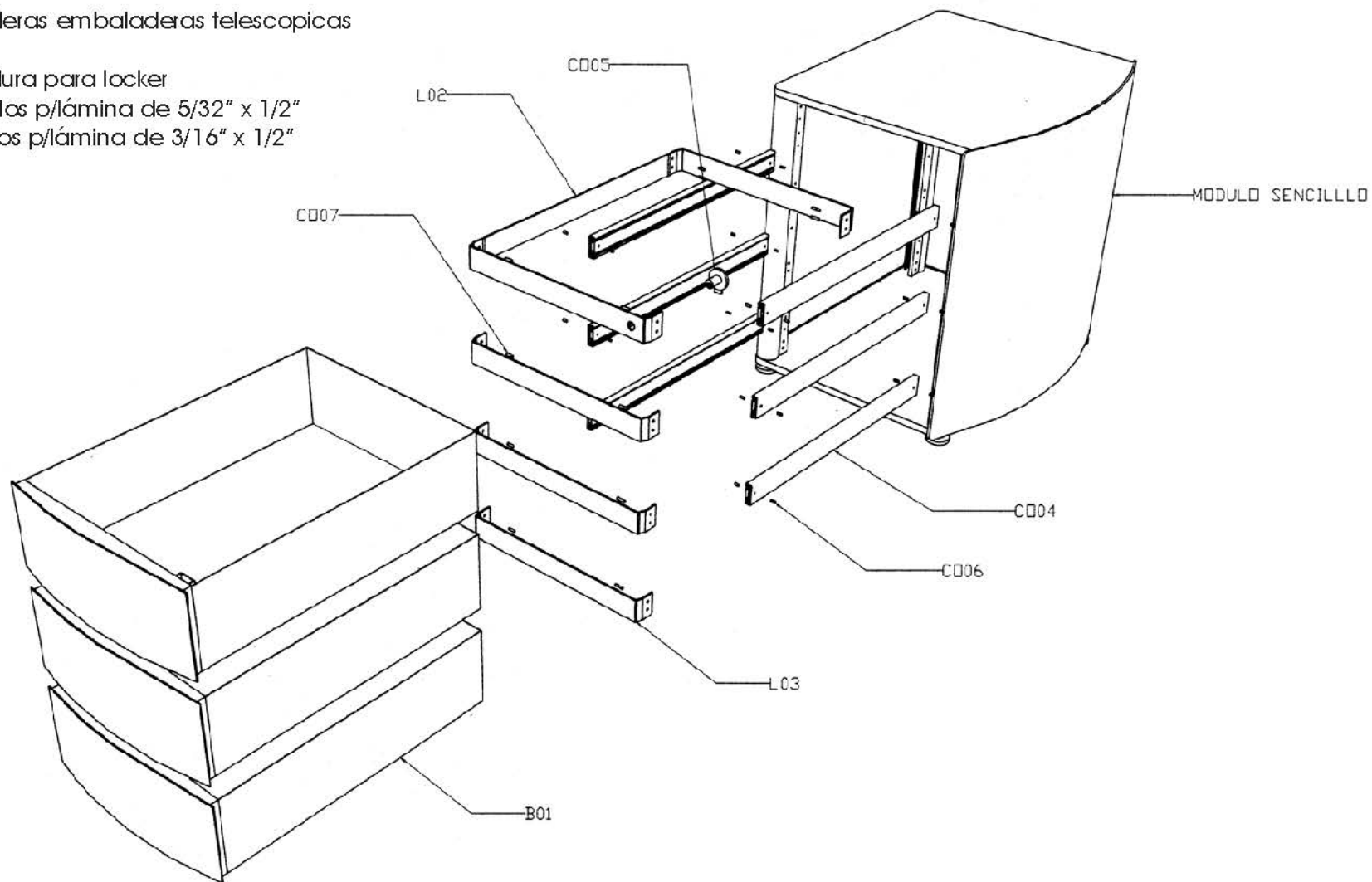
## PIEZAS COMERCIALES

Co04 - 4 correderas embaladeras telescopicas de 55cm

Co05 - 1 cerradura para locker

Co06 - 24 tornillos p/lámina de 5/32" x 1/2"

Co07 - 20 tornillos p/lámina de 3/16" x 1/2"



noe **ceron** roa

IXILKA



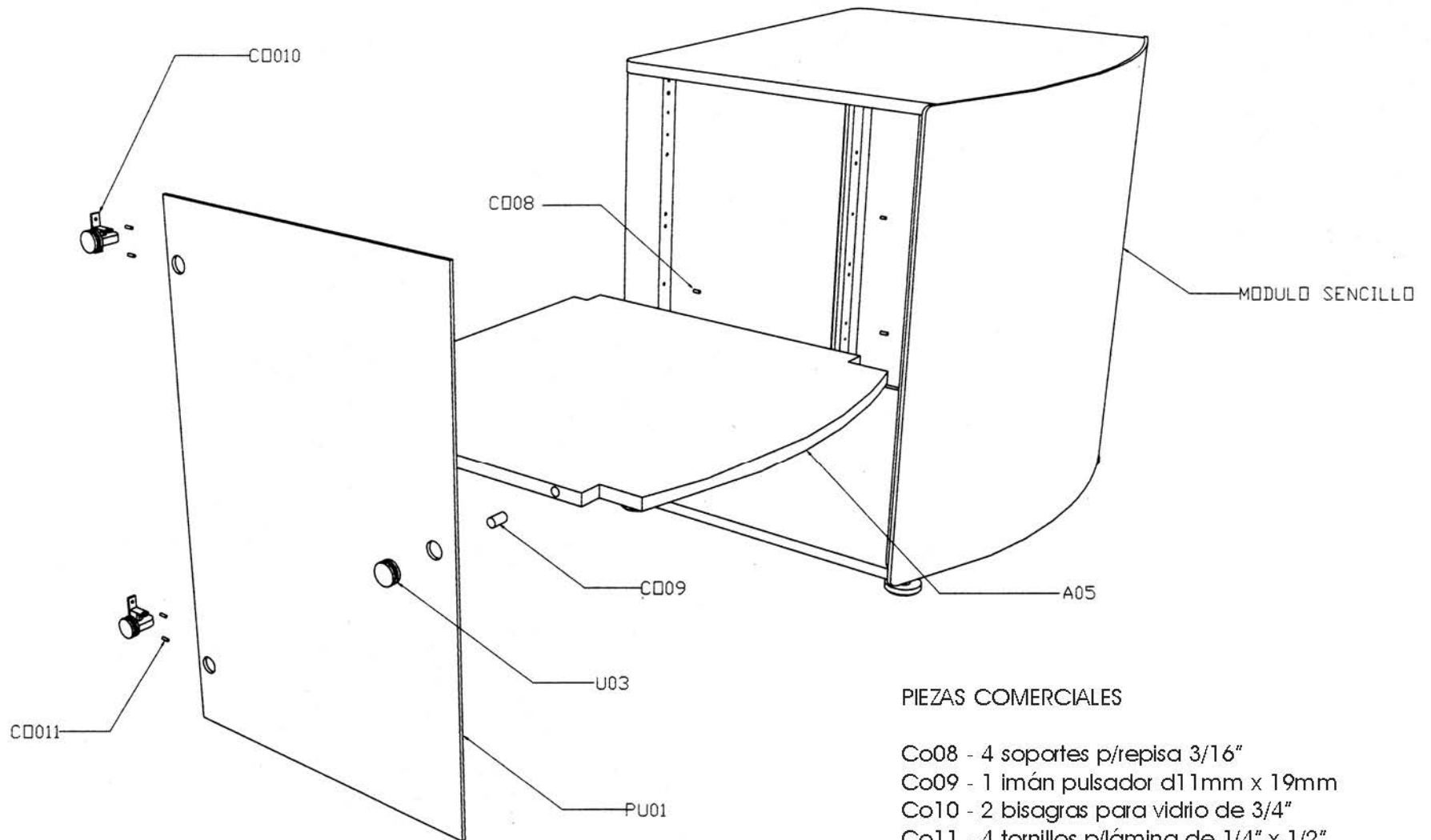
despiece cajonera



escala 1:10

cotas mm

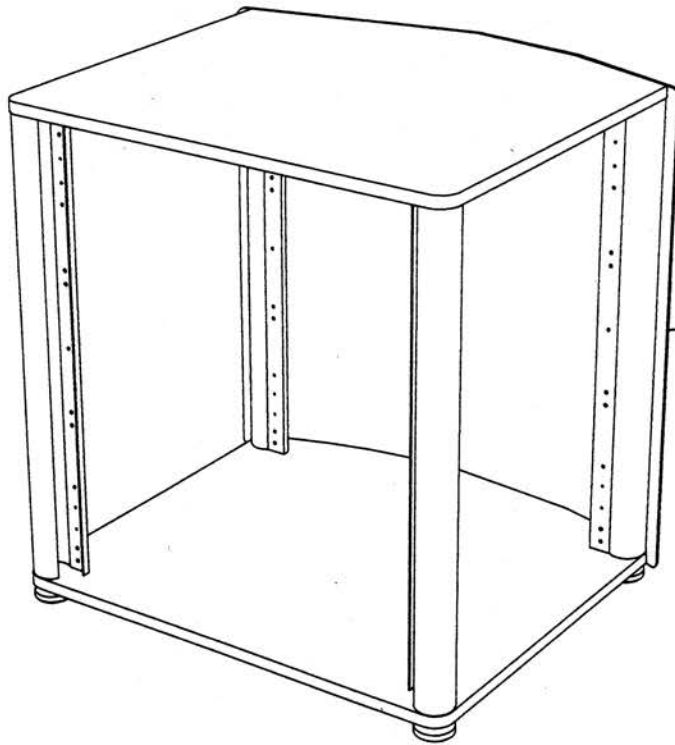
plano 20



#### PIEZAS COMERCIALES

- Co08 - 4 soportes p/repisa 3/16"
- Co09 - 1 imán pulsador d11mm x 19mm
- Co10 - 2 bisagras para vidrio de 3/4"
- Co11 - 4 tornillos p/lámina de 1/4" x 1/2"

|   |                             |          |   |
|---|-----------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <i>roa</i> | IXILKA   |  |
|   | despiece vitrina            |          |   |
|  | escala 1:10                 | cotas mm | plano 21  |



MODULO SENCILLO (NOTA: en este caso se excluyen las piezas de tela T01 y T02.)



noe **ceron** roa

IXILKA



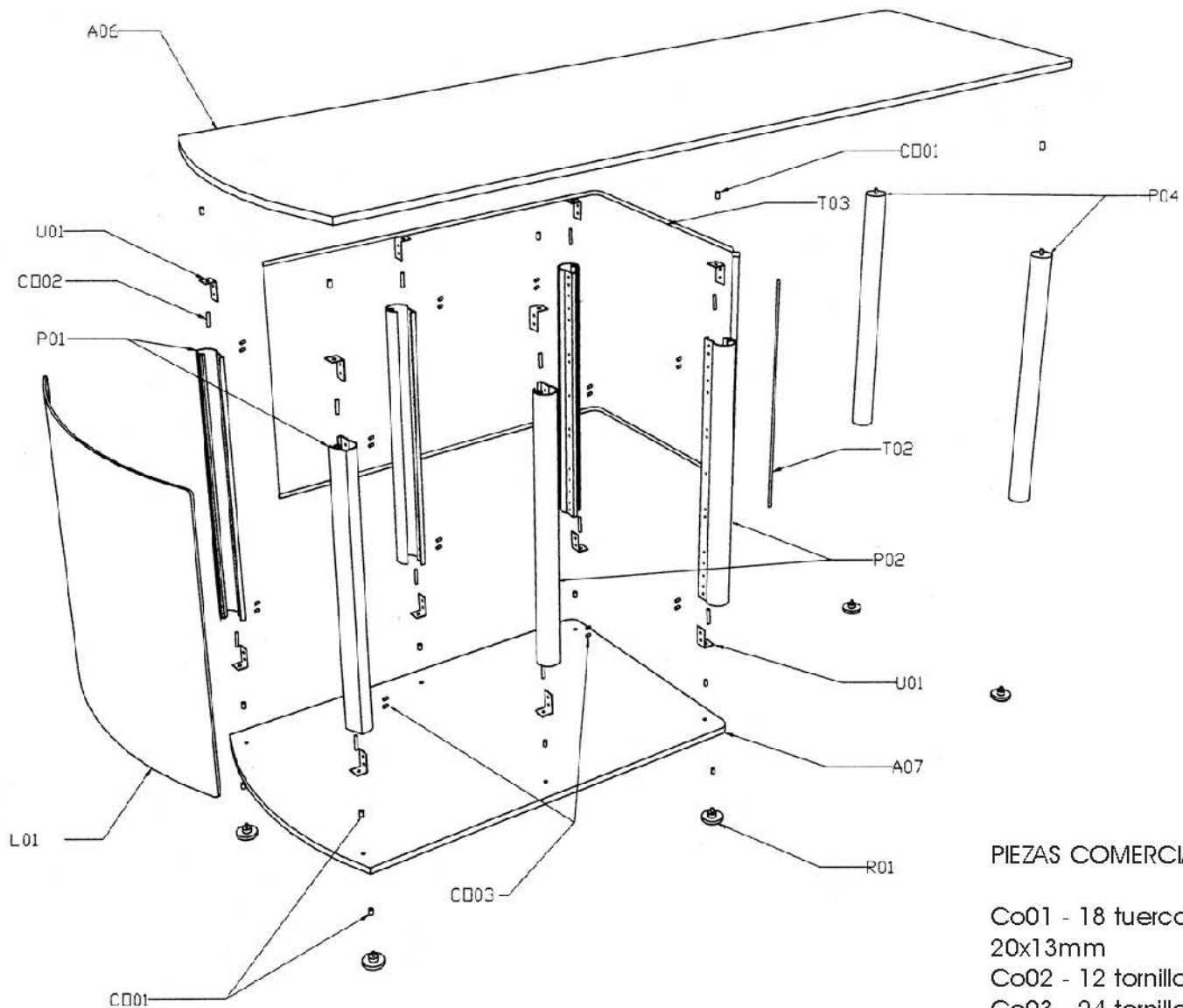
despiece mesa de apoyo



escala 1:10

cotas mm

plano 22



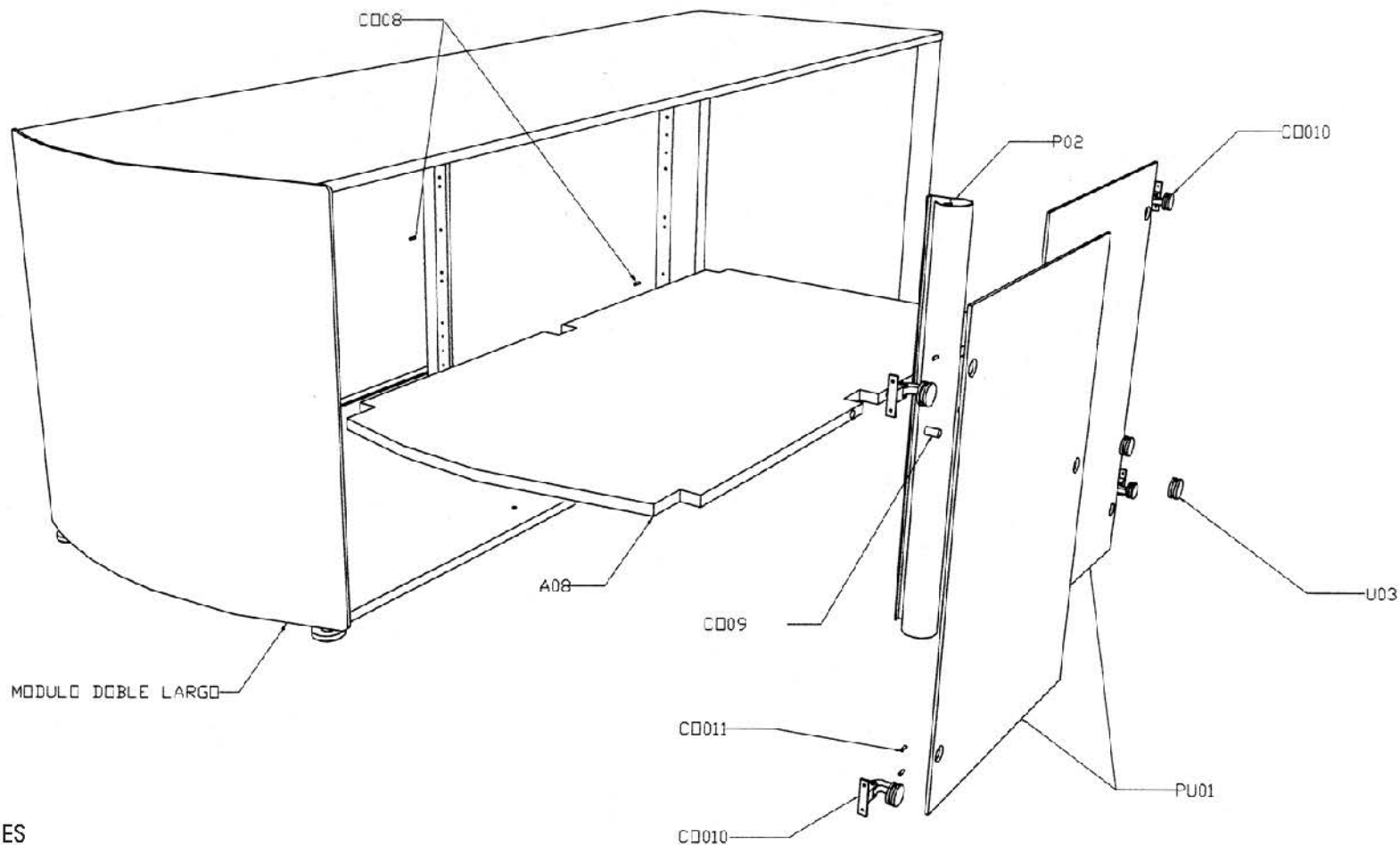
PIEZAS COMERCIALES

Co01 - 18 tuercas inserto tipo E Zamck de 1/4" - 20x13mm

Co02 - 12 tornillos conectores de 1/4" x 1/2"

Co03 - 24 tornillos p/lámina de 3/16" x 1/2"

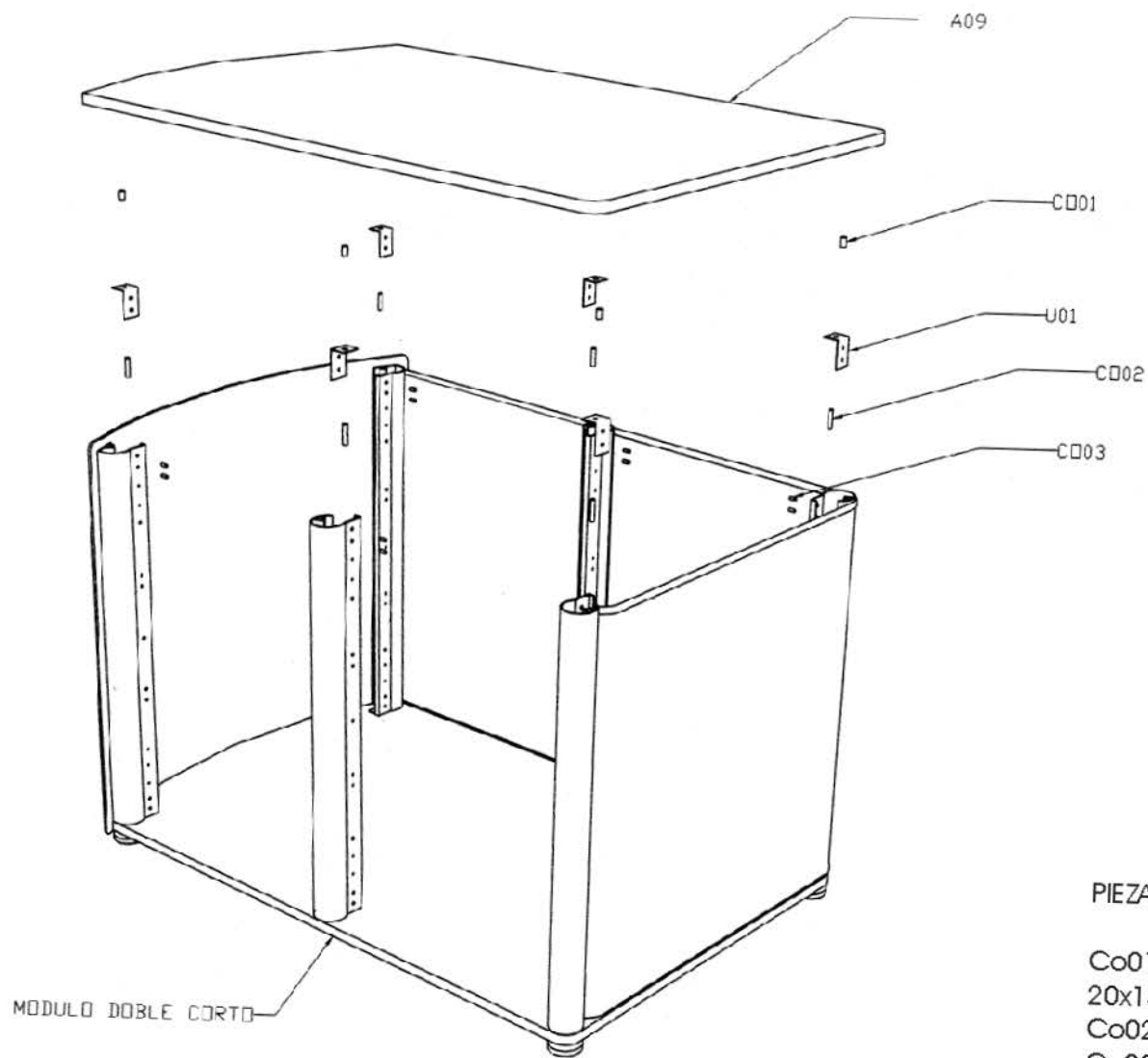
|   |                             |          |   |
|---|-----------------------------|----------|---|
|  | noe ceron                   | IXILKA   |  |
|   | despiece modulo doble largo |          |   |
|  | escala 1:10                 | cotas mm | plano 23  |



### PIEZAS COMERCIALES

- Co08 - 6 soportes p/repisa de 3/16"
- Co09 - 2 imanes pulsadores d11mm x 19mm
- Co10 - 4 bisagras p/vidrio de 3/4"
- Co11 - 8 tornillos p/lamina de 1/4" x 1/2"

|  |                              |          |          |
|--|------------------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> / o a       | IXILKA   |          |
|  | despiece vitrina doble larga |          |          |
|  | escala 1:10                  | cotas mm | plano 24 |



### PIEZAS COMERCIALES

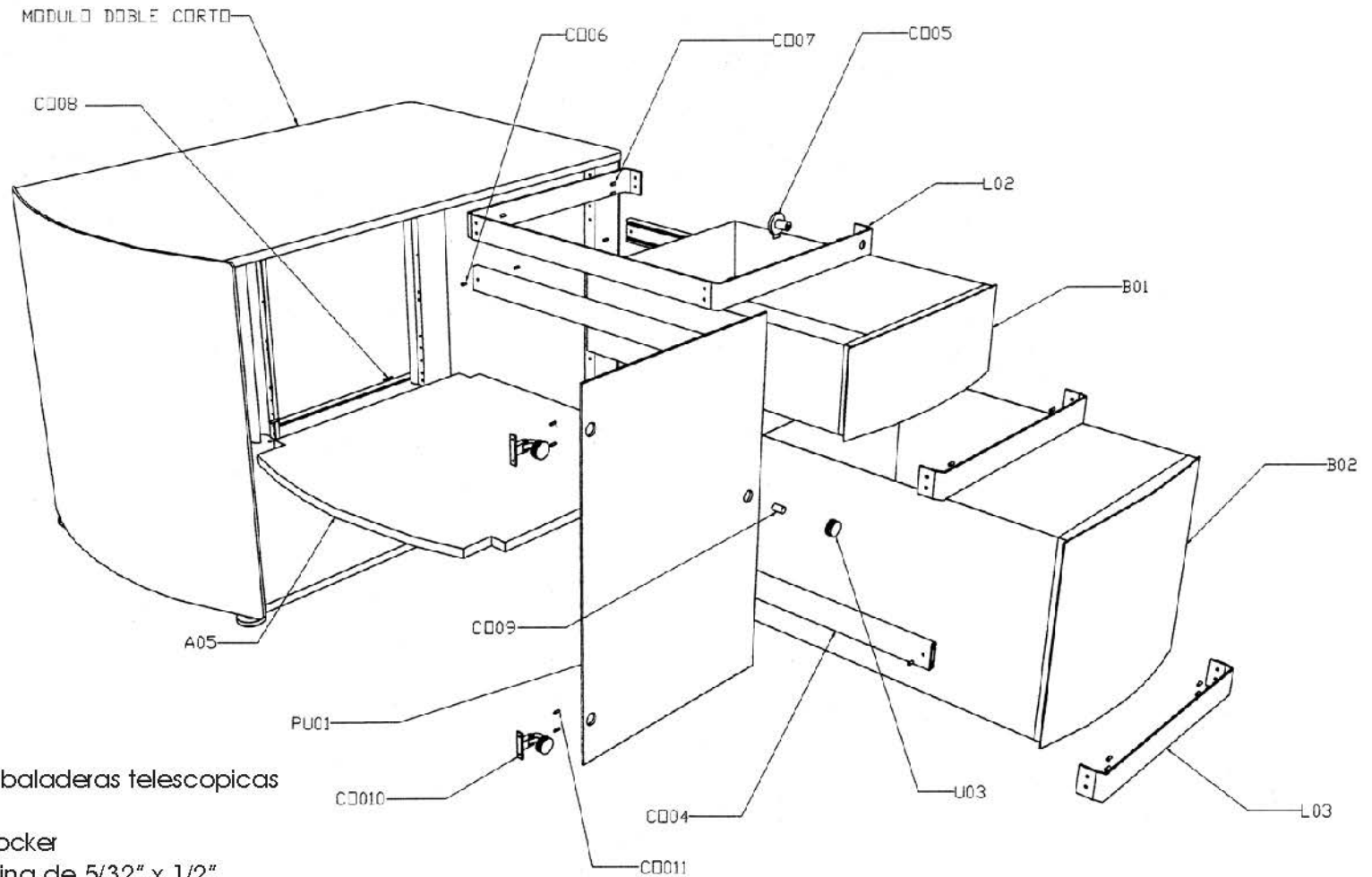
Co01 - 12 tuercas inserto tipo E Zamzck de 1/4" - 20x13mm

Co02 - 8 tornillos conectores de 1/4" x 1/2"

Co03 - 16 tornillos p/lámina de 3/16" x 1/2"

|   |                       |          |   |
|---|-----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> ca   | IXILKA   |  |
|   | despiece modulo doble |          |   |
|  | escala 1:10           | cotas mm | plano 25  |





### PIEZAS COMERCIALES

- Co04 - 4 correderas embaladeras telescopicas de 55cm
- Co05 - cerradura para locker
- Co06 - 16 tornillos p/lámina de 5/32" x 1/2"
- Co07 - 16 tornillos p/lámina de 3/16" x 1/2"
- Co08 - 4 soportes p/repisa de 3/16"
- Co09 - 1 imán pulsador d11mm x 19mm
- Co10 - 2 bisagras p/vidrio de 3/4"
- Co11 - 4 tornillos p/lámina de 1/4" x 1/2"



noe **ceron** roa

IXILKA



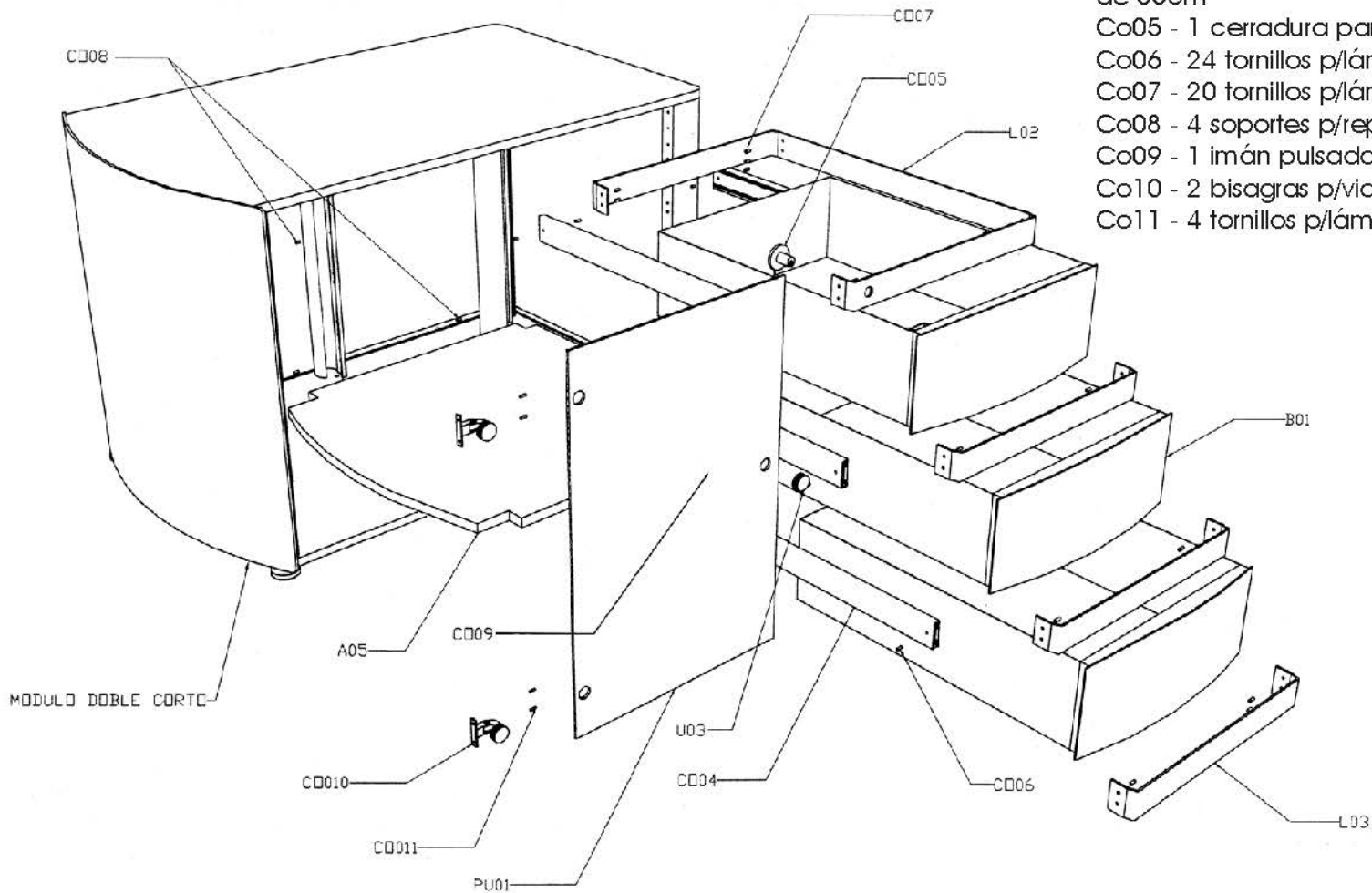
desplece vitrina y archivero



escala 1:10

cotas mm

plano 26

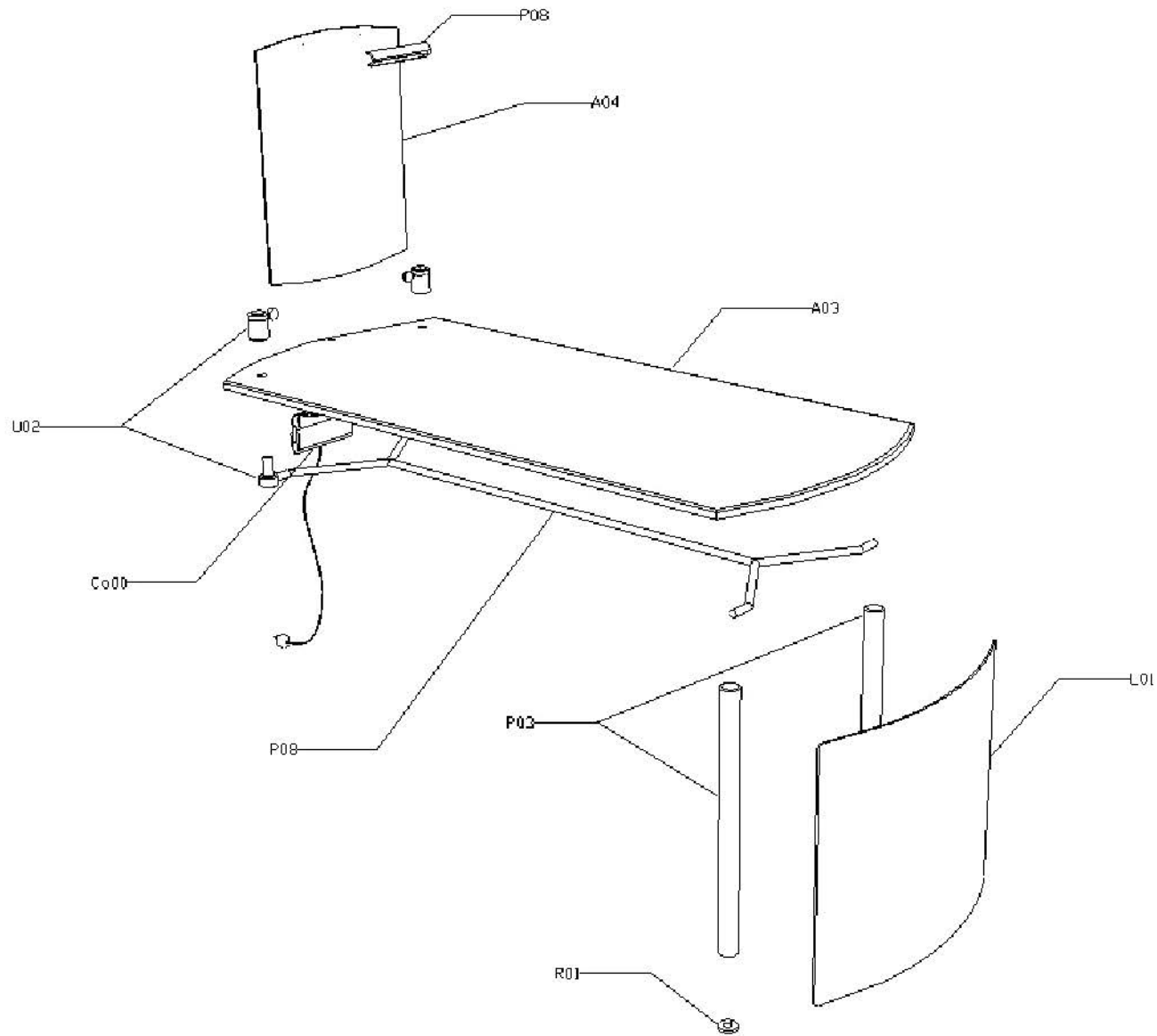


## PIEZAS COMERCIALES

- Co04 - 6 carreteras embaladeras telescopicas de 55cm
- Co05 - 1 cerradura para locker
- Co06 - 24 tornillos p/lámina de 5/32" x 1/2"
- Co07 - 20 tornillos p/lámina de 3/16" x 1/2"
- Co08 - 4 soportes p/repisa de 3/16"
- Co09 - 1 imán pulsador d11mm x 19mm
- Co10 - 2 bisagras p/vidrio de 3/4"
- Co11 - 4 tornillos p/lámina de 1/4" x 1/2"

|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |  |
|   | despiece vitrina y cajonera         |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 27  |





noe **ceron** roa

IXILKA



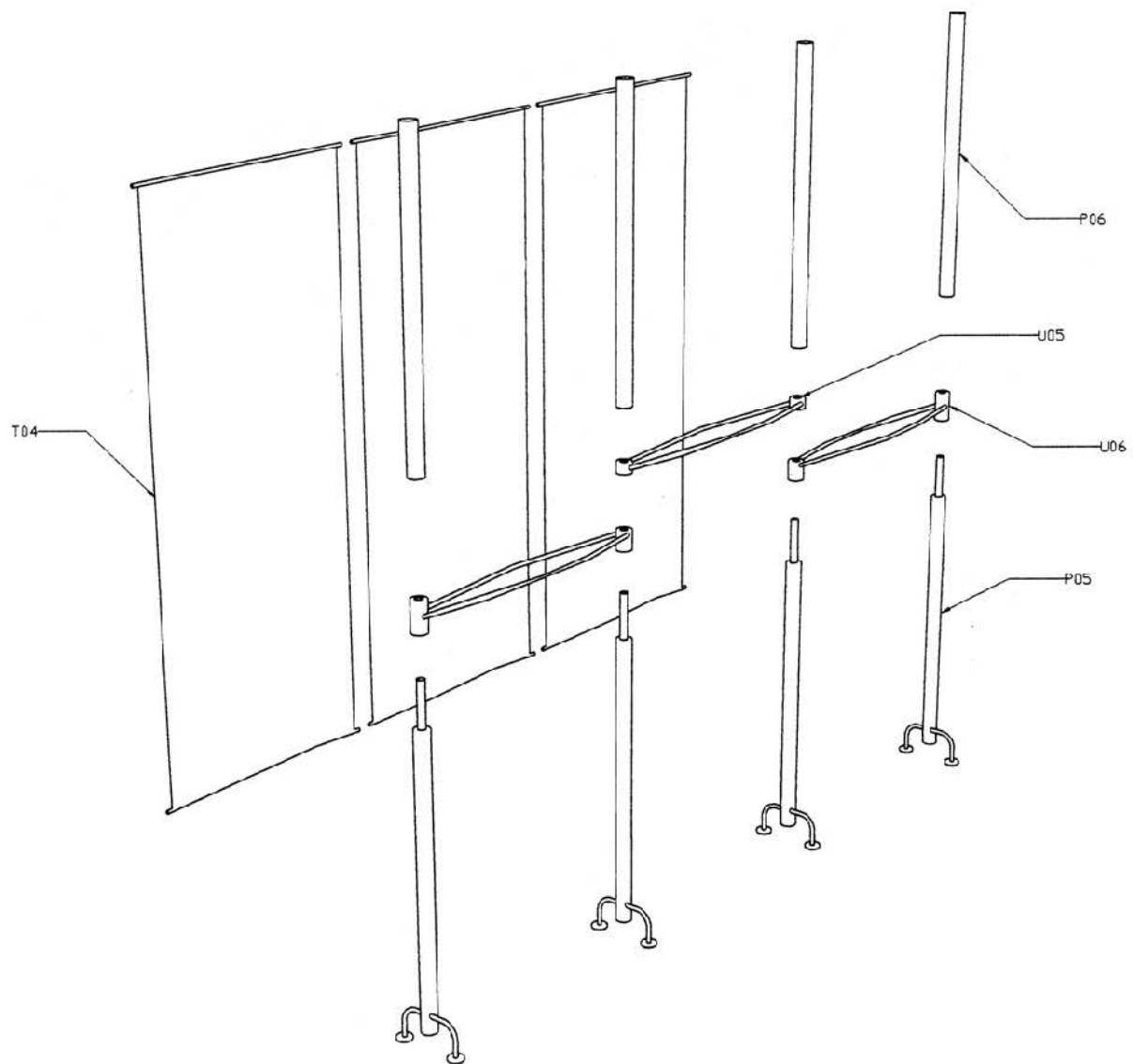
despiece escritorio



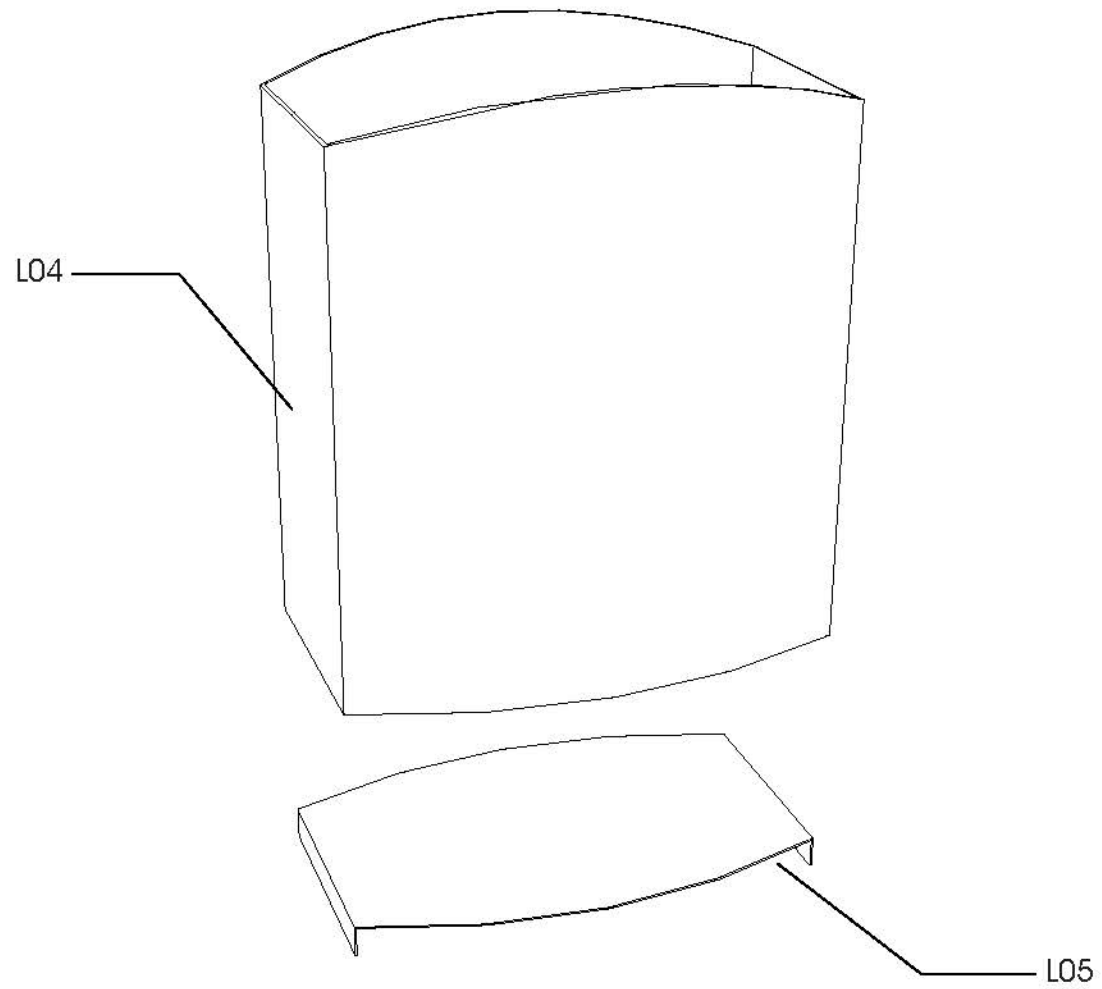
escala 1:10

cotas mm

plano 28



|   |                             |          |   |
|---|-----------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <i>roa</i> | IXILKA   |  |
|   | despiece biombo             |          |   |
|  | escala 1:20                 | cotas mm | plano 29  |



noe **ceron** roa

IXILKA



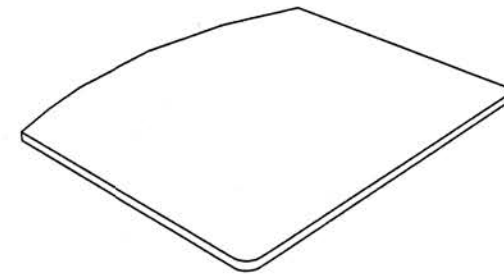
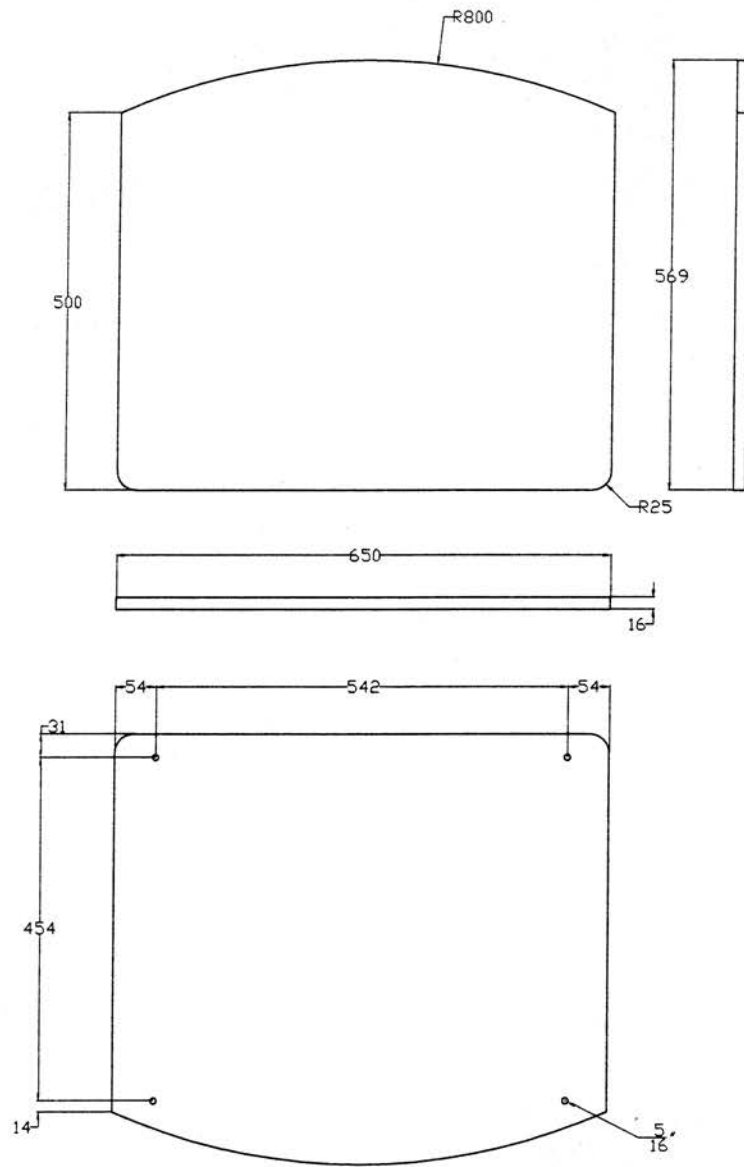
despiece basurero



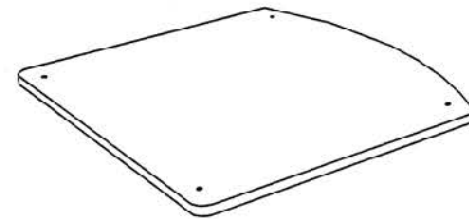
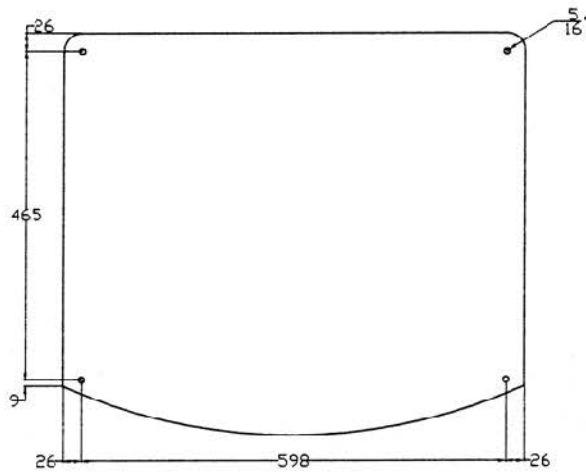
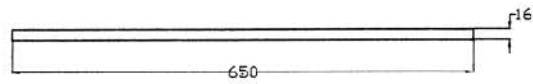
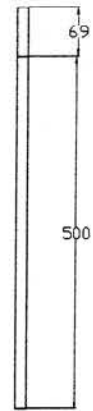
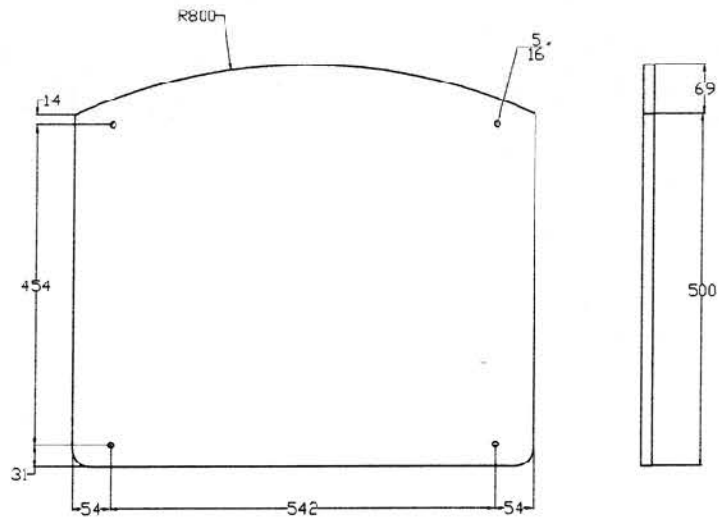
escala 1:10

cotas mm

plano 30



|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |  |
|   | A01                                 |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 31  |



noe **ceron** roa

IXILKA

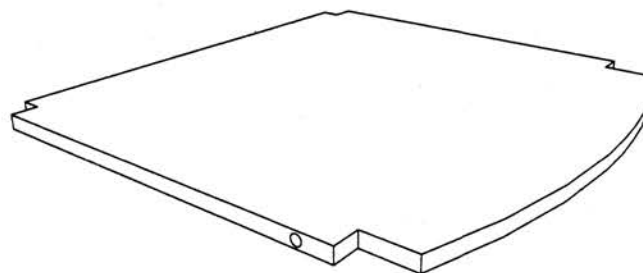
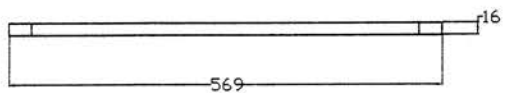
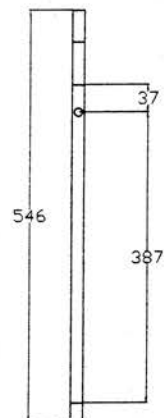
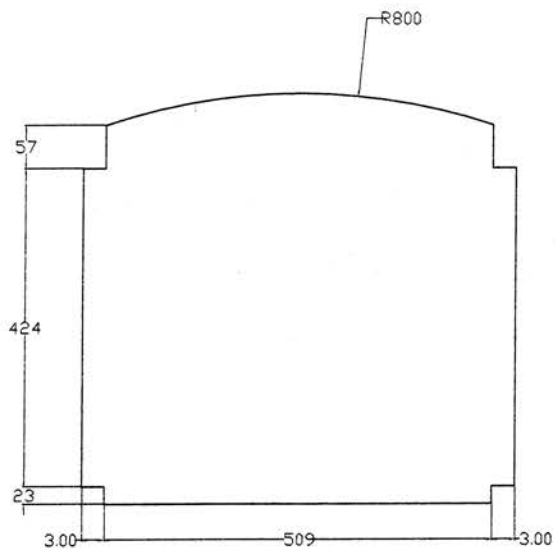
A02



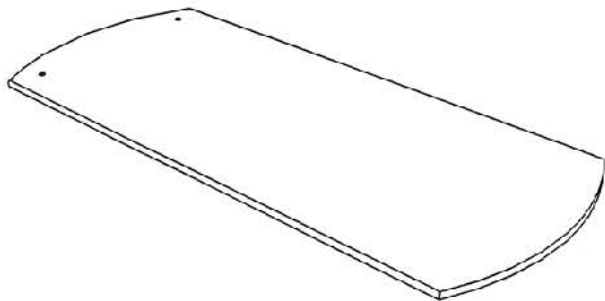
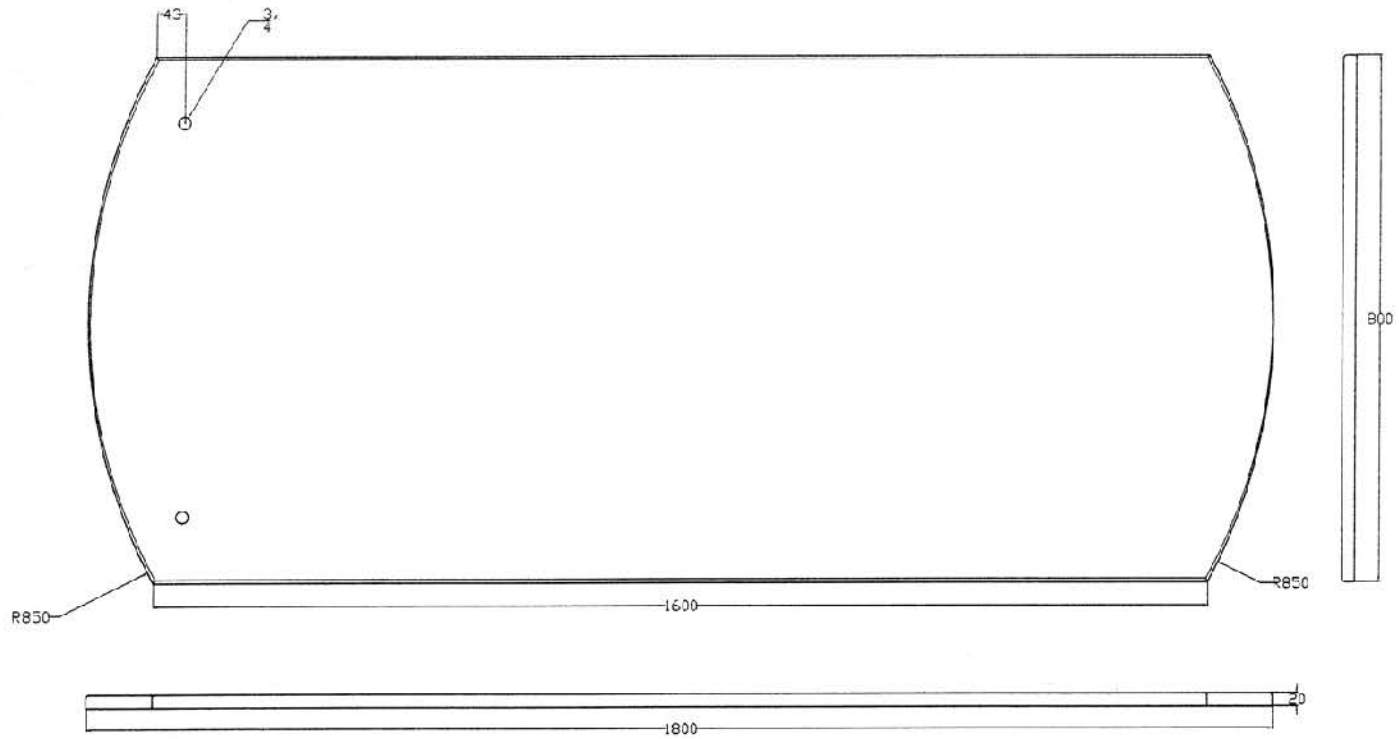
escala 1:10

cotas mm

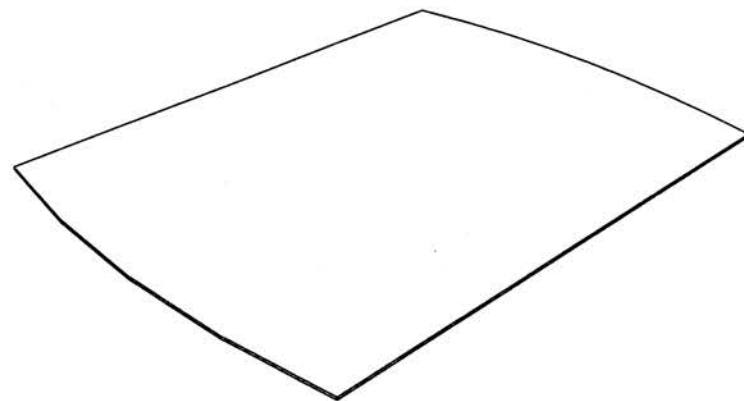
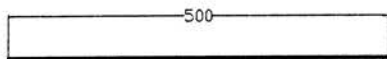
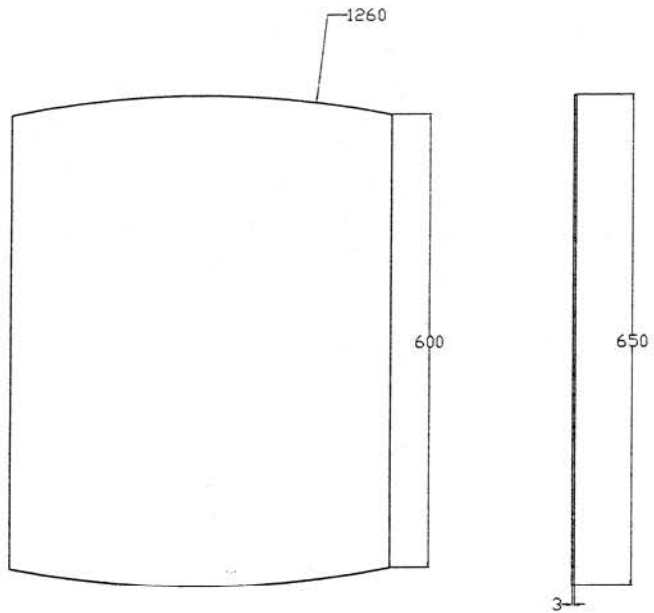
plano 32



|  |                                     |               |          |
|--|-------------------------------------|---------------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | <b>IXILKA</b> |          |
|  | A05                                 |               |          |
|  | escala 1:10                         | cotas mm      | plano 33 |

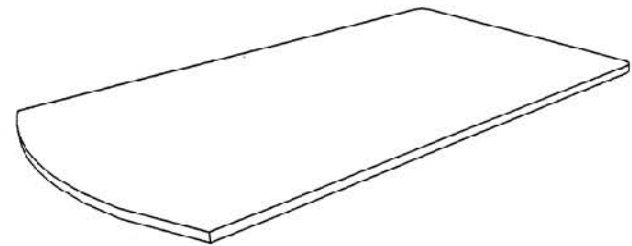
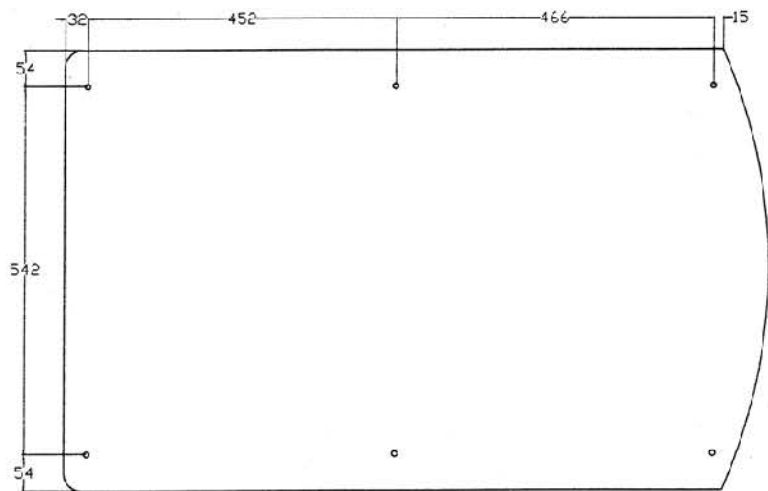
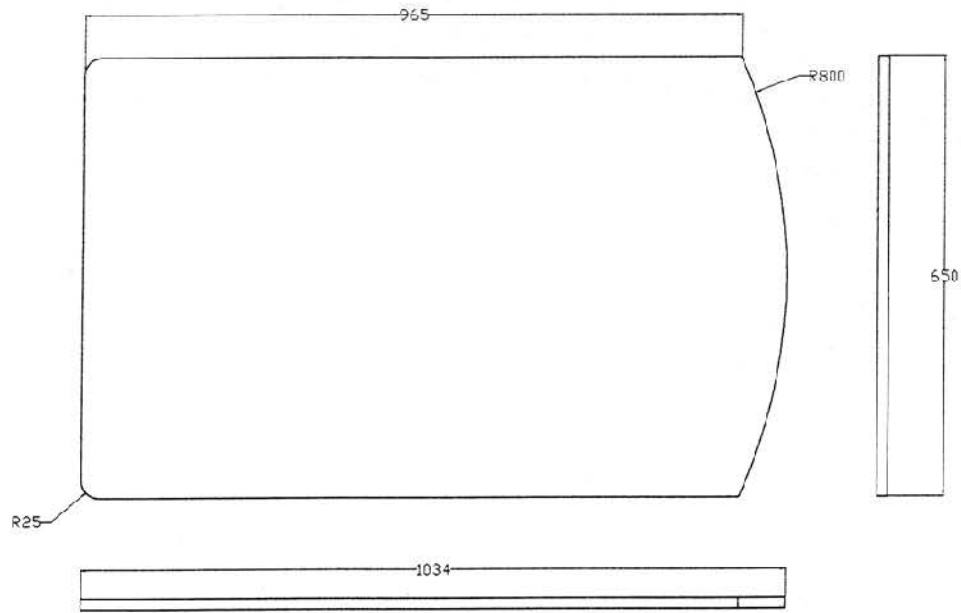


|   |                      |          |   |
|---|----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |  |
|   | A03                  |          |   |
|  | escala 1:10          | cotas mm | plano 34  |



|   |                      |          |   |
|---|----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> o.a | IXILKA   |  |
|   | A04                  |          |   |
|  | escala 1:10          | cotas mm | plano 35  |





noe **ceron** roa

IXILKA



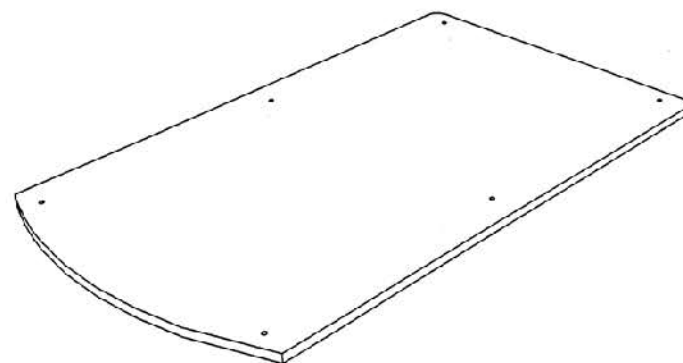
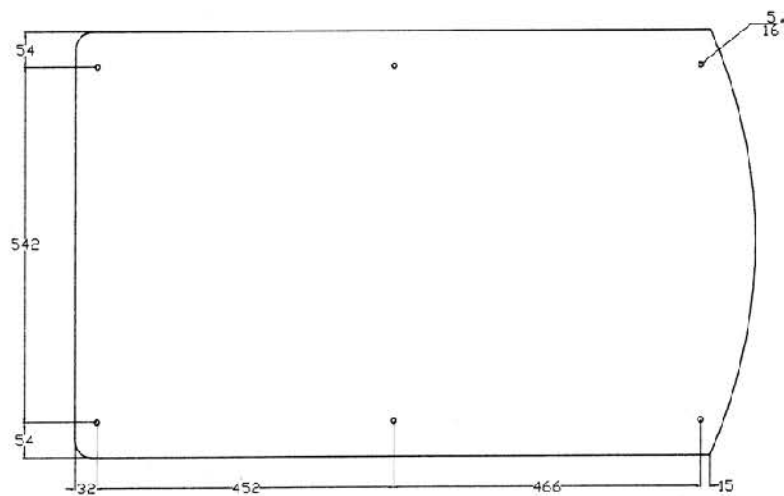
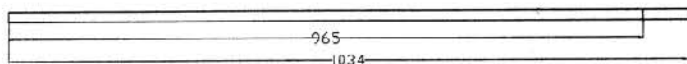
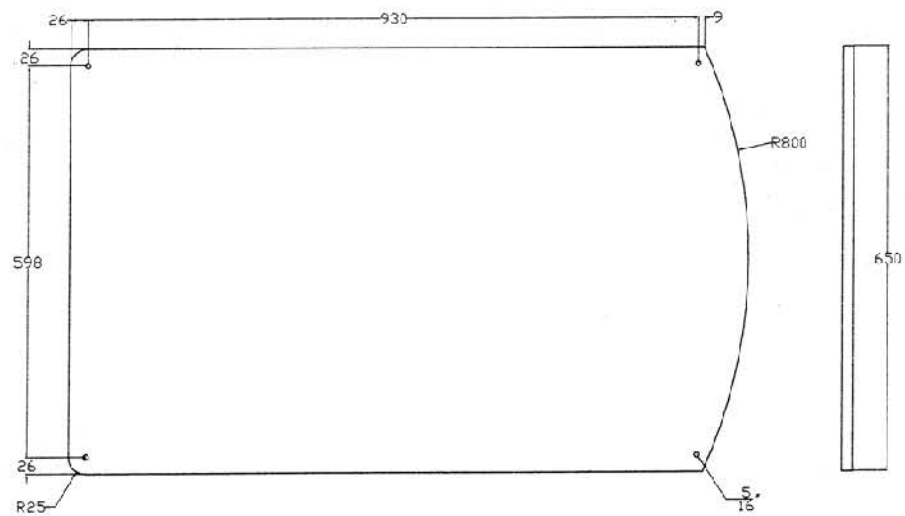
A09



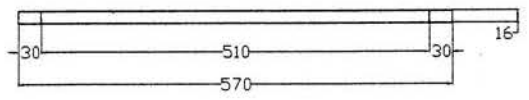
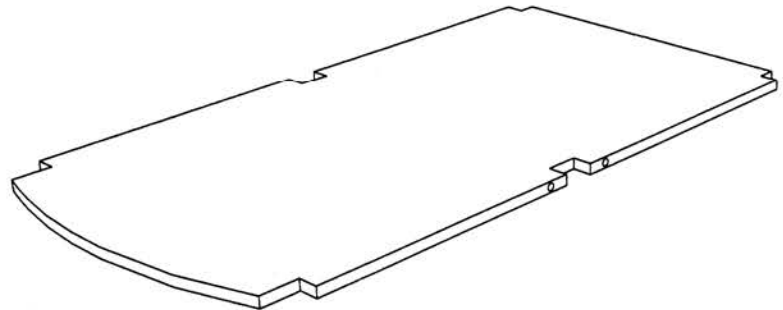
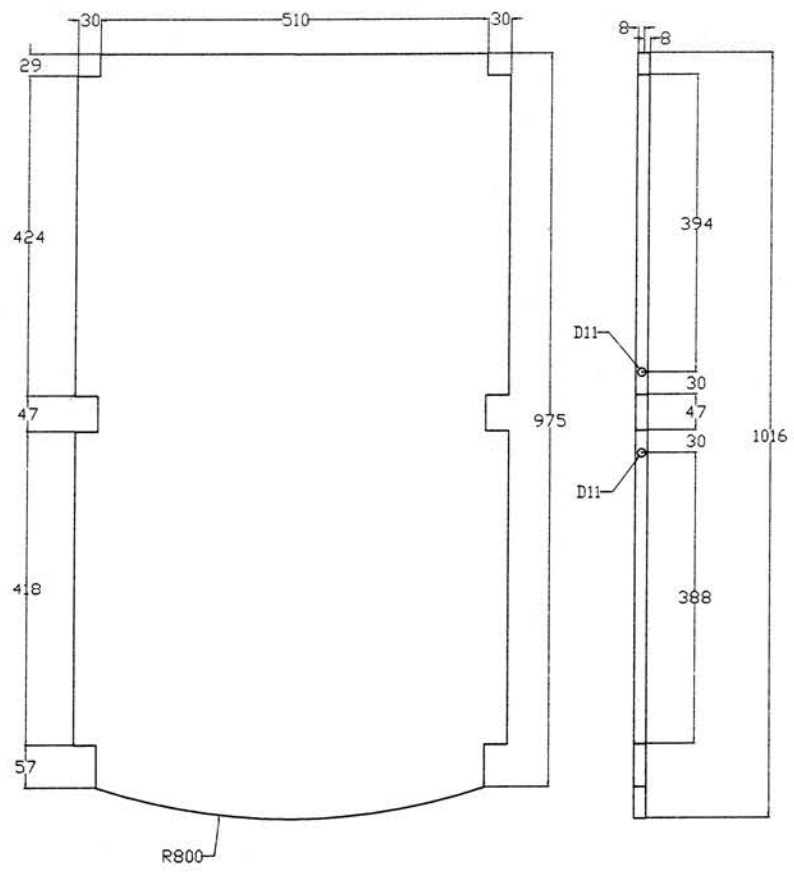
escala 1:10




cotas mm

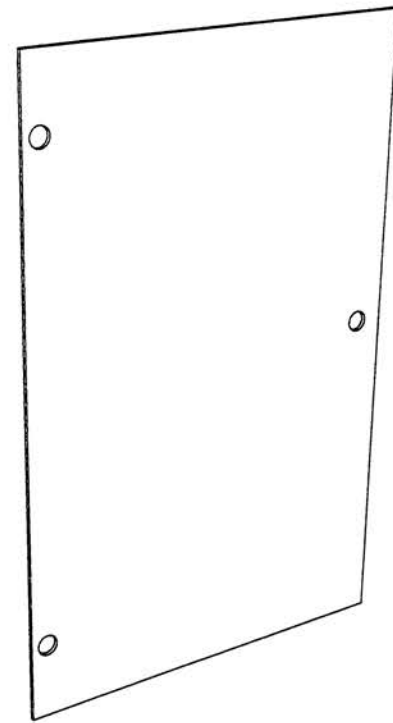
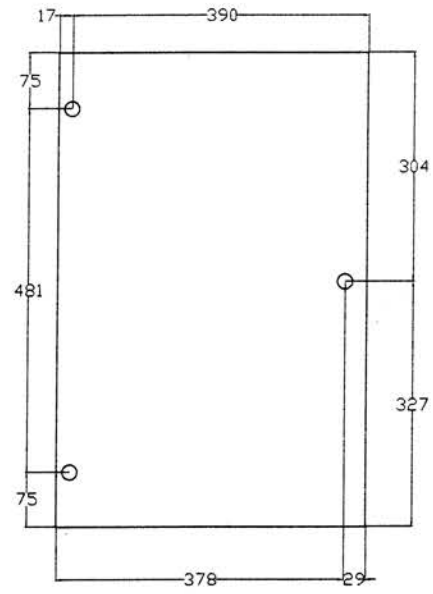
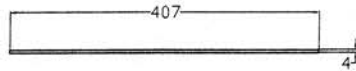
plano 36



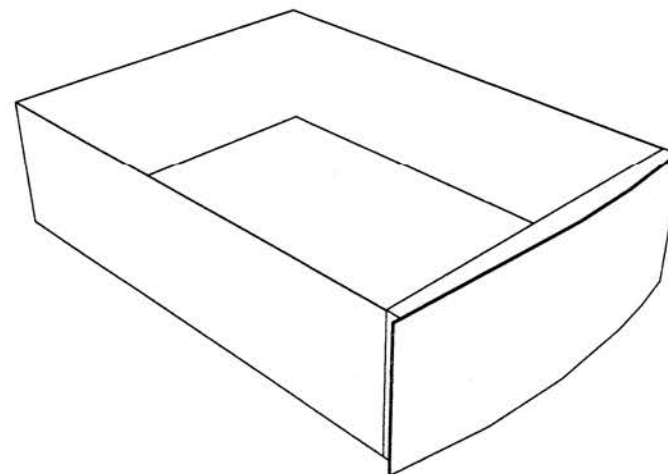
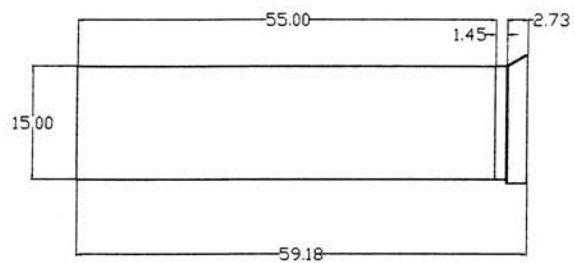
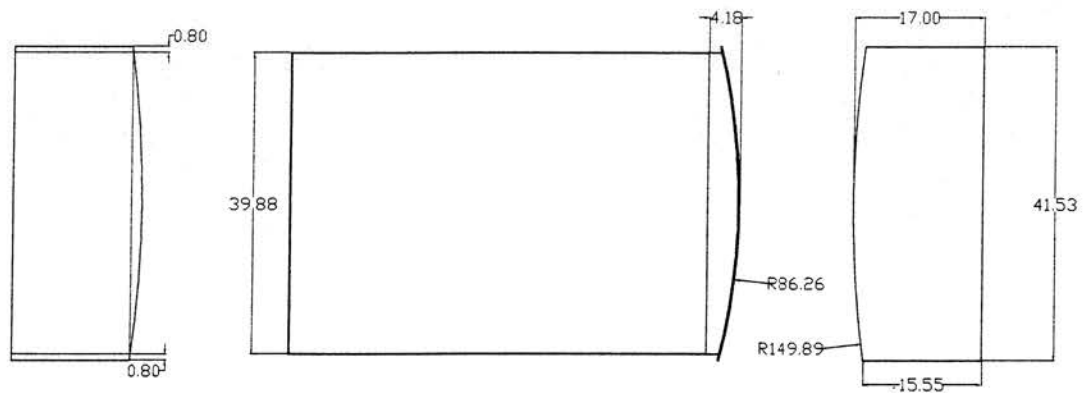
|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>o.a</small> | IXILKA   |  |
|   | A07                                 |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 37  |



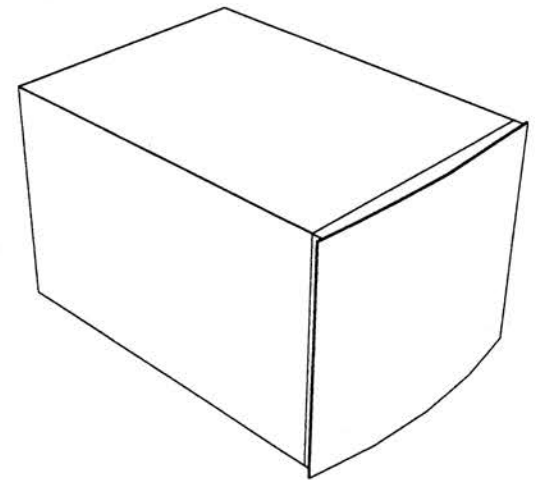
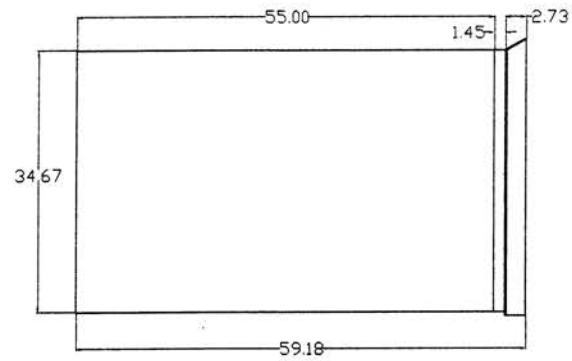
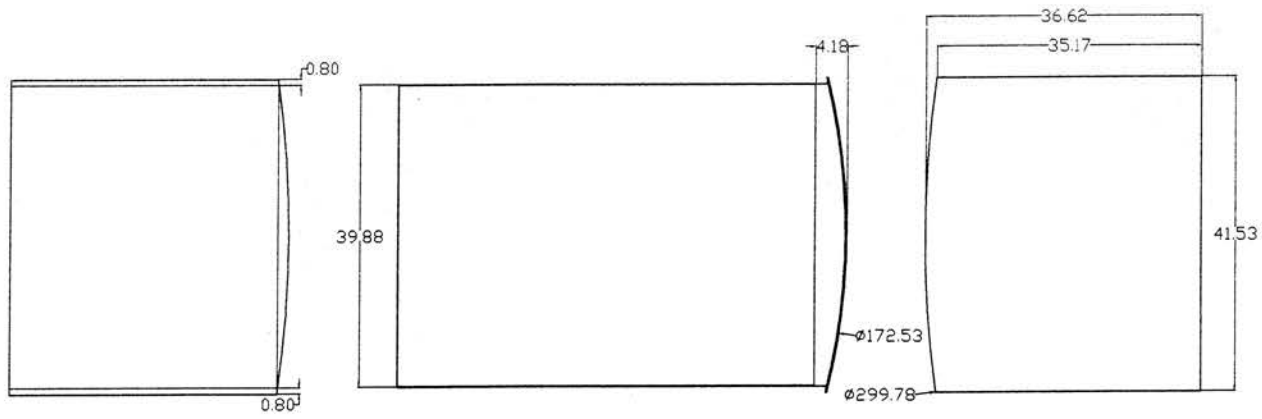
|   |                      |          |   |
|---|----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |  |
|   | A08                  |          |   |
|  | escala 1:10          | cotas mm | plano38   |






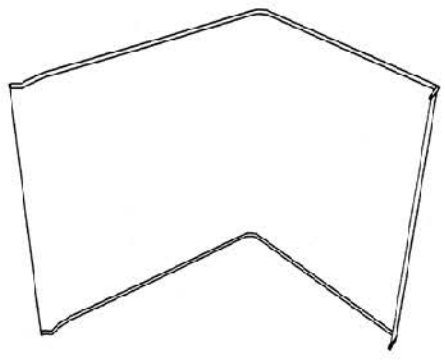
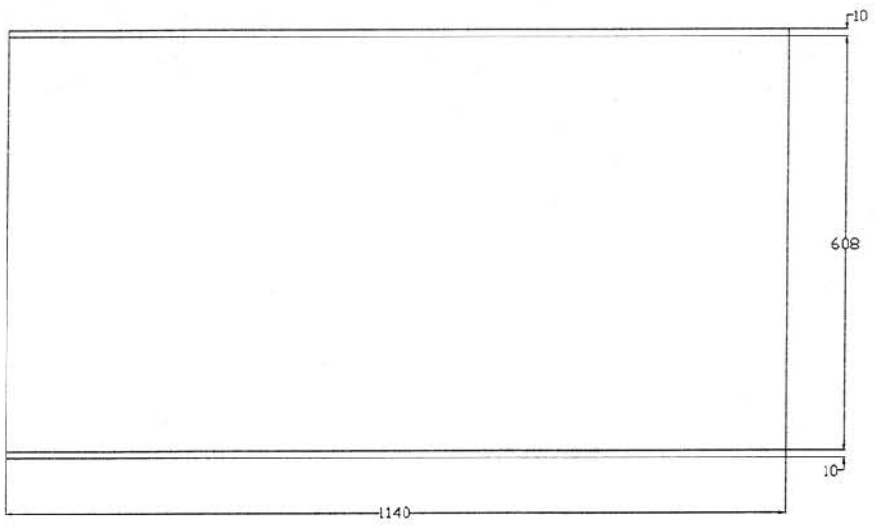
|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |  |
|   | PU01                                |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 39  |



|  |                             |          |          |
|--|-----------------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> <i>roa</i> | IXILKA   |          |
|  | BOT                         |          |          |
|  | escala 1:10                 | cotas mm | plano 40 |

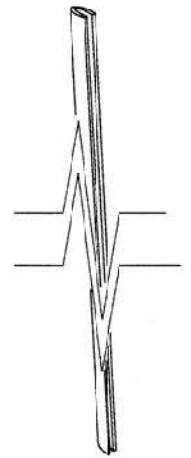
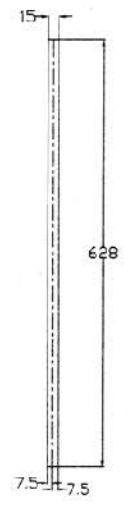


|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>rod</small> | IXILKA   |  |
|   | B02                                 |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 41  |

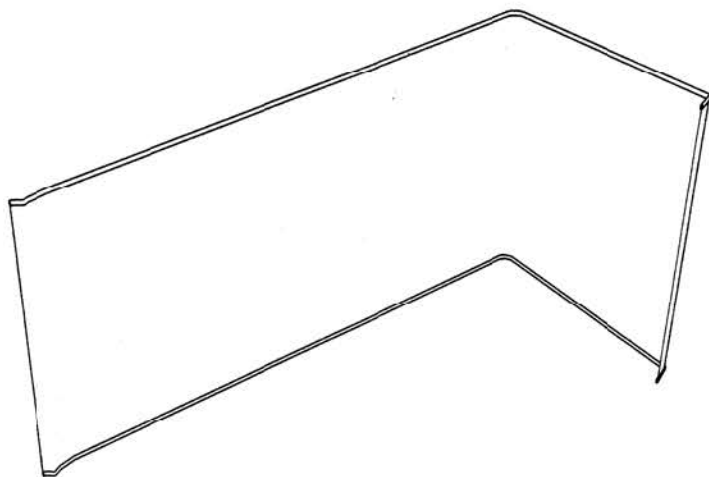
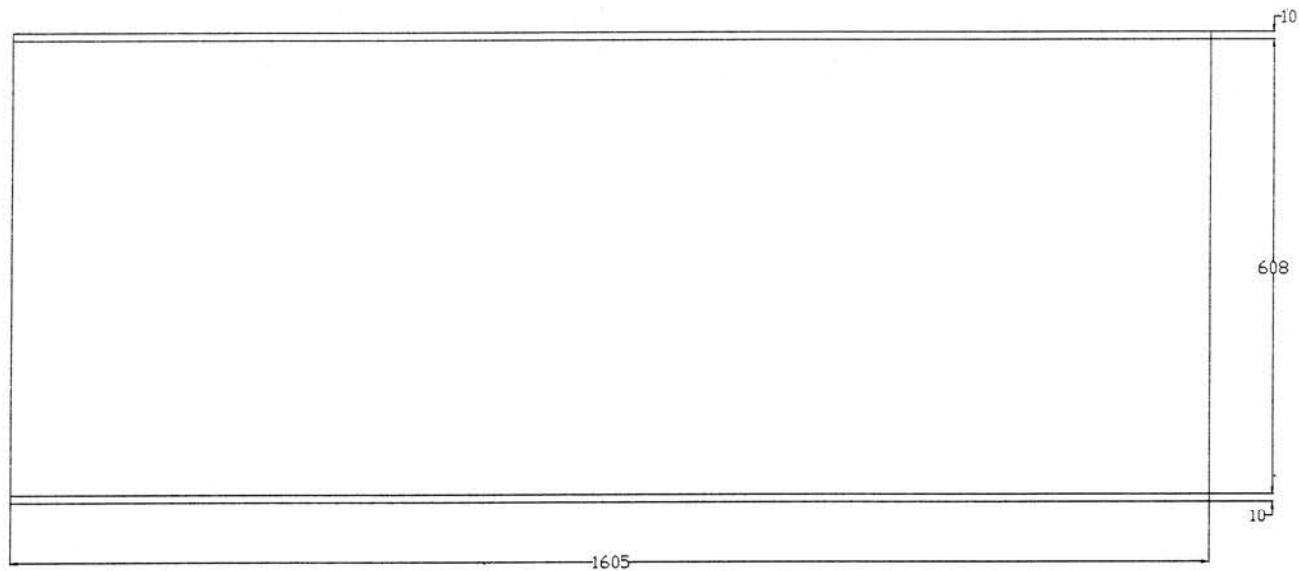





T01

T02

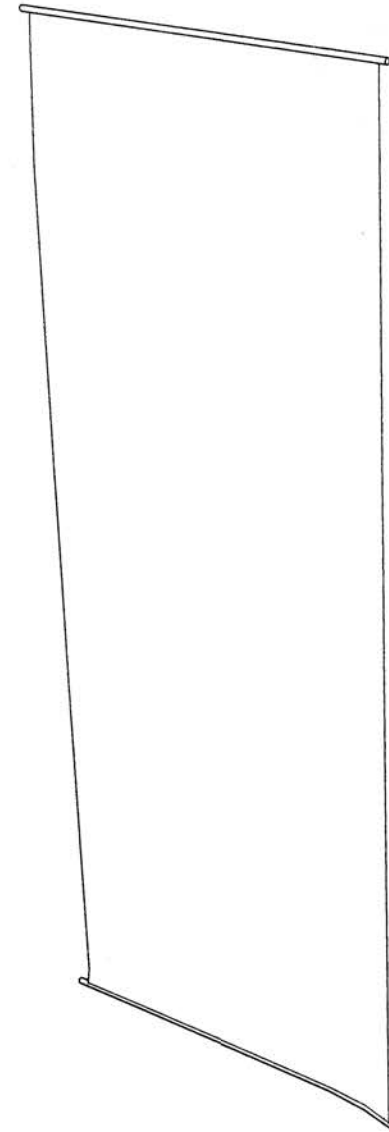
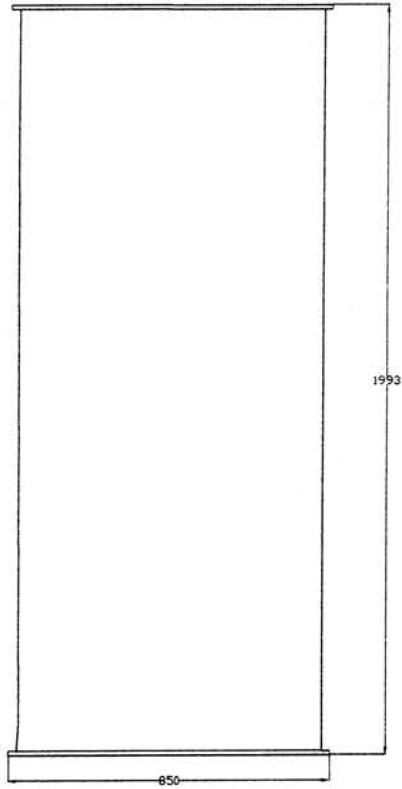


|  |                                     |          |          |
|--|-------------------------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |          |
|  | T01 / T02                           |          |          |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 42 |



|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |  |
|   | T03                                 |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 43  |





noe **ceron** roa

IXILKA



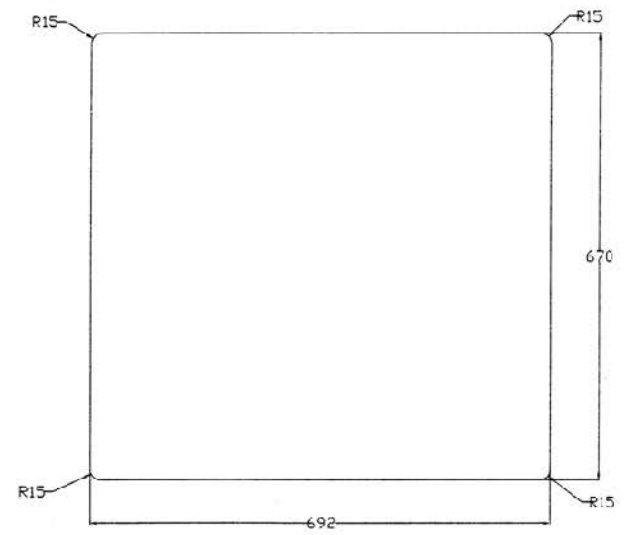
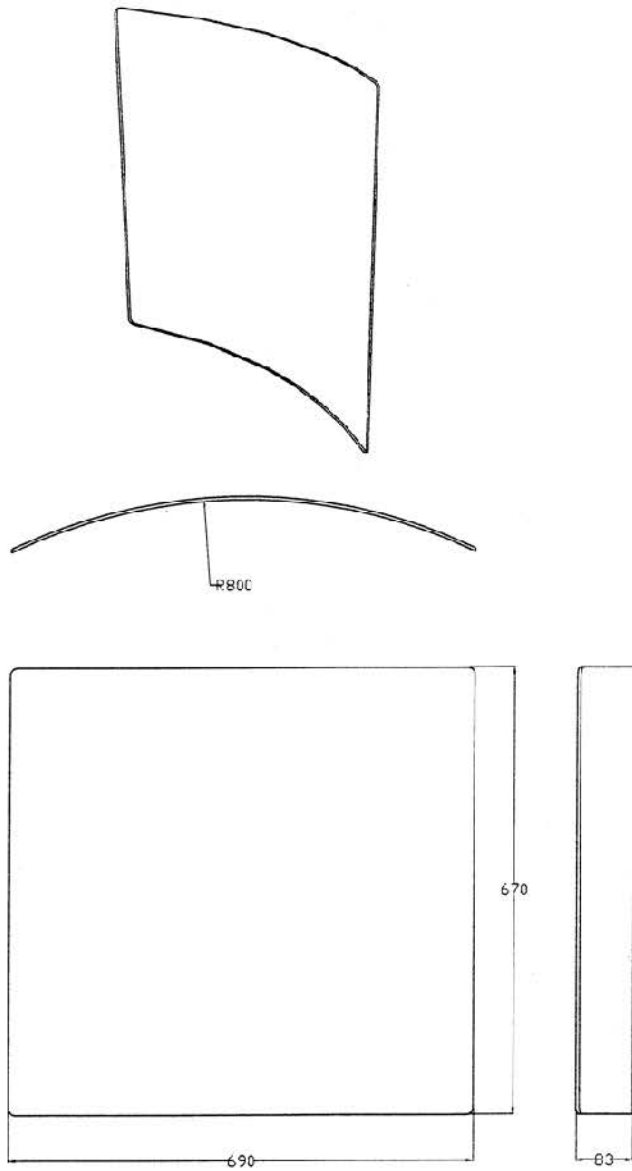
T04






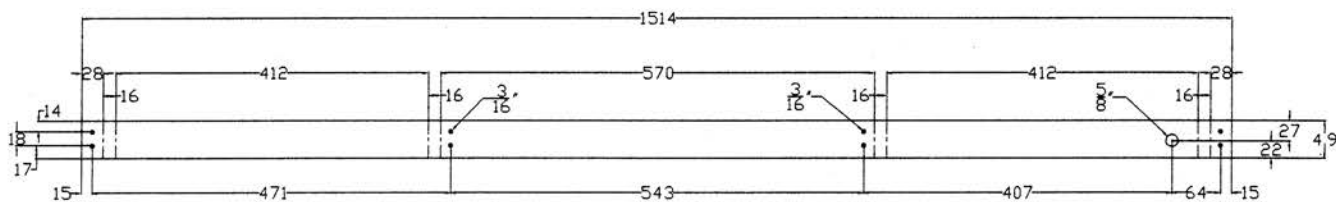
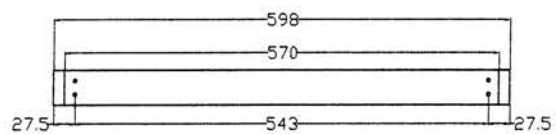
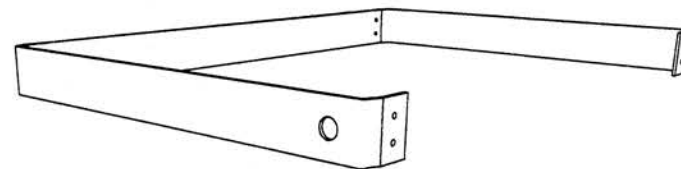
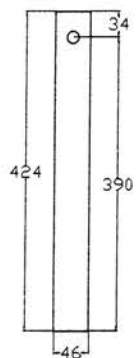
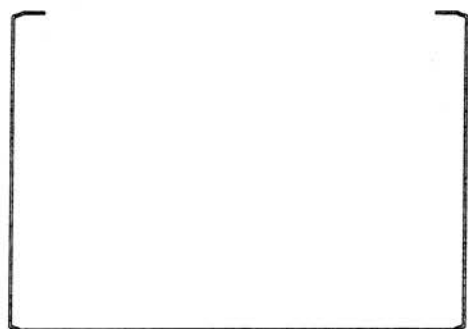
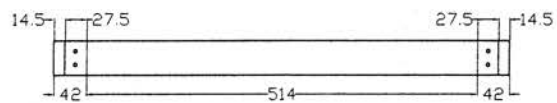
escala 1:20

cotas mm

plano 44



|   |                                     |               |   |
|---|-------------------------------------|---------------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>o.a</small> | <b>IXILKA</b> |  |
|   | L01                                 |               |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm      | plano 45  |



noe<sup>ce</sup>ron<sup>roa</sup>

IXILKA



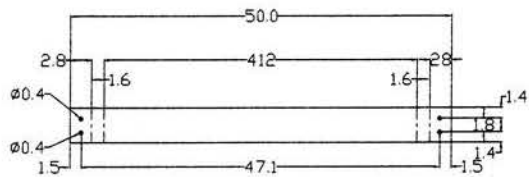
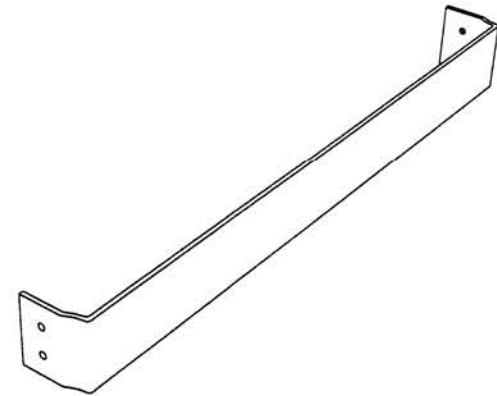
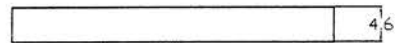
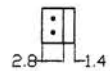
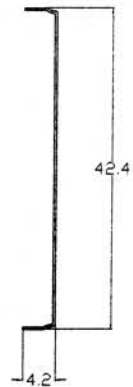
L02



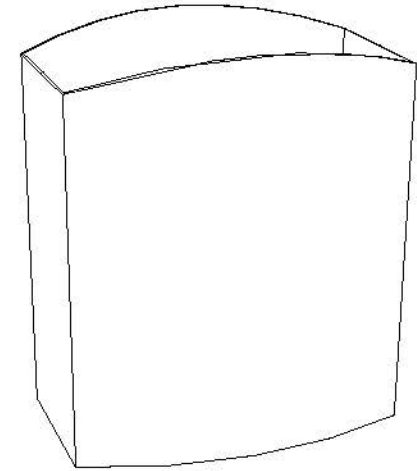
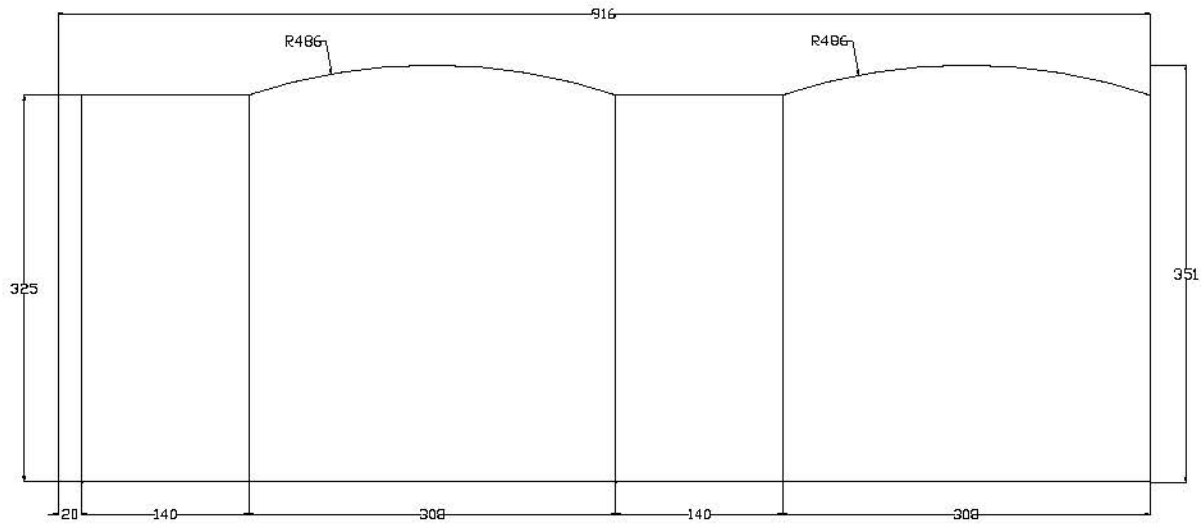
escala 1:10

cotas mm

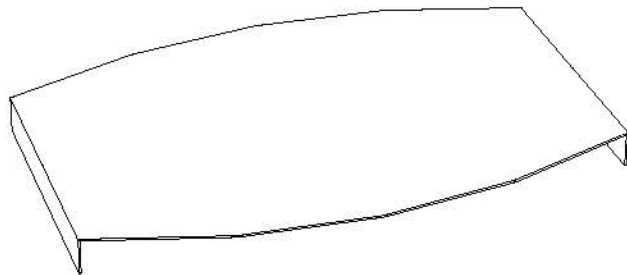
plano 46



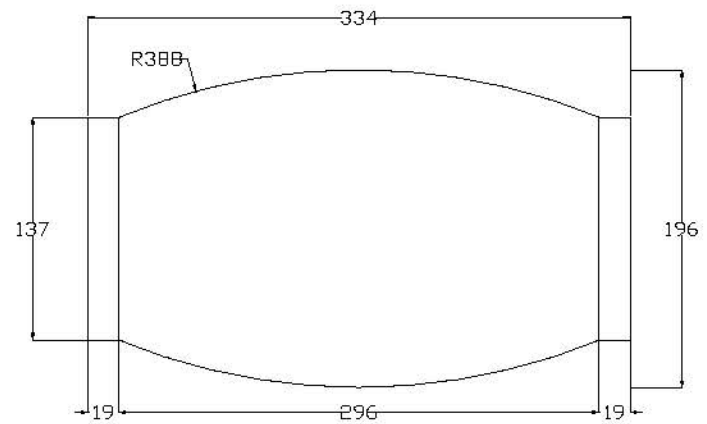
|   |                                    |          |   |
|---|------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>ro</small> | IXILKA   |  |
|   | L03                                |          |   |
|  | escala 1:10                        | cotas mm | plano 47  |



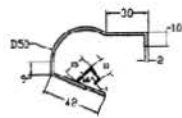
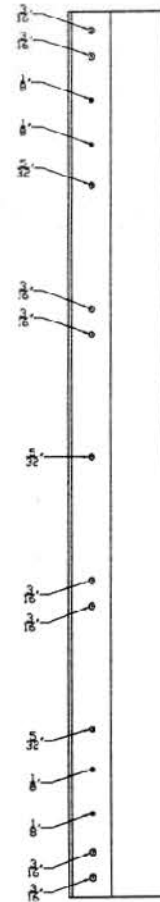
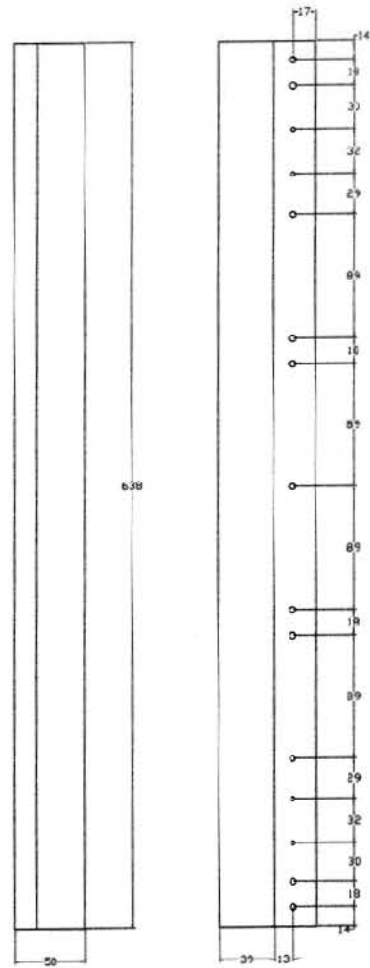
L04



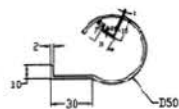
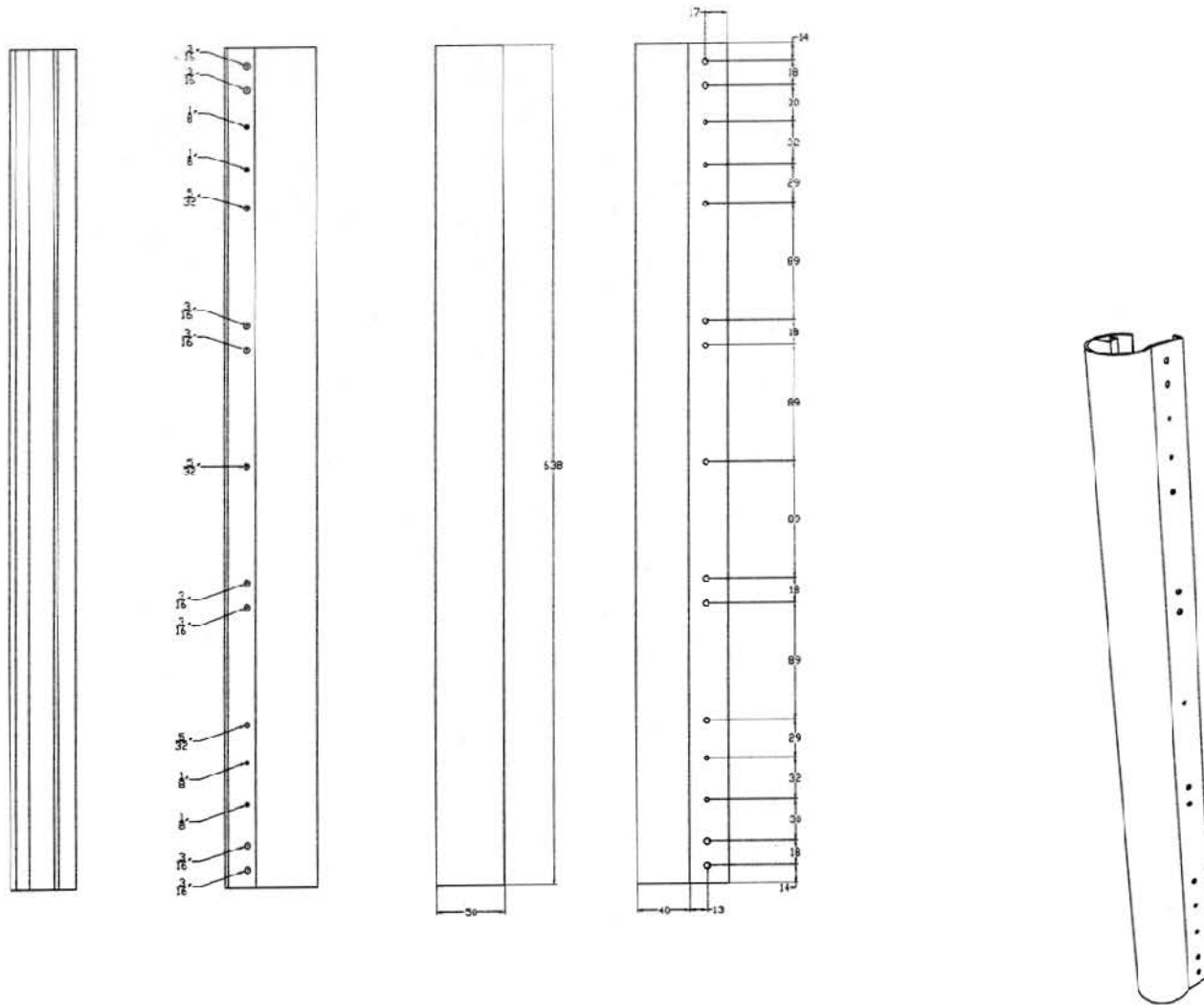
L05



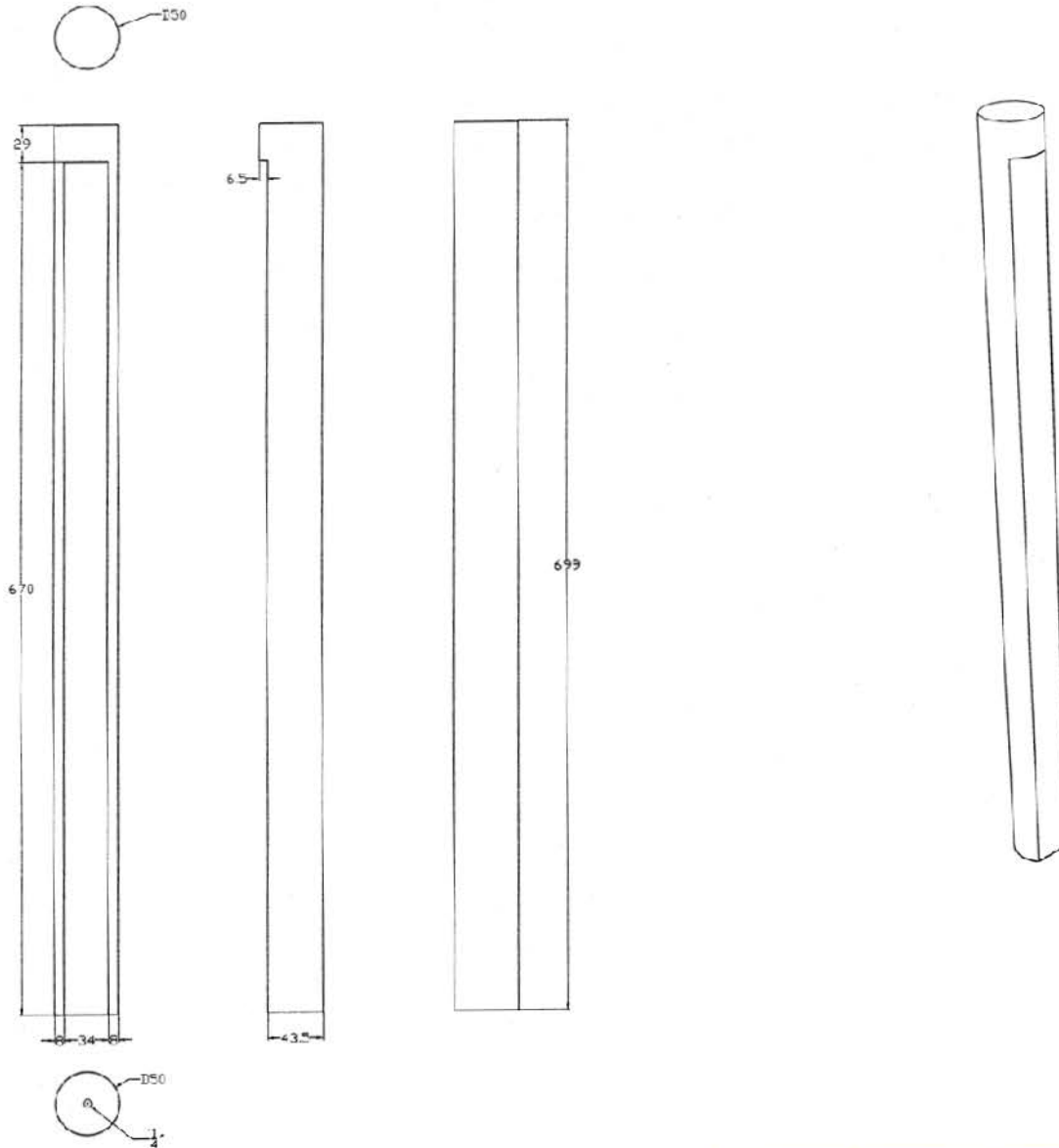
|  |                                     |          |          |
|--|-------------------------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |          |
|  | L04 / L05                           |          |          |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 48 |



|  |                        |          |          |
|--|------------------------|----------|----------|
|  | niceceron <sup>®</sup> | IXILKA   |          |
|  | P01                    |          |          |
|  | escala 1:5             | cotas mm | plano 49 |

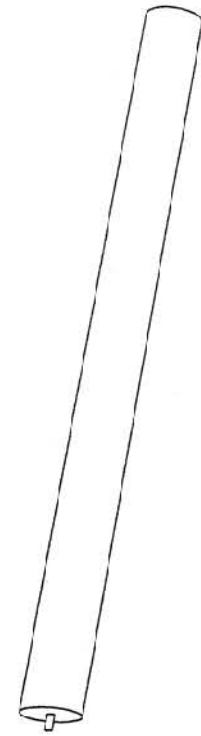
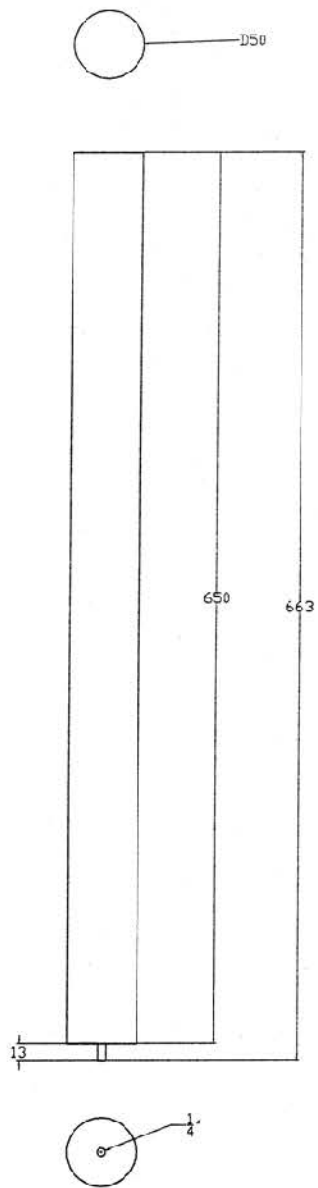


|  |                      |          |          |
|--|----------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |          |
|  | P02                  |          |          |
|  | escala 1:5           | cotas mm | plano 50 |

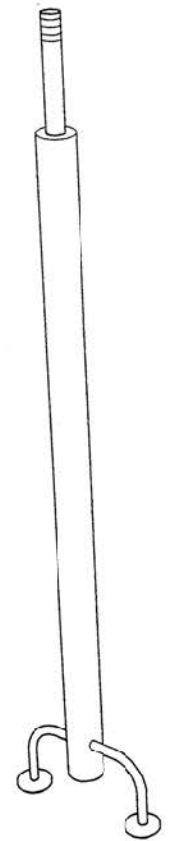
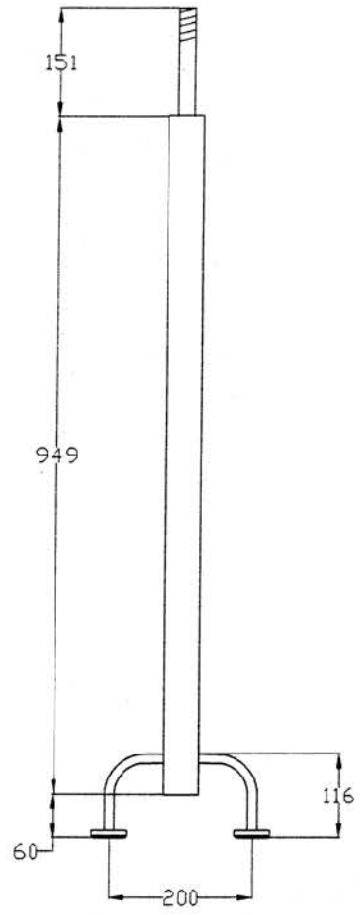
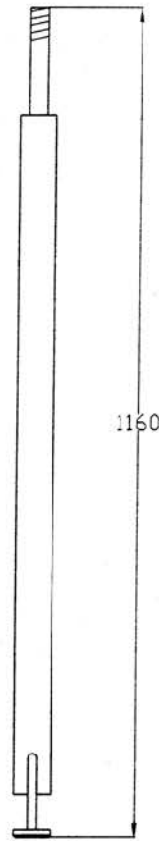
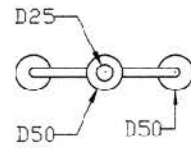


|  |              |          |          |
|--|--------------|----------|----------|
|  | niceceronrod | IXILKA   |          |
|  | P03          |          |          |
|  | escala 1:5   | cotas mm | plano 51 |

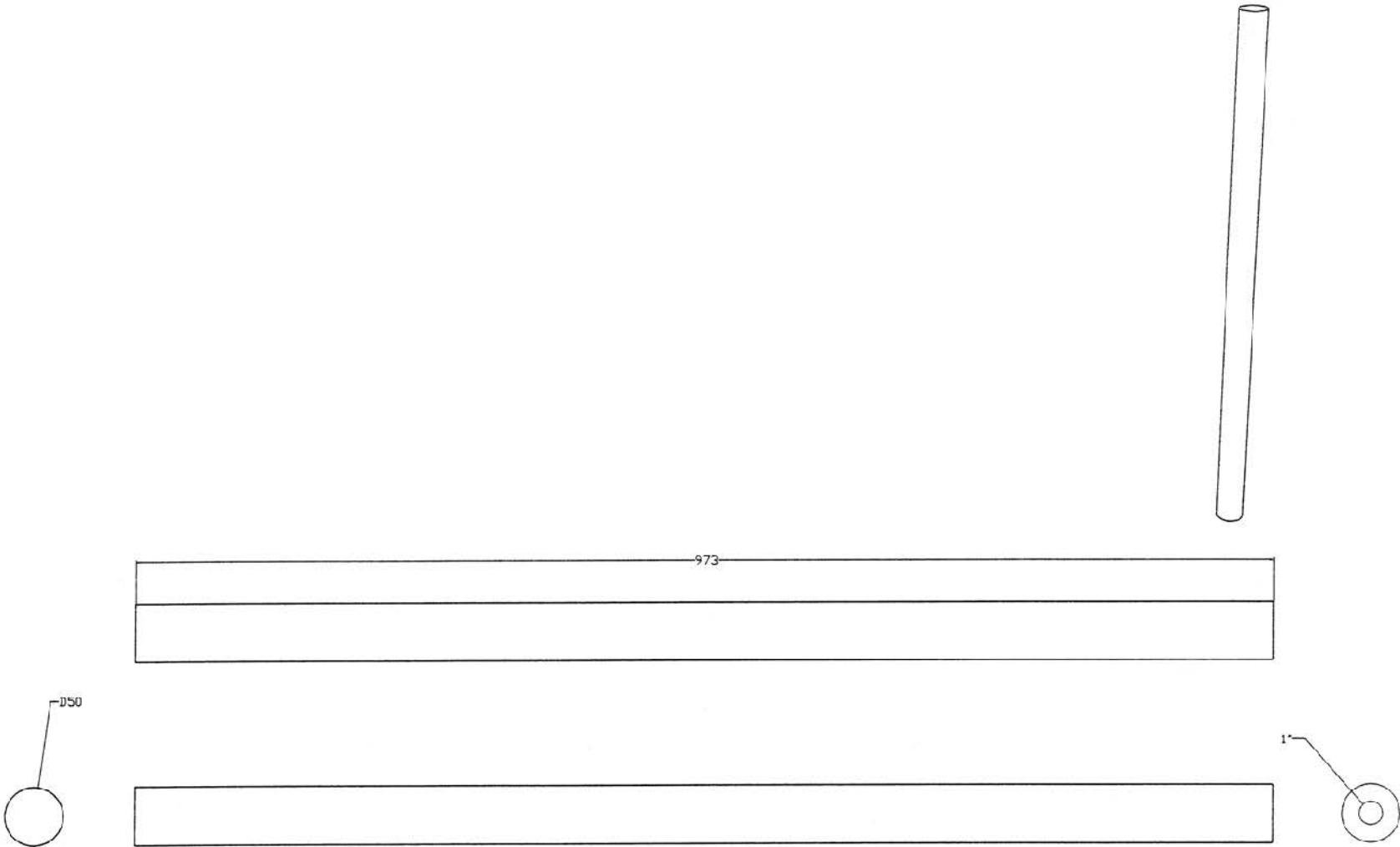




|  |                      |          |          |
|--|----------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> rod | IXILKA   |          |
|  | P04                  |          |          |
|  | escala 1:5           | cotas mm | plano 52 |



|  |                                     |               |          |
|--|-------------------------------------|---------------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | <b>IXILKA</b> |          |
|  | P05                                 |               |          |
|  | escala 1:10                         | cotas mm      | plano 53 |



noe **ceron** rod

IXILKA



P06

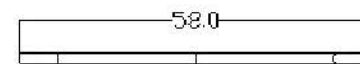
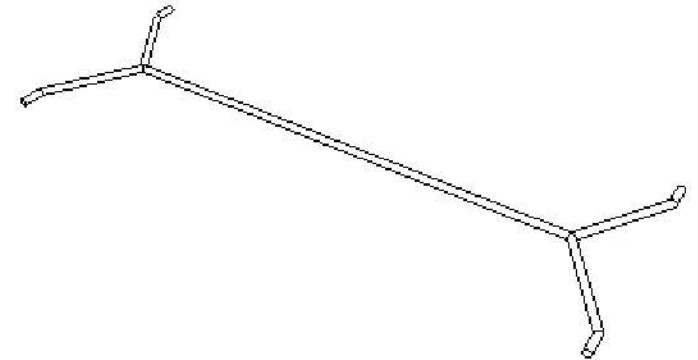
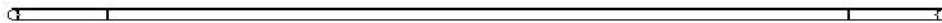
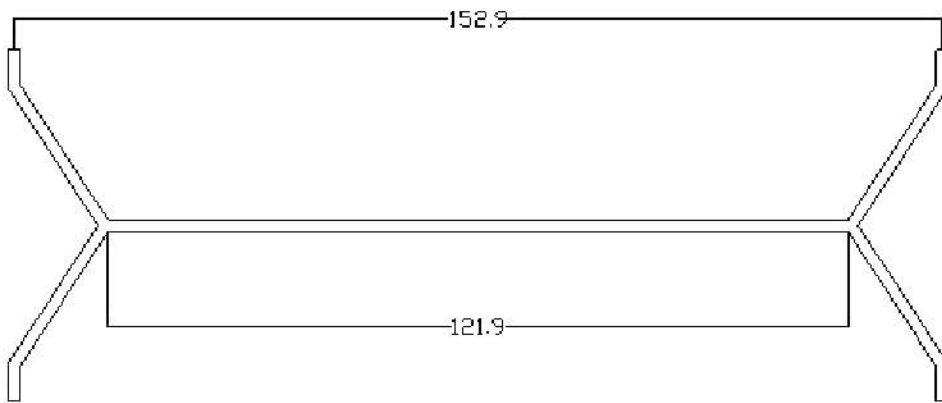


escala 1:5

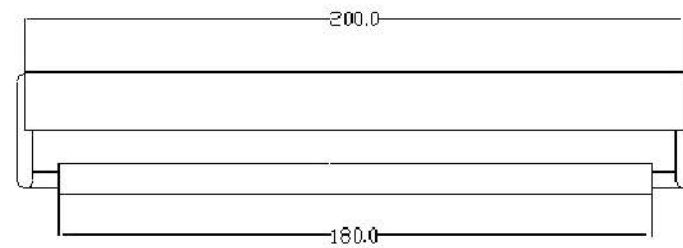
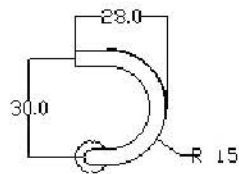
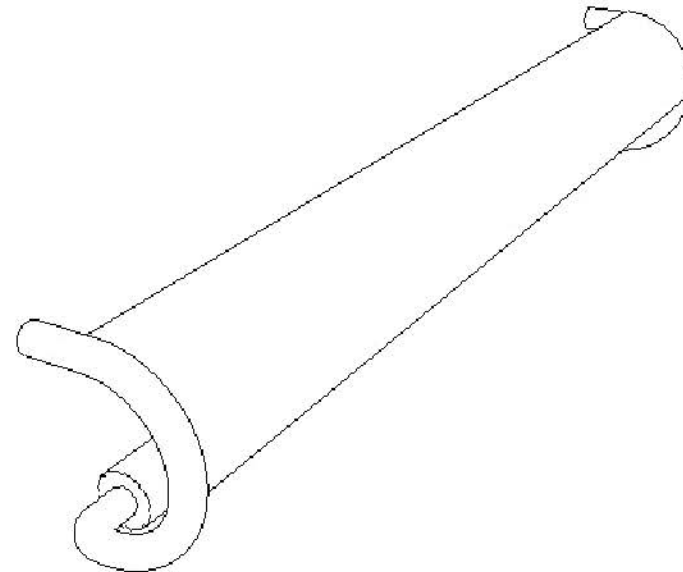
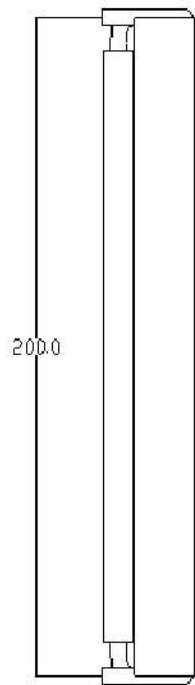
cotas mm

plano 54





|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>o.a</small> | IXILKA   |  |
|   | P07                                 |          |   |
|  | escala 1:10                         | cotas mm | plano 55  |



noe **ceron** *roa*

IXILKA

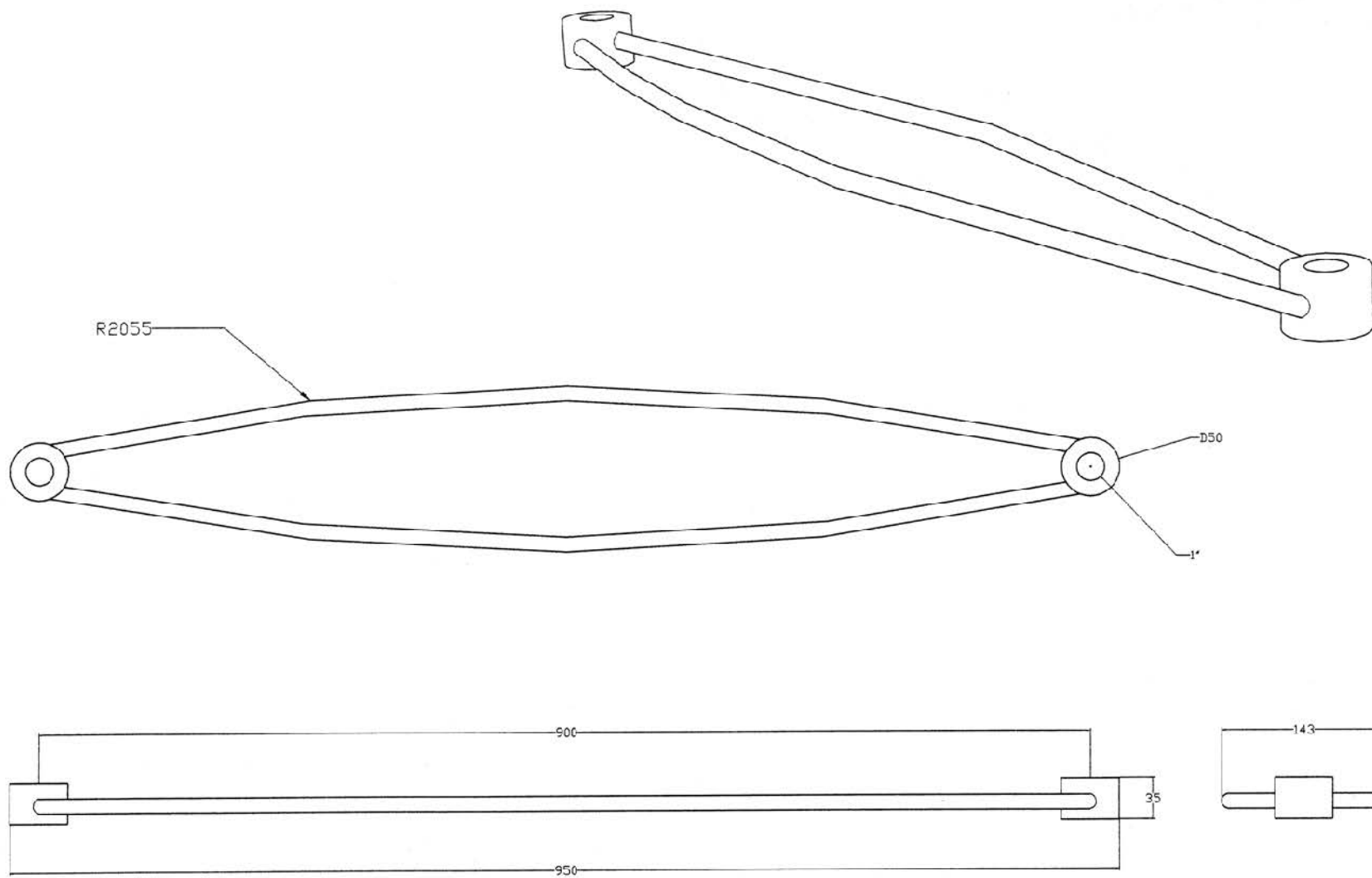
P08






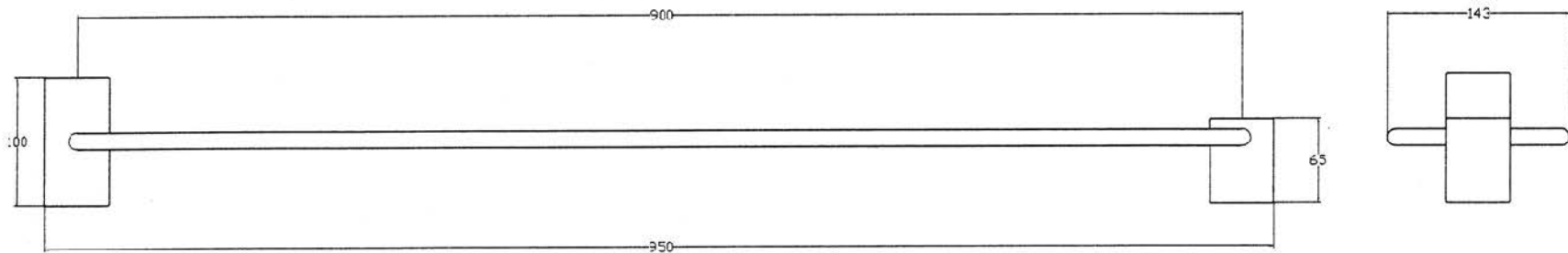
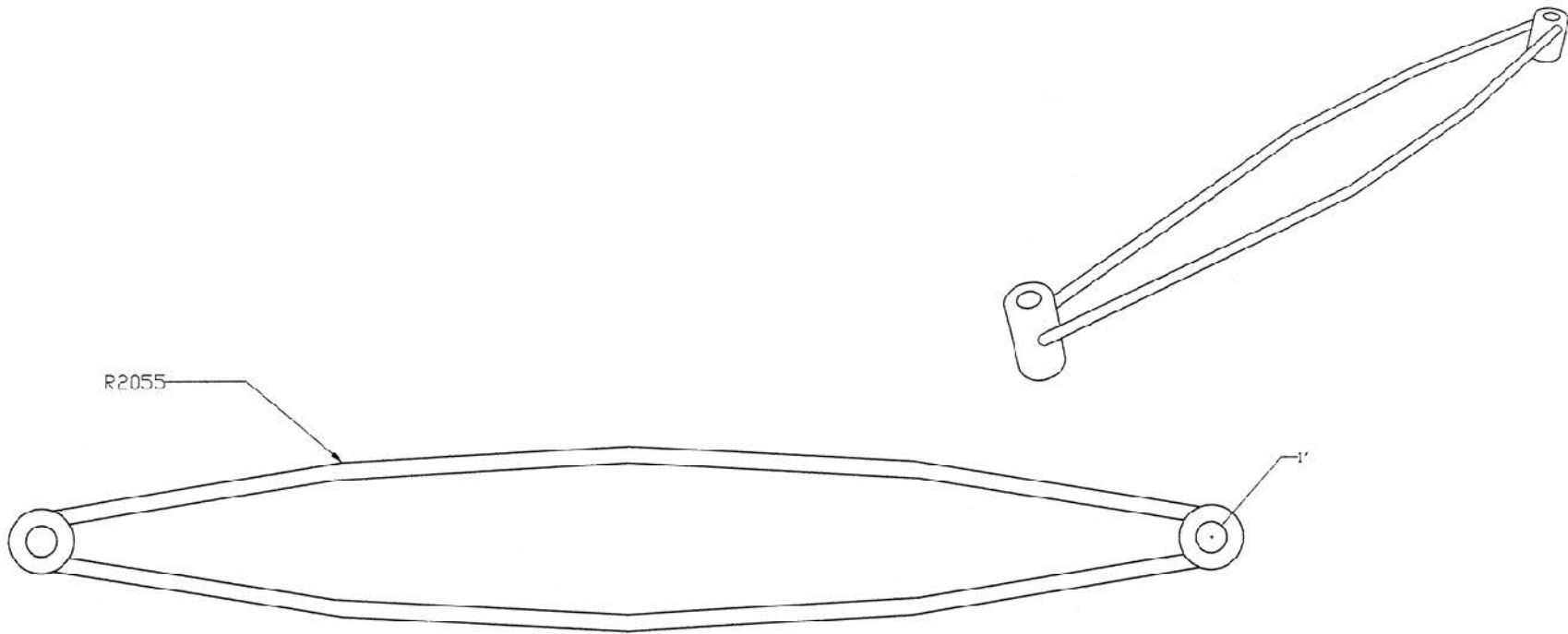
escala 1:2

cotas mm

plano 56



|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>roa</small> | IXILKA   |  |
|   | U05                                 |          |   |
|  | escala 1:5                          | cotas mm | plano 57  |



noe **ceron** roa

IXILKA



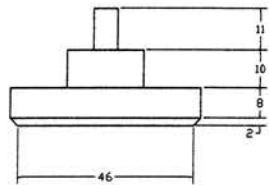
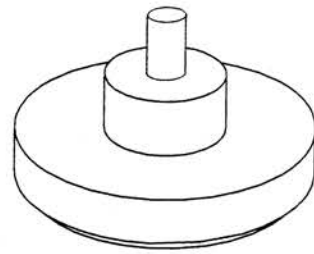
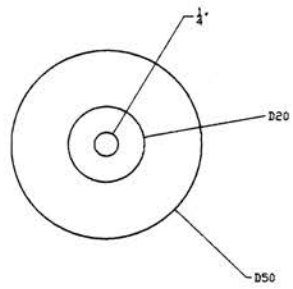
U04



escala 1:5

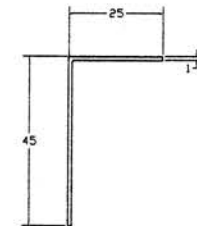
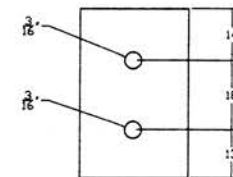
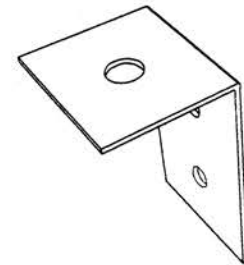
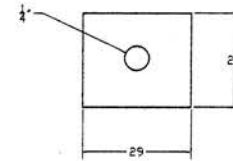
cotas mm

plano 58



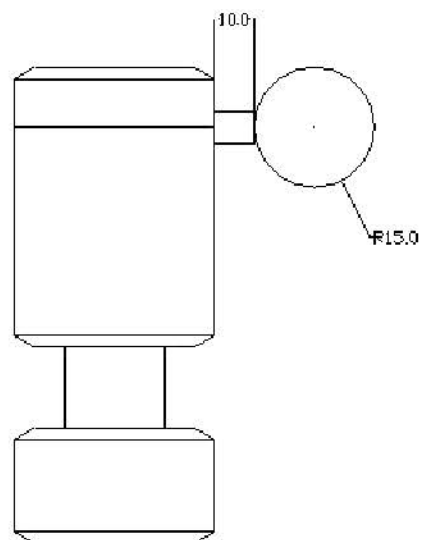
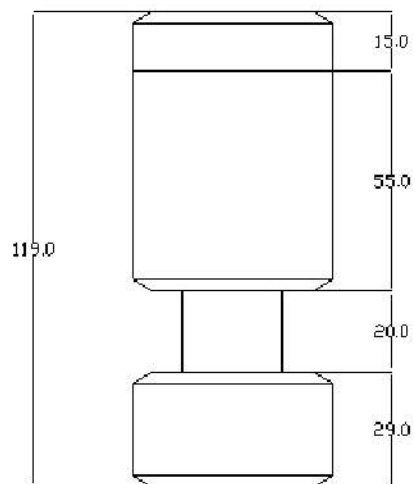
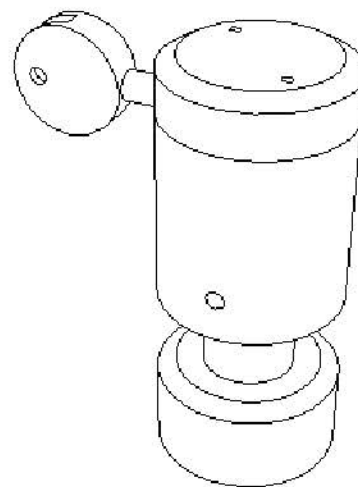
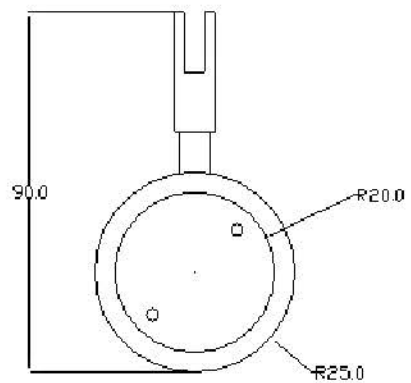
R01

U01



|   |                      |          |   |
|---|----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> oda | IXILKA   |  |
|   | U01 / R01            |          |   |
|  | escala 1:2           | cotas mm | plano 59  |





noe **ceron** roa

IXILKA



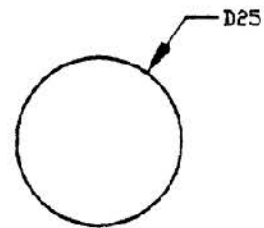
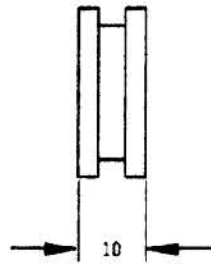
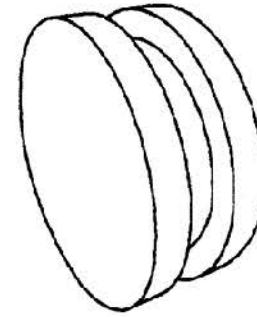
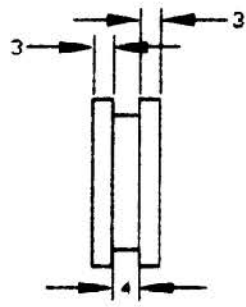
U02



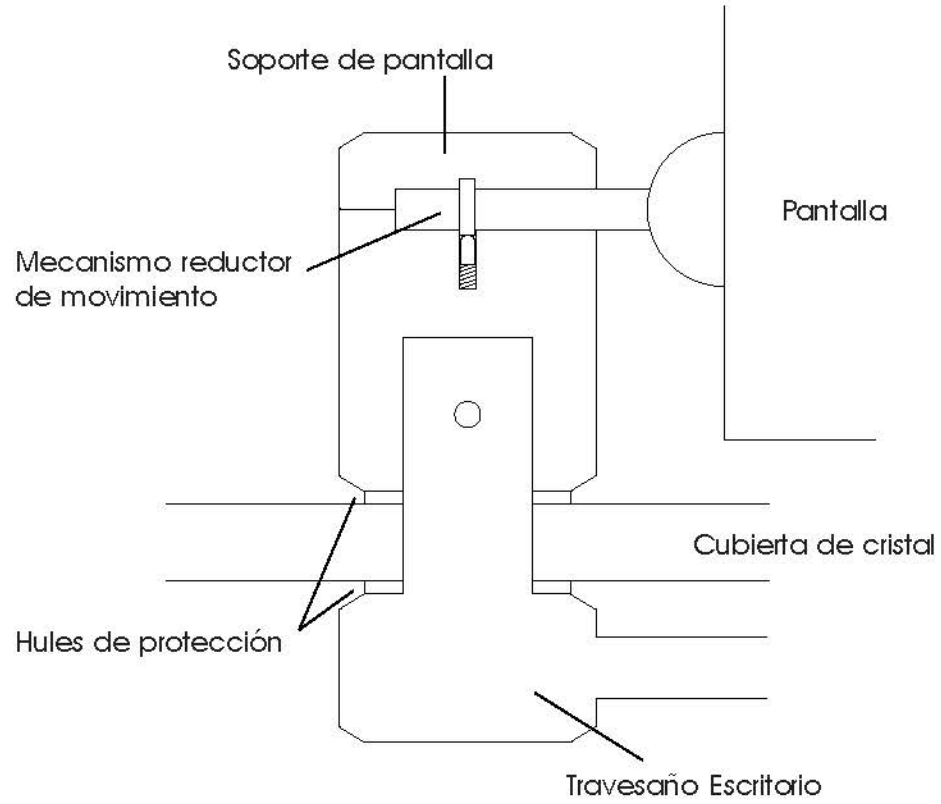
escala 1:2

cotas mm

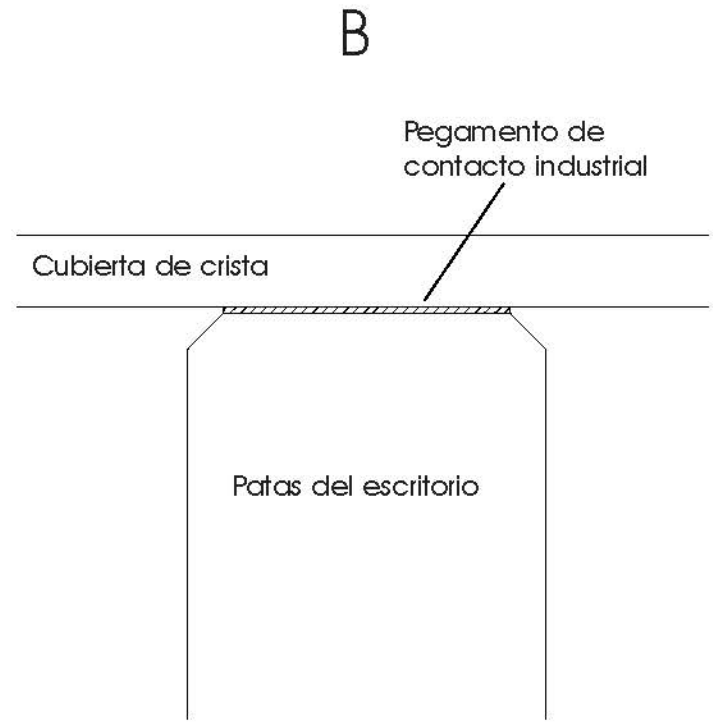
plano 60



|   |                                     |          |   |
|---|-------------------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <small>o.a</small> | IXILKA   |  |
|   | U03                                 |          |   |
|  | escala 1:1                          | cotas mm | plano 61  |

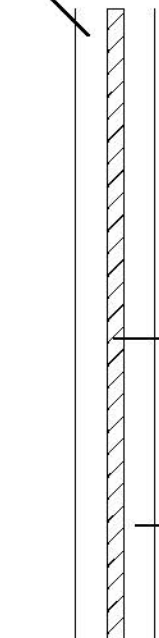


A



|  |                      |          |          |
|--|----------------------|----------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |          |
|  | detalles             |          |          |
|  | escala 1:2           | cotas mm | plano 62 |

Poste del módulo

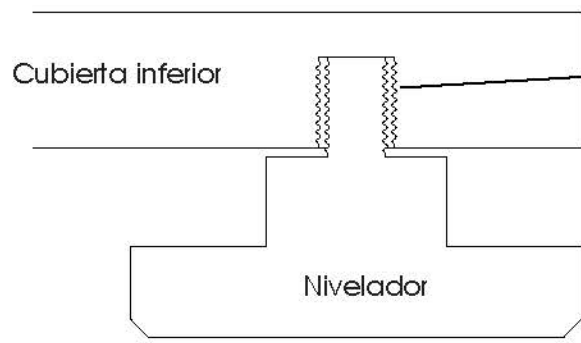


Cinta industrial doble-cara

Cubierta lateral

C

F

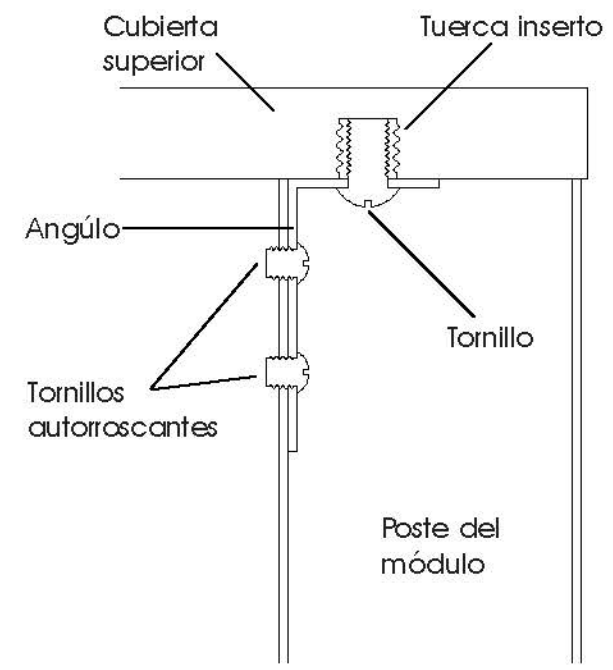


Cubierta inferior

Tuerca inserto

Nivelador

D



Cubierta superior

Tuerca inserto

Angulo

Tornillo

Tornillos autorroscantes

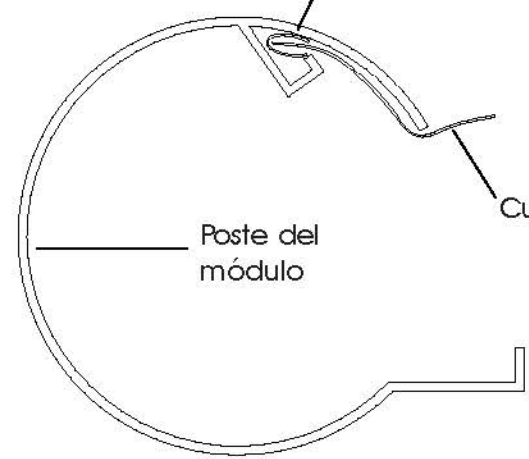
Poste del módulo

Engargolado laminado de la tela

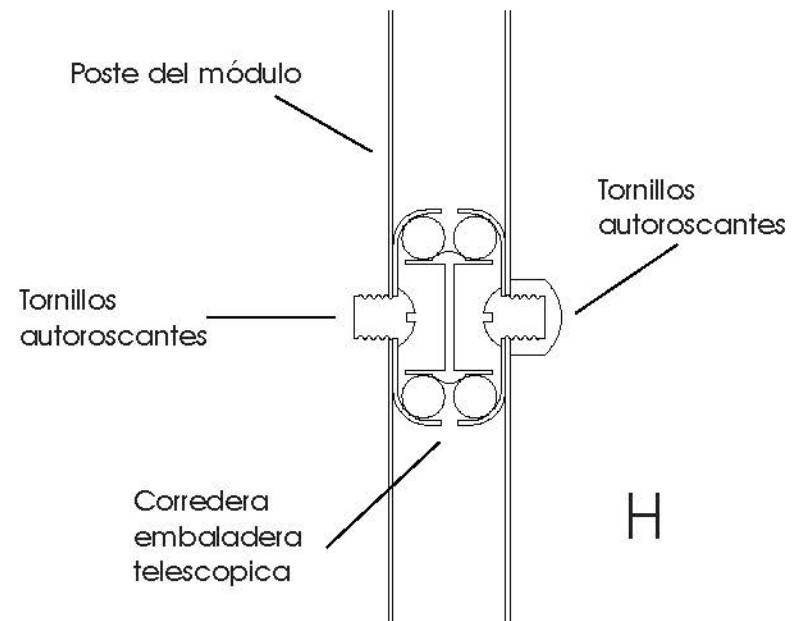
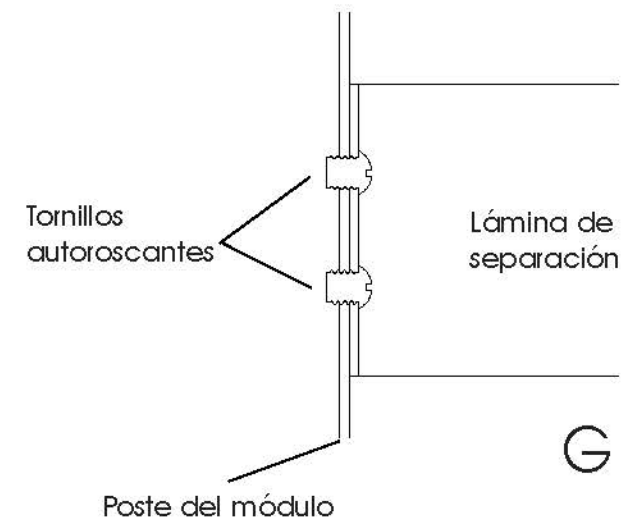
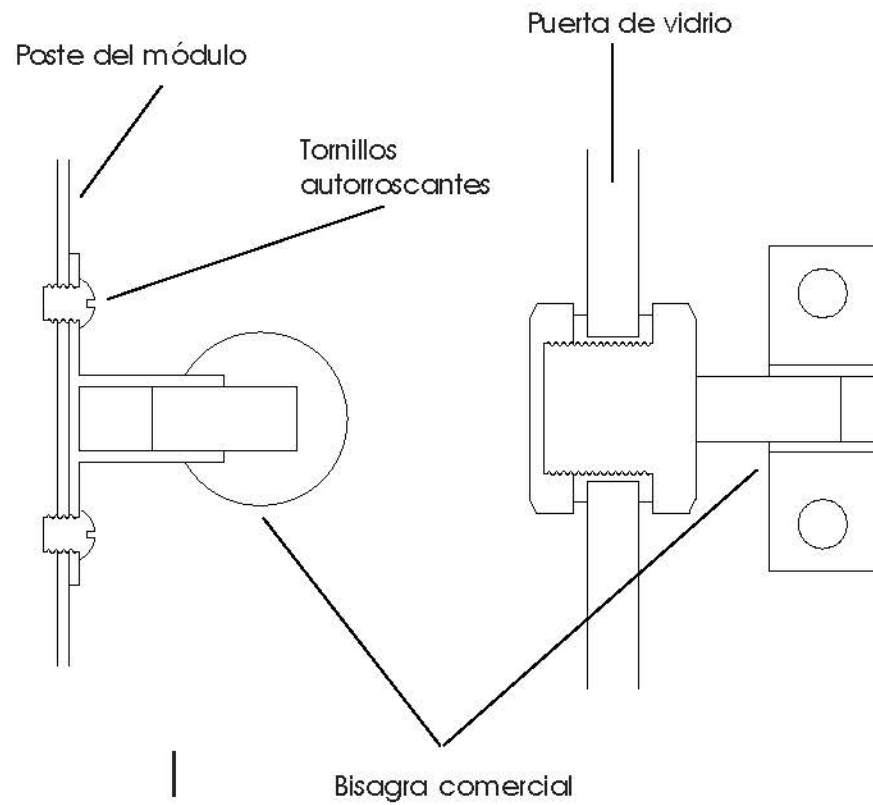
Cubierta textil

Poste del módulo

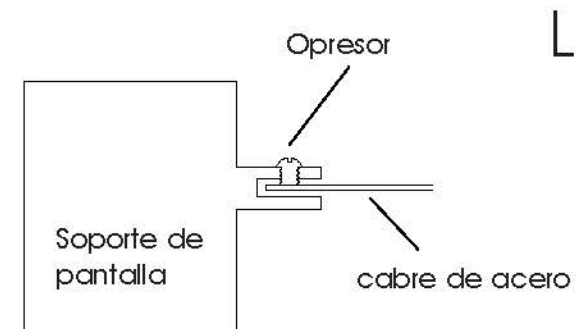
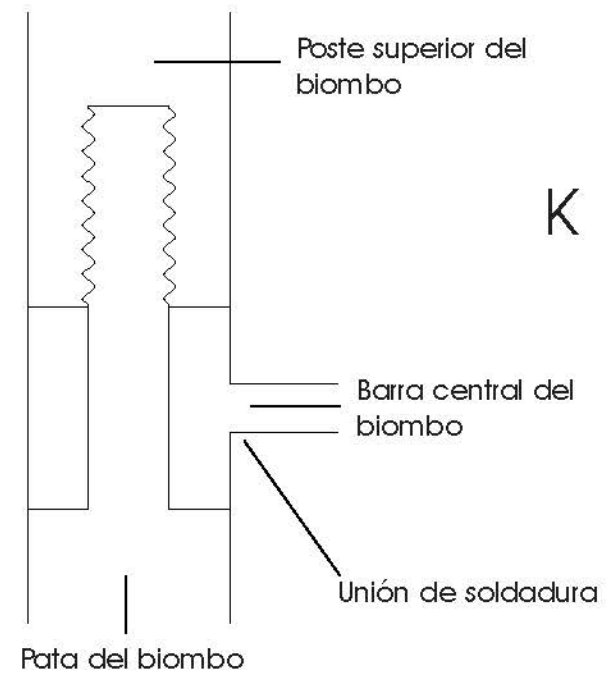
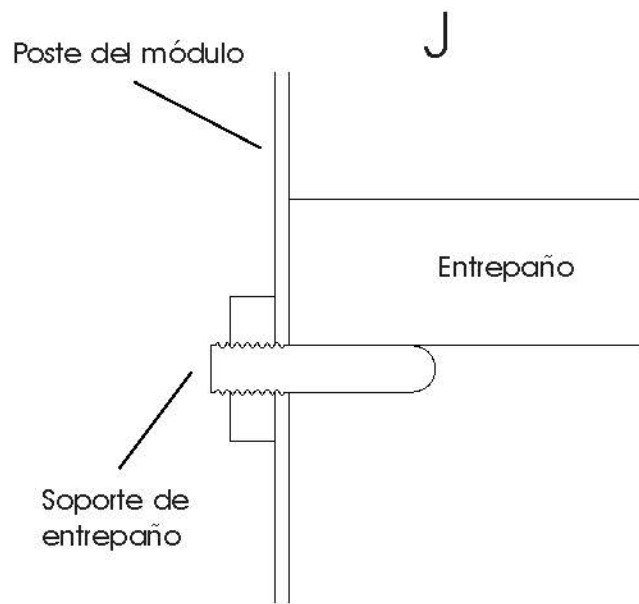
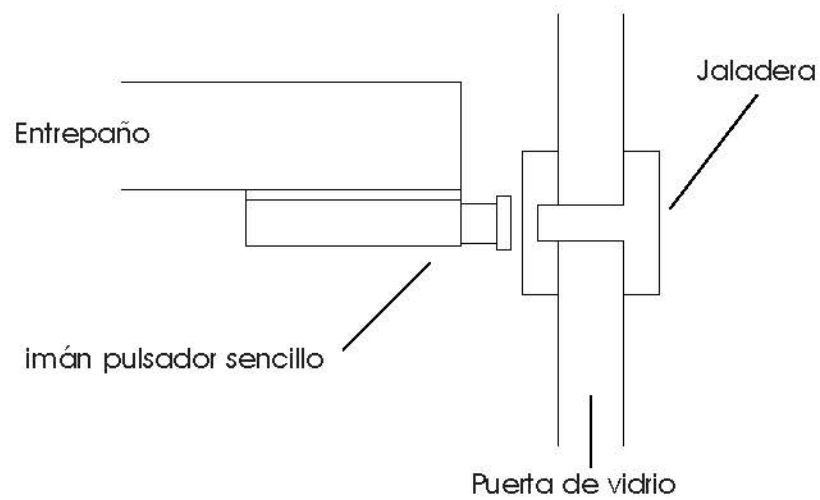
E



|  |                             |               |          |
|--|-----------------------------|---------------|----------|
|  | noe <b>ceron</b> <i>roa</i> | <b>IXILKA</b> |          |
|  | detalles                    |               |          |
|  | escala 1:2                  | cotas mm      | plano 63 |

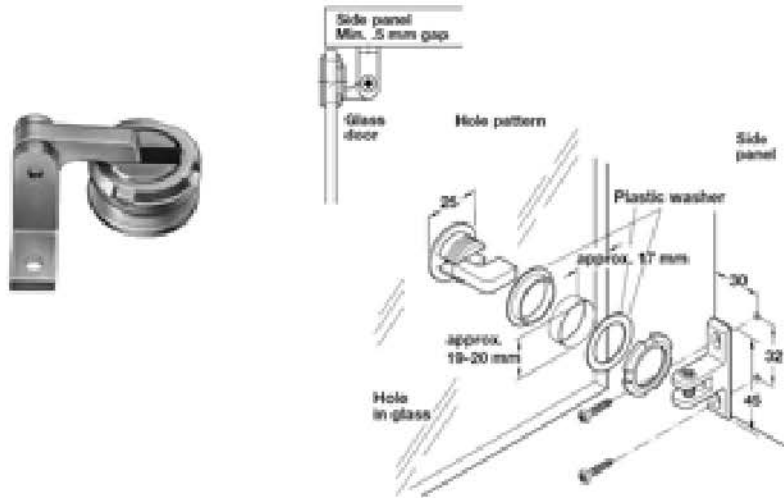


|   |                      |          |   |
|---|----------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> roa | IXILKA   |  |
|   | detalles             |          |   |
|  | escala 1:2           | cotas mm | plano 64  |

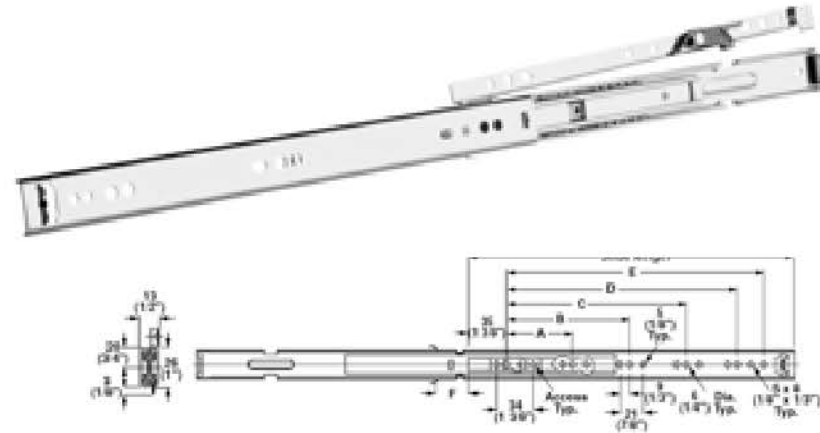


|   |                             |          |   |
|---|-----------------------------|----------|---|
|  | noe <b>ceron</b> <i>roa</i> | IXILKA   |  |
|   | detalles                    |          |   |
|  | escala 1:2                  | cotas mm | plano 65  |

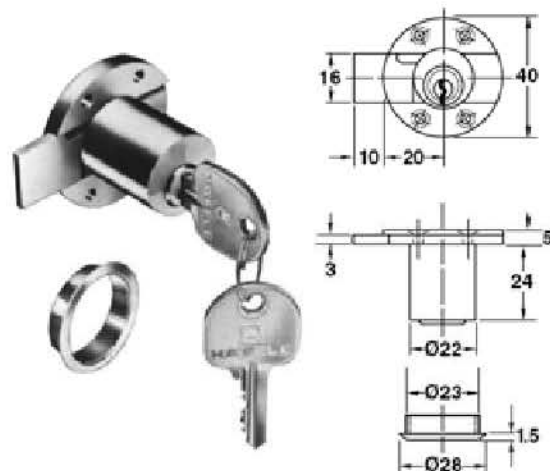
## 7.1 PIEZAS COMERCIALES



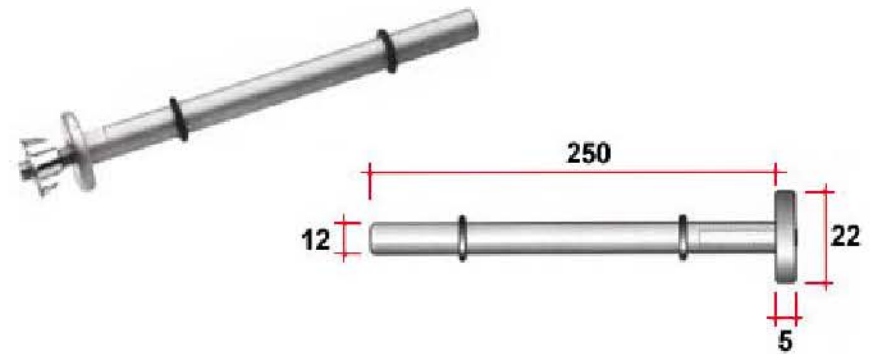
Bisagra para vidrio niquelada. Cat. 361,47,805



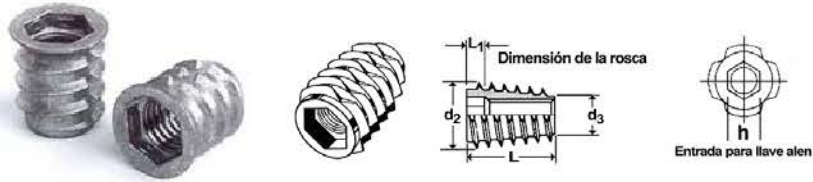
Corredera embaladera telescópica de extensión completa reforzada, de acero cold rolled zincado. Cat. 422,24,555



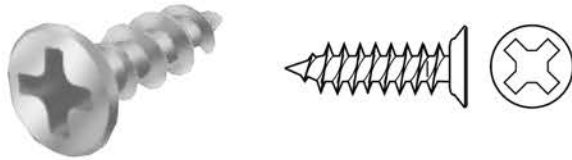
Cerradura para locker niquelada. Cat. 230,19,918



Soporte largo para repisas de zinc. Cat. 033,03,148



Tuercas inserto tipo E zamack de zinc. Cat. 032,06,237



Tornillería para lámina de zinc de diferente diámetros.

Todas las piezas comerciales que se emplearán en la fabricación de la estación médica, se obtuvieron del catálogo de Häfele 2003.





## PRODUCCIÓN

## 8.1 MAQUINARIA

La producción de la estación de trabajo esta planificada para que se haga en conjunto con una empresa fabricante de muebles o mobiliario para oficina con una capacidad de mediana a grande en maquinaria y procesos de producción.

Es así que se visualizaron procesos y los medios para realizar estos procesos con la capacidad tecnológica existente en diversas empresas del país, de manera que se abaraten los costos de producción además de generar empleos y fomentar la excelente mano de obra mexicana, de manera que se pueda decir que es un producto orgullosamente hecho en México.

A continuación menciono los procesos y el equipamiento con el cual esta previsto el desarrollo de los diferentes componentes de la estación de trabajo, cabe destacar que la maquinaria propuesta es en su gran mayoría maquinaria de control numérico (CNC), ya que ésta se presenta como la mejor opción para acelerar, simplificar, mejorar las utilidades de producción del mobiliario.

En primer lugar se realizarán los cortes de todas las cubiertas de MDF así como de todas las piezas de lámina de aluminio en un router láser, que tienen la capacidad de cortar diferentes materiales como maderas, metales y plásticos de hasta un espesor de 40mm.

Con el uso de una máquina de extrusión de aluminio se fabricarán los dos diferentes perfiles que sirven de postes en los módulos y que posteriormente serán maquinados para obtener el producto final.



Posteriormente se realizarán todos los barrenos de las piezas de MDF, lámina de aluminio y los perfiles, así como los elevadores, los soportes de las pantalla del negatoscopio y todas la piezas que requieran de algún tipo de maquinado, en un centro de maquinado en horizontal y vertical.



En la fabricación de los cajones y el archivero, se emplearán además del router láser para cortar la lámina, de una dobladora para darle forma al cajón.



La planta de soldado eléctrico con microalambre es para ensamblar los cajones y que queden de una sola pieza y listos para la aplicación de la pintura.



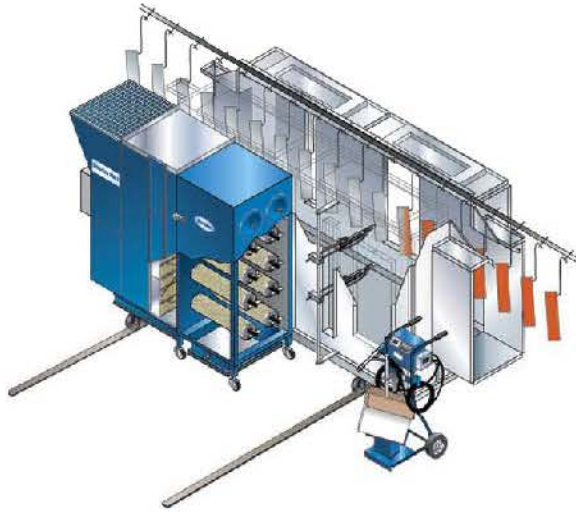
También se requiere de una máquina roladora para darle la curva a la cubierta lateral de los módulos y del escritorio, así como a la cara de los cajones.



También se requiere de una máquina especial para cortar las piezas de nylon que funcionan como cubiertas de los módulos y que son el punto personalizable de la estación de trabajo.



El acabado final de los cajones es la aplicación del acabado en color blanco semimate en un centro de pintura electrostática y posteriormente su secado en un horno, para obtener el producto final.



Finalmente para el acabado de la cubierta del escritorio se empleará una máquina de sand-blast que le dará el acabado final al cristal templado.





## 8.2 TABLA DE PROCESOS

| Clave | Descripción                             | Material                   | Proceso 1 | Maquinado           | Proceso 2                    | Acabado          |
|-------|---|----------------------------|-----------|---------------------|------------------------------|------------------|
| A01   | cubierta superior del modulo sencillo   | MDF de 16mm                | corte     | barreno             | laminado plastico            | blanco semi-mate |
| A02   | cubierta inferior del modulo sencillo   | MDF de 16mm                | corte     | barreno             | laminado plastico            | blanco semi-mate |
| A03   | mesa del escritorio                     | Cristal templado           | corte     | barreno             | sand-blast                   | al acido         |
| A04   | pantalla del escritorio                 | Acrilico de 5mm            | corte     | barreno             | laminado electroluminiscente | blanco semi-mate |
| A05   | entrepaña del modulo sencillo           | MDF de 16mm                | corte     | barreno             | laminado plastico            | blanco semi-mate |
| A06   | cubierta larga del modulo doble         | MDF de 16mm                | corte     | barreno             | laminado plastico            | blanco semi-mate |
| A07   | cubierta inferior del modulo doble      | MDF de 16mm                | corte     | barreno             | laminado plastico            | blanco semi-mate |
| A08   | entrepaña del modulo doble              | MDF de 16mm                | corte     | barreno             | laminado plastico            | blanco semi-mate |
| A09   | cubierta superior deñ modulo doble      | MDF de 16mm                | corte     | barreno             | laminado plastico            | blanco semi-mate |
| P01   | poste A de los modulos                  | Perfil de aluminio         | corte     | barreno             |                              | natural          |
| P02   | poste B de los modulos                  | Perfil de aluminio         | corte     | barreno             |                              | natural          |
| P03   | patas del escritorio                    | Barra de aluminio de 2"    | corte     | fresado             |                              | natural          |
| P04   | patas de la mesa de trabajo con vitrina | Barra de aluminio de 2"    | corte     | barreno             |                              | natural          |
| P05   | patas del biombo                        | Barra de aluminio de 2"    | corte     | Torno y soldadura   |                              | natural          |
| P06   | poste superior del biombo               | Barra de aluminio de 2"    | corte     | barreno             |                              | natural          |
| P07   | poste horizontal del escritorio         | Tubo de aluminio de 1"     | corte     | Torno y soldadura   |                              | natural          |
| P08   | Pinza                                   | Barra de aluminio de 1/4"  | corte     | barreno y doblado   |                              | natural          |
| PU01  | puerta de la vitrina                    | Vidrio anti-impacto de 4mm | corte     | barreno             | sand-blast                   | al acido         |
| B01   | cajon                                   | Lamina de aluminio cal. 20 | corte     | doblado y soldadura | pintura electropulverizada   | blanco semi-mate |
| B02   | archivero                               | Lamina de aluminio cal. 20 | corte     | doblado y soldadura | pintura electropulverizada   | blanco semi-mate |
| T01   | tela del modulo sencillo                | Nylon                      | corte     |                     |                              | institucional    |
| T02   | borde de la tela                        | lamina de aceron cal. 20   | corte     | engargolado         |                              | natural          |
| T03   | tela del modulo doble                   | Nylon                      | corte     |                     |                              | institucional    |
| T04   | tela del biombo                         | Nylon                      | corte     |                     |                              | institucional    |
| L01   | cubierta lateral                        | Lamina de aluminio cal. 14 | corte     | rolado              |                              | natural          |
| L02   | lamina de proteccion                    | Lamina de aluminio cal. 20 | corte     | barreno y doblado   |                              | natural          |
| L03   | lamina de separación                    | Lamina de aluminio cal. 20 | corte     | barreno y doblado   |                              | natural          |
| L04   | lámina basurero                         | Lamina de aluminio cal. 14 | corte     | doblado y soldadura |                              | natural          |
| L05   | base basurero                           | Lamina de aluminio cal. 14 | corte     | doblado y soldadura |                              | natural          |
| R01   | elevadores                              | Barra de aluminio de 2"    | corte     | torno               |                              | natural          |
| U01   | ángulo                                  | Angulo de acero de 2mm     | corte     | barreno             |                              | natural          |
| U02   | brazo del escritorio                    | Barra de aluminio de 2"    | corte     | torno y fresado     |                              | natural          |
| U03   | boton de la puerta                      | Barra de aluminio de 1"    | corte     | torno               |                              | natural          |
| U04   | barras centrales del biombo             | Tubo de aluminio de 1"     | corte     | doblado y soldadura |                              | natural          |
| U05   | barras laterales del biombo             | Tubo de aluminio de 1"     | corte     | doblado y soldadura |                              | natural          |
| Co01  | tuercas inserto                         |                            |           | pieza comercial     |                              |                  |
| Co02  | tornillos conectores                    |                            |           | pieza comercial     |                              |                  |
| Co03  | tornillos para lamina                   |                            |           | pieza comercial     |                              |                  |
| Co04  | soportes para repisa                    |                            |           | pieza comercial     |                              |                  |
| Co05  | imanes pulsadores                       |                            |           | pieza comercial     |                              |                  |
| Co06  | bisagras para vidrio                    |                            |           | pieza comercial     |                              |                  |

## 8.3 COSTOS

Finalmente y después de haber presentado una propuesta estética, funcional, de producción y ergonómicamente viable, también se debió hacer un estudio de su factibilidad económica, de manera que la estación de trabajo se encuentre en un rango económico aceptable para que pueda competir con el resto de las propuestas que existen en el mercado actualmente y su costo no se eleve demasiado a tal grado que quede fuera de competir con los similares.

Así se realizó el estudio de los costos de producción de todos los muebles que componen la estación de trabajo considerando un 15% de factor de desperdicio en promedio del material de fabricación más el costo de las piezas comerciales compradas directamente con Hafèle.

En la tabla de costos se presenta el costo de materia prima por mueble a lo que se le aumenta el 30% por conceptos de fabricación y mano de obra más un 15% de gastos fijos e indirectos, obteniendo así el costo final por unidad a lo que se le aumento un 40% de utilidad que incluye mis honorarios por el diseño.

El presupuesto que a continuación se muestra esta elaborado para una producción de 100 unidades por cada uno de los muebles fungiendo como intermediario entre el cliente y el fabricante.

### TABLA DE COSTOS

#### Módulo sencillo



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 2,893.82        |
| 30% producción       | \$ 868.15          |
| 15% insumos          | \$ 434.07          |
| costo de fabricación | \$ 4,196.04        |
| 40% Utilidad         | \$ 1,678.42        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 5,874.45</b> |

#### Archivero



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 4,157.03        |
| 30% producción       | \$ 1,247.11        |
| 15% insumos          | \$ 623.55          |
| costo de fabricación | \$ 6,027.69        |
| 40% Utilidad         | \$ 2,411.08        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 8,438.77</b> |

#### Cajonera



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 4,288.94        |
| 30% producción       | \$ 1,286.68        |
| 15% insumos          | \$ 643.34          |
| costo de fabricación | \$ 6,218.96        |
| 40% Utilidad         | \$ 2,487.59        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 8,706.55</b> |

#### Vitrina



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 3,567.67        |
| 30% producción       | \$ 1,070.30        |
| 15% insumos          | \$ 535.15          |
| costo de fabricación | \$ 5,173.12        |
| 40% Utilidad         | \$ 2,069.25        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 7,242.37</b> |

#### Mesa de apoyo



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 2,806.63        |
| 30% producción       | \$ 841.99          |
| 15% insumos          | \$ 420.99          |
| costo de fabricación | \$ 4,069.61        |
| 40% Utilidad         | \$ 1,627.85        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 5,697.46</b> |

Módulo doble



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 3,689.99        |
| 30% producción       | \$ 1,107.00        |
| 15% insumos          | \$ 553.50          |
| costo de fabricación | \$ 5,350.49        |
| 40% Utilidad         | \$ 2,140.19        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 7,490.68</b> |

Vitrina doble larga



|                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| materia prima        | \$ 5,790.72         |
| 30% producción       | \$ 1,737.22         |
| 15% insumos          | \$ 868.61           |
| costo de fabricación | \$ 8,396.54         |
| 40% Utilidad         | \$ 3,358.62         |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 11,755.16</b> |

Vitrina y archivero



|                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| materia prima        | \$ 5,496.11         |
| 30% producción       | \$ 1,648.83         |
| 15% insumos          | \$ 824.42           |
| costo de fabricación | \$ 7,969.36         |
| 40% Utilidad         | \$ 3,187.74         |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 11,157.10</b> |

Escritorio



|                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| materia prima        | \$ 7,510.00         |
| 30% producción       | \$ 2,253.00         |
| 15% insumos          | \$ 1,126.50         |
| costo de fabricación | \$ 10,889.50        |
| 40% Utilidad         | \$ 4,355.80         |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 15,245.30</b> |

Vitrina y cajonera



|                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| materia prima        | \$ 5,627.53         |
| 30% producción       | \$ 1,688.26         |
| 15% insumos          | \$ 844.13           |
| costo de fabricación | \$ 8,159.92         |
| 40% Utilidad         | \$ 3,263.97         |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 11,423.89</b> |

Biombo



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 4,678.33        |
| 30% producción       | \$ 1,403.50        |
| 15% insumos          | \$ 701.75          |
| costo de fabricación | \$ 6,783.58        |
| 40% Utilidad         | \$ 2,713.43        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 9,497.01</b> |

Módulo doble largo



|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| materia prima        | \$ 4,765.69        |
| 30% producción       | \$ 1,429.71        |
| 15% insumos          | \$ 714.85          |
| costo de fabricación | \$ 6,910.25        |
| 40% Utilidad         | \$ 2,764.10        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 9,674.35</b> |

Cesto de basura



|                      |                  |
|----------------------|------------------|
| materia prima        | \$ 321.90        |
| 30% producción       | \$ 96.57         |
| 15% insumos          | \$ 48.29         |
| costo de fabricación | \$ 466.76        |
| 40% Utilidad         | \$ 186.70        |
| <b>Total</b>         | <b>\$ 653.46</b> |



El precio de los paquetes mostrados corresponde a la suma de los elementos de manera individual, en el caso del paquete básico, se sumó el costo del escritorio más la cajonera sencilla y en el caso del paquete estándar se tomaron en cuenta el escritorio, la cajonera sencilla y la vitrina doble larga.

En el caso de querer personalizar el paquete adquiriendo otros muebles, para su precio final solo se sumarán el precio de los mismos y así poder configurar el consultorio al gusto del cliente.

También cabe mencionar que los costos totales aquí mostrados son sin tomar en cuenta el impuesto al valor agregado (IVA) por lo que hay que agregarles el 15% correspondiente a los impuestos y así obtener el precio neto.

PAQUETE ESTANDAR



Precio total \$ 35,707.01

PAQUETE BÁSICO



Precio total \$ 23,951.85

Los paquetes que se armaron para la comercialización de la estación de trabajo están diseñados para cumplir con los requerimientos que un médico necesita dentro de un consultorio considerando esta configuración como media para que se adapten a la mayoría de los consultorios que existen en las unidades privadas del país.

Dado que el mobiliario para oficina ejecutiva que se analizó como competencia directa de la estación médica ofrece una configuración de muebles diferente a los paquetes que se armaron para dicha estación, es que el precio que se muestra en éstos resulta demasiado bajo y así también se muestra como una mejor opción para el comprador.



Sin embargo dado que la estación médica es modular y permite su crecimiento para adaptarse a diferentes configuraciones y espacios dependiendo de las necesidades del médico, se diseñó una configuración similar a la que tienen las oficinas ejecutivas para poder así tener un ejemplo mas claro de comparación y demostrar que aun así la estación de trabajo es capaz de competir con las ofertas existentes en el mercado.



Precio total \$ 65,788.00



Precio promedio de la competencia

\$ 67,550.00

## 8.4 PROTOTIPO

Se realizó un modelo funcional a escala 1:1 para comprobar la funcionalidad, ergonomía, estética y factibilidad de producción del mobiliario de la estación de trabajo, que para efectos prácticos consistió solo en el módulo sencillo en su versión vitrina, ya que el objetivo era comprobar la mayor cantidad de ensamblajes y la capacidad estructural del grueso del mobiliario que conforma la estación de trabajo ejemplificados en uno de los elementos más importantes del mobiliario.

La fabricación se realizó de manera artesanal empleando métodos productivos que se encuentran en la gran mayoría de talleres pequeños y medianos del país y que no representan forzosamente los procesos de producción con los que se realizara la estación para su comercialización. Todas las piezas se fabricaron en los talleres de laminados, metales y maderas que se encuentran en el centro de investigaciones de diseño industrial de la UNAM, con la asesoría de los maestros de dichos talleres, a los cuales agradezco su apoyo y las facilidades que me otorgaron para la fabricación del modelo.

El primer paso consistió en la compra del MDF (Medium Density Fiberboard), lámina de aluminio, barra de aluminio, tubo de acero y lámina negra, para que posteriormente fueran sometidos a diferentes procesos de maquinado.



Las primeras piezas realizadas fueron los niveladores empleando la barra de aluminio de 2", la cual se maquinó mediante el uso del torno.



Después se fabricaron las cubiertas y el entrepaño de la vitrina con MDF de 15mm para las cubiertas superior e inferior y de 9mm para el entrepaño, empleando para ello la sierra circular en los cortes rectos y la sierra cinta en las curvas. Posteriormente se realizaron los barrenos para los insertos con un taladro de banco.

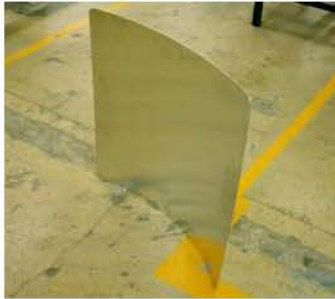


Posteriormente se realizaron los postes "A" y "B" cortando el tubo de 2" de acero con una sierra circular para después abrirlos con la sierra cinta y así formar las secciones curvadas de los postes, luego en la cortadora se realizaron las secciones rectas con lámina de acero cal. 18 barreando los orificios correspondientes a los soportes del entrepaño y las bisagras de la puerta para finalmente unir ambas secciones con cordones de soldadura.





La siguiente pieza en fabricarse fue la cubierta lateral del módulo con lámina de aluminio cal. 18, empleando la cortadora y la sierra cinta para darle las dimensiones correspondientes y después doblarla con la roladora para que se adaptara a la curva del módulo.



También se fabricó la cubierta textil de módulo que cubre la cubierta lateral y posterior, hecha de tela de nylon, para que sea flexible y se pueda tensar, realizándole un dobladillo en todo su perímetro y engargolando los costados que se fijan a los postes con lámina de aluminio.



La última pieza en fabricarse fue la puerta de vidrio esmerilado y barrenado en vidrio de 6mm, misma que fue mandada a hacer a la medida por que no encontré instalaciones a la mano para poder fabricarla yo mismo.



Posteriormente a la fabricación de las piezas que conforman la vitrina, se prosiguió a darles su acabado que en algunos casos solo se asemeja al acabado propuesto en la tesis y que para fines prácticos se optó por otro tipo de acabado. En el caso de las piezas hechas de aluminio como los niveladores y la cubierta lateral se dejó el acabado natural del material, al igual que la cubierta de tela y la puerta de vidrio esmerilado.

Para las cubiertas superior e inferior así como el entrepaño que están hechos de MDF primero se les aplicó una capa de sellador y posteriormente se les aplicó el acabado en pintura automotiva en color blanco mate.



A los postes hechos de lámina de acero se les dio el acabado con pintura electrostática en color gris plata, de manera que se vieran lo más parecido al aluminio.



Finalmente se armó el mueble ensamblando todas las piezas con la tornillería y los herrajes correspondientes a cada pieza, para así obtener el módulo sencillo en su versión vitrina totalmente listo.





## CONCLUSIONES



Finalmente después de exponer la investigación previa, las posibles opciones, la solución final, y la producción de la misma, sólo resta presentar los puntos más destacables de la estación de trabajo mismos que lo llevan a convertirse en una excelente opción dentro del mercado nacional que satisface las necesidades y exigencias planteadas para el nicho de mercado específico que son los consultorios de medicina general en hospitales privados.

En conclusión:

1. IXILKA se presenta ante la inexistencia en el mercado actual de alguna opción diseñada específicamente para un consultorio que unifique la estética que existe en los consultorios.
2. Existe un nicho de mercado suficientemente amplio para la estación de trabajo y con la capacidad económica de adquirirla, así como también hay una gran posibilidad de expandirse a otros nichos dentro del mismo mercado hospitalario e inclusive a oficinas ejecutivas.
3. La ergonomía de la estación de trabajo es una óptima solución para el usuario, ya que ésta diseñada tomando en cuenta un rango del 95%il del hombre al 5%il de la mujer mexicanos, mismos que se expresaron en las dimensiones de la estación de trabajo para que sea posible que un hombre grande se desenvuelva sin problemas dentro de ella y que una mujer pequeña sea capaz de alcanzar todos los espacios.
4. La estética de I X I L K A resulta actual sin contrastar demasiado con la imagen conservadora que existe en el mercado y en los mismos consultorios actualmente, además las tonalidades frías empleadas en la estación de trabajo como el gris del aluminio al natural el blanco y el color institucional que se ocupe en la tela corresponden con la imagen de los hospitales.
5. Los módulos desarrollados permiten al usuario adaptar la estación a sus preferencias y posibilidades tanto económicas como espaciales, permitiendo también institucionalizarse al ofrecer la libre elección del color de todas las piezas de nylon que forman las cubiertas laterales de los módulos y las mamparas del biombo de manera que ofrece una amplia posibilidad de personalización.
6. La pantalla del negatoscopio esta integrada al escritorio que además de estar dotada de una cubierta electroluminiscente, se activa con un sensor de proximidad, que hacen a la estación tecnológica y resalta el aspecto médico de la misma, aunándole el resto de los materiales como son el aluminio, el nylon, y el mdf que hacen que la propuesta sea tecnológicamente viable para producirse.
7. Los costos de producción hacen que la estación médica sea viable y compita con el mobiliario para oficinas ejecutivas que actualmente se emplea en los consultorios de los hospitales privados.
8. I X I L K A es una estación que ofrece propuestas tecnológicas, estéticas y funcionales actuales además de ser productiva y económicamente viable y que corresponde con la ergonomía y la estética de los hospitales privados del país.



## BIBLIOGRAFÍA

Las Dimensiones Humanas de los Espacios Interiores

Panero, Julios

Gustavo Gill, Barcelona 1984.

Dimensiones Antropométricas de Población Latinoamericana

Ávila Chaurand Rosalío

Etal, México, Universidad de Guadalajara, 2001

De la magia Primitiva a la Medicina Moderna

Ruy Pérez Tamayo

Fondo de Cultura Económica, México.

Guía de Proveedores y Servicios en el Área de la Salud

Thomson PLM, México 2003.

Psicología del color

Heller Eva

Gustavo Gill, Barcelona

<http://www.ssa.gob.mx>

<http://inegi.gob.mx>

<http://rivieramex.com>

<http://grupodi.com>

<http://hermanmiller.com>

