



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AUTOMÁTIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE
GLUCOSAMINA CON NINHIDRINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

LORENA BORJA ISUNZA



MÉXICO, D. F. 2010



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	Profra. ISAURA LUISA CARRERA GARCIA
Vocal	Profra. ROSA LUZ CORNEJO ROJAS
Secretario	Profra. MARIA DEL PILAR CAÑIZARES MACIAS
1er. Suplente	Profra. MINERVA CARRASCO FUENTES
2°. Suplente	Prof. MARTIN ANDRES IGLESIAS ARTEAGA

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Edificio B Laboratorios 105 y 106 de la Unidad de Estudios de Posgrado.
Facultad de Química Ciudad Universitaria. México D.F.

Asesor:

MARIA DEL PILAR CAÑIZARES MACIAS

Sustentante:

LORENA BORJA ISUNZA

A Dios

Por iluminar siempre el sendero por donde camino y jamás abandonarme, por recordarme que soy fuerte y que todo lo puedo lograr con fe en mí misma, pero sobre todo por recordarme que....

“La más grande felicidad está en mí”

Pá

Por jamás dudar de mí, aunque el camino fuera largo, por apoyarme siempre incondicionalmente y por todo el amor que me das.

Má

Por siempre estar a mi lado y procurar que nada me faltara en este recorrido. Eres un gran ejemplo en mi vida.

Teo

Porque siempre me recordaste no parar, por demostrarme que siempre se puede ser mejor y estar mejor. Te quiero.

A mi Hermanito

Al que la vida no me permitió conocer. Te llevo siempre en mi pensamiento

A Grisly, Solo y el Oso

Por alegrarme cuando lo necesitaba y brindarme todo su cariño.

Carlos Ferreira Álvarez

Por llegar y decidir quedarte. Tu compañía, tu apoyo y tu amor me han hecho disfrutar mucho más la vida. Parte de este trabajo te pertenece, Gracias!

Paola

Hermana, porque así es como te considero. Por apoyarme siempre en cualquier circunstancia.

A mis entrañables amigas Blondie I Virgen Jiménez, Norma E. González Tahuilán y Esmeralda Paz Lemus las quiero, gracias por jamás abandonarme y apoyarme siempre.

A Elva E. Maguey Reyes, por jamás dejarme sola y echarme muchas porras, te quiero!

A mis sobrinas Perla, Grecia, Itzanami y Paulina; A mis sobrinos Erik y Landon que están físicamente lejos de mí, pero que se encuentran clavados en mi alma.

A mis tías, tíos y todos mis primos, por acompañarme en momentos alegres y tristes.

A mi tío Paco, por dejarnos el ejemplo de que la vida no esta hecha solo para sobrevivirla sino para vivirla y ser felices.

A mis abuelos, José Inés Borja Yañez Alicia Romero Conejo, Gely Reyes Cruz y Amparo Rosales.

A mis amigos Jeanette Rosas Maqueda, América Martínez por darme su apoyo, Verito Juárez Montiel. Antonio Rechy Rodríguez, Guillermo Samuel González Espinosa, Oscar Campos Carbajal, E. Rodrigo Hernández Pineda y Francisco Javier Juárez Montiel por ser unos súper amiguísimos! Gracias! Marcos René López Hernández gracias amigo!, Ernesto (Magadan) Fuentes Barajas gracias!, Rafael Carvajal Amigo gracias por todo.

A los compañeros de SICA. Javier Gerardo Kuri Alferéz, Aldo Eduardo Kuri Alferéz, Sharemi Gómez Dorantes, Augusto Armando Oropesa Navarrete, Hugo Juárez Garrido, Marco Antonio Villafan Enriquez, María Guadalupe Zambrano Ramírez, Moisés Sabino Morales Espinoza, Israel Moreno Granados, Jhon Sam Ortiz Padilla, Víctor Sotelo Domínguez, Nathaly Galicia Álvarez.

A todos los compañeros del laboratorio de orgánica 2B del edificio A de la Facultad de Química de la UNAM. A la profesora Yolanda Caballero Arroyo por el cariño y el apoyo, a la profesora Rosa Luz Cornejo Rojas y la profesora Katia Solórsano que me brindaron no solo su amistad si no también su apoyo.

A la Dra. María del Pilar Cañizares Macías por brindarme todas las facilidades para la realización de este trabajo, por compartir todos sus conocimientos, pero sobre todo por tenerme toda la paciencia del mundo y no dejar de apoyarme. Gracias!

INDICE

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

I. ANTACEDENTES

HISTORIA

PROPIEDADES FÍSICAS

PROPIEDADES QUÍMICAS

GLUCOSAMINA O QUITANO

PROPIEDADES

ESTRUCTURA DE LA QUITINA Y EL QUITANO

BIOQUÍMICA Y METABOLISMO DE GLUCOSAMINA

APLICACIONES

IMPORTANCIA DE LA GLUCOSAMINA

SEGURIDAD

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE GLUCOSAMINA

ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

FUNDAMENTO DEL FIA

COMPONENTES DE UN EQUIPO PARA FIA

SISTEMA DE TRANSPORTE DE MUESTRAS Y REACTIVOS

INYECTORES DE MUESTRA Y DETECTORES

ZONA DE REACCIÓN

ZONA DE DETECCIÓN Y SISTEMA DE DETECCIÓN

(ESPECTROFOTÓMETRO)

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS ANÁLISIS AUTOMÁTICOS

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN

REACCIÓN ENTRE LA NINHIDRINA Y LOS AMINOÁCIDOS

REACCIÓN ENTRE NINHIDRINA Y GLUCOSAMINA

METODOLOGÍA

REACTIVOS

EQUIPOS

DISOLUCIONES

GLUCOSAMINA DISOLUCIÓN MADRE

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

ANÁLISIS POR LOTE

ANÁLISIS POR FIA

CONFIGURACIÓN FIA

MUESTRAS ANÁLIZADAS

CÁPSULAS

TABLETAS

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

CÁPSULAS

TABLETAS

ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA FIA
PÁRAMETROS QUÍMICOS
PÁRAMETROS HIDRODINÁMICOS
CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS
CURVAS DE CALIBRACIÓN
REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO FIA
COMPARACIÓN DE MÉTODOS ENTRE LOTE Y FIA
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS
ESTUDIO DE COSTOS

IV. CONCLUSIONES
ANEXO
BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

Hoy en día un método automatizado es de gran importancia para la Química Analítica por la posibilidad de obtener un mayor número de resultados en un tiempo corto y con costos más bajos, teniendo como ventaja al mismo tiempo un análisis más limpio y sustentable.

La glucosamina en los últimos años ha tomado gran importancia como suplemento alimenticio. Es producida tanto por grandes compañías farmacéuticas como por pequeños laboratorios y es utilizada como tratamiento alternativo en enfermedades articulares. La principal fuente natural de obtención es a través de desechos pesqueros de crustáceos.

Actualmente existen algunos métodos espectrofotométricos de análisis de glucosamina pero son procedimientos largos, costosos y con un gasto de reactivos grande lo que lleva a una gran generación de residuos.

En esta tesis se desarrolló un método por Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para la determinación de glucosamina en suplementos mediante la formación de un complejo con ninhidrina que se cuantifica espectrofotométricamente.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar un sistema automático por Análisis por Inyección en Flujo (FIA) y detección espectrofotométrica para la determinación de glucosamina en suplementos alimenticios utilizando ninhidrina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Optimizar las condiciones de trabajo para la cuantificación de glucosamina por FIA utilizando ninhidrina como reactivo para la formación del complejo.
- Estudiar y evaluar las condiciones químicas e hidrodinámicas en la configuración FIA para obtener resultados precisos.
- Evaluar diferentes tratamientos para extraer glucosamina de suplementos alimenticios.
- Comparar los resultados obtenidos para determinar glucosamina por FIA con un método espectrofotométrico probado en lote (donde cada muestra posteriormente a la formación del complejo es leída en el espectrofotómetro)

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 HISTORIA

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

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

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

Los caparazones, además de contener la quitina en forma de sales de calcio y por tanto ser fuente de obtención de dichas sales, también proporcionan pigmentos rojos y proteínas con la misma calidad a la de la carne del crustáceo. Por ser una mezcla compleja de compuestos se hace difícil aislar a la quitina sin técnicas drásticas y costosas. La quitina no se

encuentra en estado puro en la naturaleza y rara vez llega al 50% de una estructura. La quitina de origen animal está íntimamente asociada con proteínas insolubles en agua y sales inorgánicas que hacen difícil su aislamiento (1).

Los residuos de la industria pesquera son una fuente importante de materia prima para la obtención de quitina y con esto producir glucosamina.

En el caso de los crustáceos entre más jóvenes sean, mayor será la cantidad y calidad de las sales de calcio que se pueden obtener. En caso de no contarse con los secadores necesarios se pueden secar al sol, en un terreno amplio y colocar limpios los caparazones. El residuo limpio y molido se puede vender a las empresas que elaboran los derivados. Es fundamental tener la técnica adecuada para proceder a la obtención del polisacárido, los procedimientos pueden ser hidrólisis ácida, alcalina o enzimática (2).

1.2 PROPIEDADES FÍSICAS.

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

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

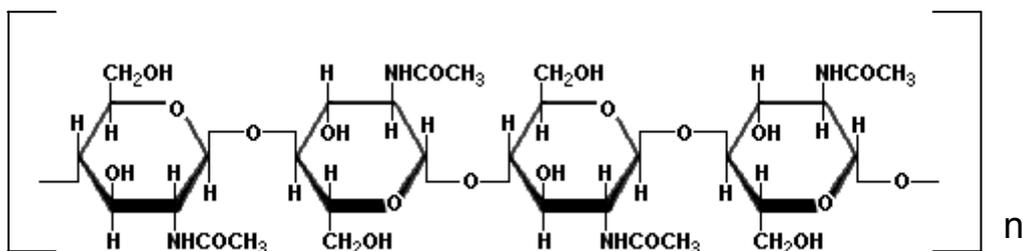


Figura 1. Estructura de la quitina

1.5 PROPIEDADES.

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

1.6 ESTRUCTURA DE LA QUITINA Y EL QUITANO

Entre los polímeros naturales más usados en la actualidad se encuentran dos polisacáridos que han tomado gran importancia por la infinidad de aplicaciones que han presentado, especialmente, por su poco impacto ambiental: la quitina y el quitano. Estos biopolímeros están relacionados debido a que la quitina es una poli(β -N-acetil- glucosamina) (Figura 2) la cual, mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50 % de sus grupos acetilo, se convierte en quitosano una (poli (β -N-acetil- glucosamina-co- β -glucosamina)). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100 %, el polímero se conoce como quitano que es la forma polimerizada de la glucosamina, si al quitano se le hidroliza para separar sus unidades se le llama glucosamina. La quitina y el quitano se encuentran presentes en la naturaleza desde hace millones de años (4).

Por los hallazgos paleontológicos, es posible asignarle a la quitina una edad de al menos 570 millones de años, al haber sido encontrada en el exoesqueleto de artrópodos acuáticos, fósiles conocidos como trilobites, que datan de la era paleozoica (4).

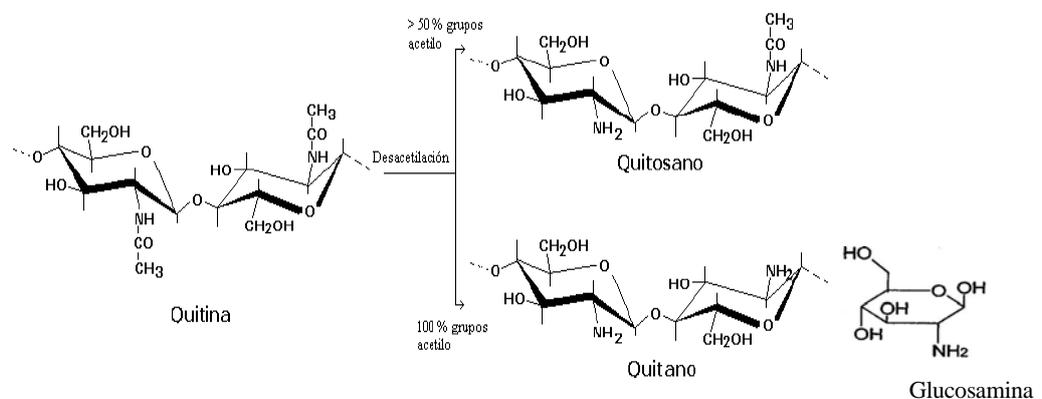


Figura 2. Reacción de desacetilación de la quitina y sus productos.

Por su parte, la glucosamina en su forma polimerizada, se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos, por ejemplo en el *Mucor rouxii* llega a representar hasta un tercio de su peso. Sin embargo, la fuente más importante de glucosamina, a nivel industrial, lo constituye la quitina, la cual, mediante un proceso de desacetilación química o enzimática, ha permitido producirlo a gran escala (4).

1.6.1 BIOQUÍMICA Y METABOLISMO DE GLUCOSAMINA

La glucosamina (2-amino-2-deoxi- alfa-D-glucosa) y la galactosamina son los dos hexosamino-azúcares (aminados de 6 carbonos), que se encuentran en las células animales. Estructuralmente, la glucosamina es una molécula de glucosa modificada por reemplazo de un grupo OH por un grupo NH₂ que se encuentra en el carbono 2 (C-2). La glucosamina es producida en el organismo por combinación de glutamina con fructosa, a través de la acción enzimática de la glucosamino sintetasa.

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

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

glucosamina y sus derivados pueden incorporarse a todas las macromoléculas que requieran monoaminosacáridos.

La glucosamina es una molécula pequeña (PM 179) e hidrosoluble, por lo que es absorbida con facilidad por las células intestinales por medio de transporte activo. En los seres humanos, cerca del 90 % de la glucosamina administrada como dosis oral de sulfato de glucosamina, es absorbida rápidamente. No se conoce si la molécula se absorbe intacta o sufre algún proceso de degradación. Luego de su ingestión la glucosamina se concentra en el hígado, desde donde puede seguir tres vías diferentes: incorporarse a las proteínas plasmáticas, ser degradada a moléculas de menor tamaño o ser utilizada para otros procesos de biosíntesis. La eliminación de la glucosamina es principalmente por vía urinaria, aunque una pequeña parte de la glucosamina o sus metabolitos son eliminados por las heces (5).

La glucosamina es rápidamente incorporada al cartílago articular, que es el tejido que concentra más glucosamina.

Actualmente existen una gran cantidad de suplementos alimenticios que contienen este principio activo que no siempre cumplen con todas las características descritas en el marbete.

1.7 APLICACIONES

Las aplicaciones de la quitina y quitano son muy variadas, la Tabla 1 muestra algunas de las aplicaciones más conocidas.

La quitina y sus derivados tienen un uso potencial en diferentes países, como Japón, China y Estados Unidos donde la industria pesquera esta establecida. En todos ellos ya existe una industria consolidada alrededor de este polímero, siendo China el principal productor y exportador de quitina. Chile y España están en una primera etapa a la par de algunos países de América Latina.

En México es un tema poco estudiado a pesar de la gran cantidad de costa que posee.

APLICACIONES	
Industria Alimentaria	Aditivos en alimentos, floculantes, empleado en panadería, usado en alimento para pollos y salmón, película comestible en frutas (retrasando el envejecimiento, oxidación y protección contra el crecimiento de hongos) (3)
Medicina y Agente Médico	Vendajes, biomaterial para la fabricación de lentes de contacto, hilos de sutura y prótesis, biosensores como inmovilizador de enzimas sensibles como en la detección de fenoles en plantas de agua, análisis de glucosa en sangre (inmovilizando la enzima glucosa oxidasa). Como agente médico se puede acompañar de sulfato de condroitina (proporcionando elasticidad al cartílago). Las dos sustancias al ser suministradas disminuyen el dolor y mejoran el cartílago, actuando en el cuerpo como los AINES (antiinflamatorio no esteroideo)(3).
Cosmética	Es utilizada en cremas para manos y lociones de baño por su propiedad humectante y abrasiva en la limpieza de la piel. Se usa también en fijadores para cabello y en pastas de dientes (3).
Industria Papelera	Aditivo en la elaboración de papel por aumentar el rendimiento de la pulpa y la capacidad de retención de agua y como adhesivo (3).

Tabla1. Aplicaciones de la quitina y el quitano

1.8 IMPORTANCIA DE LA GLUCOSAMINA

La glucosamina es uno de los componentes estructurales del tejido de las articulaciones y del tejido conectivo. Es un aminoazúcar, precursor importante en la biosíntesis de los cartílagos, componente fundamental de los péptidoglucanos, y de proteínas con un elevado contenido de carbohidratos ligados. Los péptidoglucanos y el colágeno componen la mayor parte de la matriz cartilaginosa. Los péptidoglucanos son esenciales para tener cartílagos saludables porque permiten ligar el agua que lubrica y amortigua las articulaciones. Los cartílagos recubren las cabezas de los huesos o las superficies articuladas, protegen la articulación y le dan amortiguación. La degeneración del cartílago de las articulaciones puede provocar el dolor que acompaña a la osteoartritis (8).

La evidencia disponible de los ensayos aleatorios controlados apoyan el uso del sulfato de glucosamina en el tratamiento de la osteoartritis particularmente en la rodilla. Se cree que los grupos sulfato suministran beneficio clínico en el líquido sinovial por medio del fortalecimiento del cartílago y ayudando a la síntesis del glucosaminoglicano. Si esta hipótesis se confirma, significaría que solamente el sulfato de glucosamina es efectivo y las formas de glucosamina no sulfatada no lo son.

Para la osteoartritis general se tiene buena evidencia científica de beneficios, pero el alivio del dolor, es más atribuido al efecto antiinflamatorio de la glucosamina. Aunque se necesitan ensayos clínicos adicionales con mejor diseño, para confirmar la seguridad y efectividad de este producto (6).

1.9 SEGURIDAD

La FDA (Food and Drug Administration) no regula estrictamente los suplementos alimenticios ya sean hechos a partir de plantas u otras sustancias como el caso de la glucosamina y no garantiza la potencia, pureza y seguridad de estos productos y los efectos pueden variar.

Actualmente existe una gran variedad de empresas que fabrican y distribuyen productos que contienen glucosamina ya sea como sulfato de glucosamina, clorhidrato de glucosamina o algunos mencionan sólo glucosamina y cada una de estos con muchas otras variedades, ya sea conditrina, cartílago de tiburón, colágeno, aceite de soya, etc. Pero no existen estudios completamente confiables que indiquen que tipo de molécula es la más eficiente y cual es la menos dañina en el cuerpo, aunque muchos estudios indican que el sulfato de glucosamina es la única que tiene un efecto sistémico de mejora en síntomas y dolor (8).

Finalmente y tal como lo han expresado diversos investigadores a través de los últimos años, se requieren estudios con mayor número de pacientes para responder adecuadamente las siguientes preguntas.

- ¿Posee en verdad un efecto condoprotector?
- ¿Cuál es su dosis más adecuada?
- ¿Diferencias en eficacia y seguridad según los diferente preparados de glucosamina?
- Su utilidad en las diferentes formas de osteo artrosis, ya sea primaria, secundaria, en grado severo y según su localización.
- ¿Cuál es su eficacia y seguridad a largo plazo?

La relativa pureza y contenido de glucosamina varia según cada preparación comercial y casa farmacéutica productora, y de esta manera su eficacia y seguridad también variaran (7).

1.10 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE GLUCOSAMINA

El desarrollo de los métodos instrumentales ha revolucionado el estudio de las reacciones e interpretación de resultados y ha ayudado al mejoramiento de las técnicas de trabajo.

Existen investigaciones en las que se logra cuantificar glucosamina directamente o en donde se utiliza algún método que de manera indirecta logra cuantificarla, un ejemplo de método indirecto de análisis se presenta en una investigación que utiliza la absorción de cobre y cobalto por la glucosamina, donde lo que se cuantifica es la cantidad de cobre y cobalto residual obteniendo así la cantidad de glucosamina que absorbió los metales (9). Un ejemplo que cuantifica la glucosamina directamente utiliza la espectroscopía infrarroja, con esta técnica se puede determinar el grado de deacetilación promedio de la quitina y con este resultado se determina la cantidad de glucosamina, ya que a un menor grado de acetilación mayor cantidad de glucosamina (10).

Otro ejemplo se basa en las propiedades de quelación de la glucosamina, esto gracias al contenido de los grupos amino de la glucosamina que logra quelar metales pesados, con este método se determina indirectamente el contenido de glucosamina, y no necesariamente se utilizaría este método como método de análisis puesto que lo que se busca es generar métodos más sustentables, pero es una forma en la cual se puede determinar la cantidad de glucosamina.

Existe otro trabajo donde se utiliza la voltamperometría cíclica utilizando potenciales eléctricos controlados con un electrodo de oro. En este estudio se logró determinar el potencial de oxidación de la glucosamina (11).

Existen también estudios utilizando métodos espectrofotométricos donde se utilizan matrices de glucosamina para formar un compuesto colorido, esto nos permite utilizar un método sencillo para la cuantificación de la glucosamina (12).

En este trabajo se propone un método de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para determinar glucosamina espectrofotométricamente, aprovechando los grupos amino de la glucosamina para formar un complejo colorido con ninhidrina permitiendo un análisis sencillo, optimizando el gasto de reactivos, el tiempo de análisis y el intervalo lineal.

1.11 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

Considerando las características de los posibles métodos de análisis mencionados anteriormente, se eligió el Análisis por Inyección de Flujo, FIA, como un método alternativo para determinar glucosamina en suplementos alimenticios y muestras farmacéuticas.

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

La ausencia de burbujas de aire le confiere, a las medidas de inyección en flujo ventajas importantes como son: (1) análisis más rápidos (típicamente entre 100 y 200 muestras/hora), (2) mejores tiempos de

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

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

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

En resumen, el FIA es un método automático de análisis en flujo continuo no segmentado (Figura 3), cuya característica fundamental es el uso de una corriente continua de líquido en la que se introduce la muestra; después, esta corriente confluye con otra corriente de reactivo. La corriente líquida que se forma es transportada a través de un sistema de tubos hacia el reactor y enseguida va al detector que mide el producto de reacción que interesa (13,14).

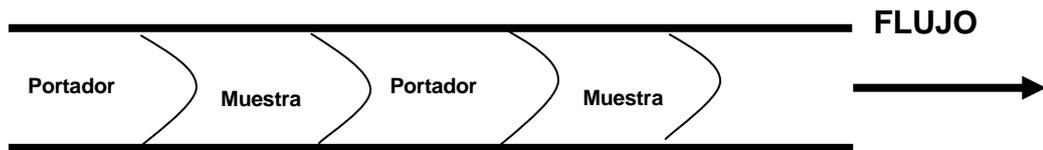


Figura 3. Transporte de la muestra en un sistema de análisis por inyección en flujo

Las características esenciales del FIA son:

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

La muestra líquida es inyectada directamente en el flujo.

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

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

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

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

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

La existencia de un régimen de flujo laminar proporciona importantes ventajas al FIA: a) zona de muestra bien definida, b) caudales

reducidos, y por tanto, consumos pequeños de reactivos y c) alta frecuencia de muestreo, por lo que no es necesario una presión elevada ni burbujas separadoras de aire para evitar la contaminación mutua de muestras al ser inyectadas sucesivamente (15).

1.12 FUNDAMENTO DEL FIA

DISPERSIÓN CONTROLADA.

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

El régimen laminar produce una zona bien definida del bolo de la muestra inyectada produciéndose un gradiente de concentración a lo largo de todo el bolo. Al ser un sistema continuo se obtiene una señal transiente cuyo máximo corresponde a la parte del bolo menos diluida.

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

- El transporte por convección desarrollado en condiciones de flujo laminar, que originan un perfil parabólico donde la velocidad lineal de las moléculas en las paredes del tubo es igual a cero, mientras que las moléculas que se encuentran en el centro del tubo viajan al doble de la velocidad media.
- El transporte por difusión debido a la formación de gradientes de concentración (horizontales y/o verticales) en diferentes momentos del transporte por convección.

Por lo tanto, la forma de una señal FIA (pico) dependerá del tiempo en el que el bolo de muestra se encuentra dentro del sistema. A tiempos demasiado cortos la dispersión es prácticamente cero y no se genera un gradiente de concentración en el bolo inyectado; por otra parte, tiempos de estancia largos ocasionan una dispersión muy acusada originando picos muy anchos. Debido a esto es necesario establecer cual es el

tiempo de residencia más adecuado, siendo un parámetro difícil de determinar. Generalmente, la señal óptima es aquella en la cual, aun el transporte por convección y por difusión influye de la misma manera, no predominando uno sobre el otro, aunque evidentemente esta decisión dependerá de la reacción que se va a llevar a cabo.

Las características de la señal se muestran en la Figura 4 las cuales dependen de las características hidrodinámicas del sistema FIA, caudal, volumen de inyección, longitud del reactor, etc., siendo difícil un modelo teórico de la dispersión capaz de predecir el comportamiento de un bolo inyectado en una configuración FIA. Generalmente los sistemas FIA tienen más de un canal por lo que deben tenerse presente las confluencias (tamaño y geometría), la geometría de la celda de flujo, las conexiones, el volumen de inyección, etc.

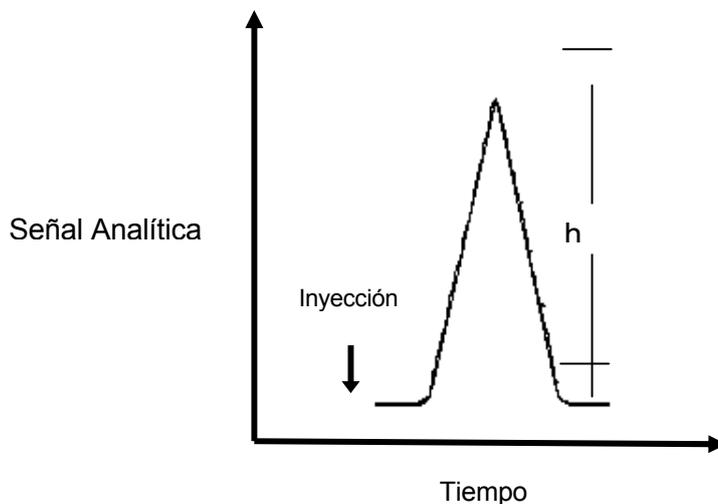


Figura 4. Señal obtenida en una configuración FIA.

1.13 COMPONENTES DE UN EQUIPO PARA FIA

- 1) Sistema de propulsión: bomba peristáltica, bomba de jeringa, balón de gas a presión, gravedad, etc.
- 2) Sistema de inyección: válvula rotatoria, válvula de conmutación, jeringa y septum, inyección hidrodinámica, "FIA sin inyección"
- 3) Sistema de detección: espectrofotometría de absorción molecular UV-visible e IR, fluorimetría, espectrometría de absorción atómica, fotometría de flama, ICP, potenciometría, conductimetría, amperometría, coulombimetría, voltimetría, etc (15).

En la Figura 5 se muestra un esquema general de una configuración FIA.

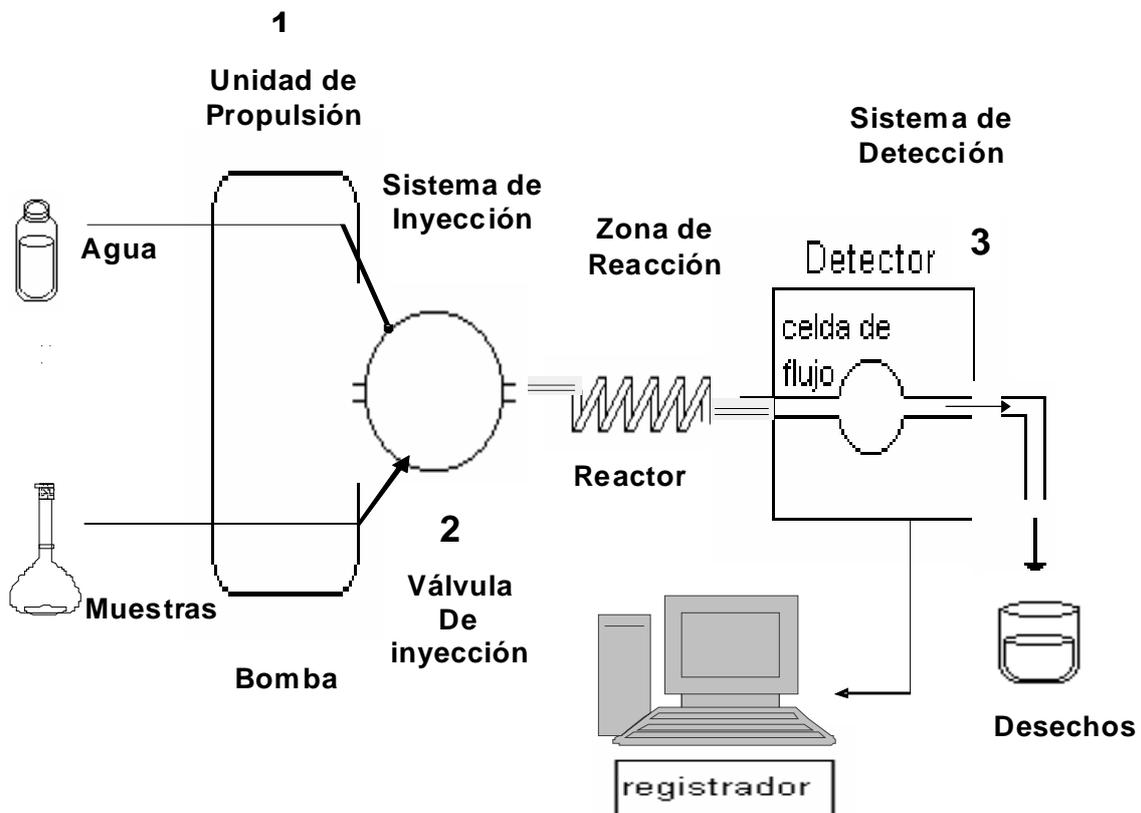


Figura 5. Esquema general de un sistema FIA

1.13.1 SISTEMA DE TRANSPORTE DE MUESTRAS Y REACTIVOS

Unidad de propulsión.

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

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

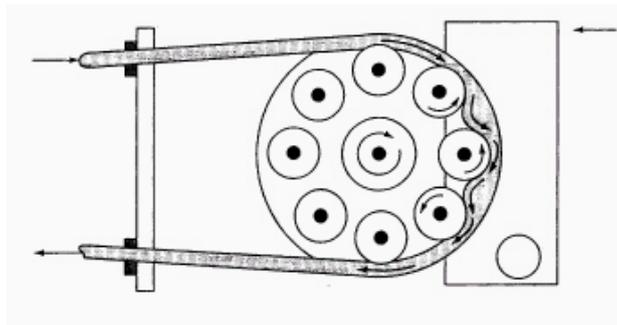


Figura 6. Representación de una bomba peristáltica con un solo canal.

Habitualmente, en un análisis por inyección en flujo la disolución circula a través del sistema por medio de una bomba peristáltica, un dispositivo que comprime, mediante unos rodillos, un fluido (gas o líquido) que se encuentra en el interior de un tubo de plástico. La Figura 6 ilustra el fundamento de una bomba peristáltica. En este caso, unas abrazaderas comprimen continuamente el tubo contra los rodillos, para lograr una corriente permanente de fluido a través del tubo. Las bombas modernas suelen tener 8 o 10 rodillos, dispuestos en configuración circular para que, en todo momento, la mitad de ellos presionen sobre el tubo. Este diseño produce un flujo relativamente libre de impulsos. El caudal se controla mediante el diámetro interno del tubo y la velocidad del rotor. En el mercado hay una amplia variedad de tamaños de tubo (d.i.= 0,25 a 4 mm)

para lograr caudales tan pequeños como 0,0005 mL/min. y tan grandes como 40 mL/min. En las bombas peristálticas habituales los rodillos son lo suficientemente largos como para poder manipular varios tubos a la vez como podemos observar en la Figura 7 (14,16,17).



Figura 7. Foto de la bomba peristáltica (sistema de propulsión).

1.13.2 INYECTORES DE MUESTRA Y DETECTORES

Sistema de inyección.

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

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

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

- De llenado
- De inyección.

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

En la Figura 8 se muestra el mecanismo de acción de la válvula de inyección en sus dos posiciones de carga / llenado o de inyección.



Figura 8. Mecanismo de acción de la válvula de inyección en sus dos posiciones de llenado e inyección.

Los volúmenes que se inyectan de muestra en los procedimientos de inyección en flujo abarcan desde 5 a 200 μL , siendo los más usuales en la mayoría de las aplicaciones los de 10 a 30 μL . En un análisis bien hecho, es vital que la disolución de la muestra se inyecte rápidamente, de golpe o como un bolo de líquido; además, las inyecciones no deben alterar el flujo de la corriente portadora.

En la Figura 8 puede verse la forma normal de introducir la muestra. Esta válvula consta de 6 orificios, tres de entrada y tres de salida, la válvula puede adquirir dos posiciones: en la posición de llenado la muestra entra en la válvula por el canal 6 llenando el bucle (canales 1 4) y saliendo continuamente por el canal de desecho 5; en tanto la corriente portadora entra en la válvula por el canal 2 saliendo hacia el reactor por el canal 3. En posición de vaciado (inyección) el canal 2 de entrada en la válvula comunica internamente con el canal 1 arrastrando el bolo de muestra a través de los canales 4 y 3 hacia el reactor mientras la muestra entra a la válvula por el canal 6 saliendo por el canal 5 hacia los desechos.(14,16,17).

1.13.3 ZONA DE REACCIÓN

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

El transporte de muestras en los sistemas FIA se produce en régimen laminar, lo que origina un perfil parabólico de velocidades al circular las partículas interiores del fluido más rápidas que las exteriores. Rápidamente el transporte se debe a la difusión axial -producida por un gradiente de concentración horizontal- y a difusión radial- producida por la diferencia de concentración entre puntos situados perpendicularmente a la dirección del flujo-. El que predomine un transporte u otro depende del tiempo que la muestra tarde en llegar desde el sistema de inyección a la zona de reacción. Con esto lo que se busca es que el transporte sea una mezcla de ambos tipos de difusión, para eso necesitamos controlar el caudal y la longitud del reactor. En FIA se suele trabajar con caudales de entre 0.5 y 3 mL/min. y con reactores de entre 50 y 200 cm. (14,16,17)

Los reactores son unidades dentro del sistema de transporte que actúan sobre el tiempo de residencia y perfil del bolo de muestra, de forma que a su paso por la unidad de detección este posea las características adecuadas para la medida o la detección de la respuesta. Pueden responder a diferentes tipos en función de las necesidades de cada sistema como se muestra en la Figura 9.

GEOMETRÍA DE LA ZONA DE REACCIÓN O

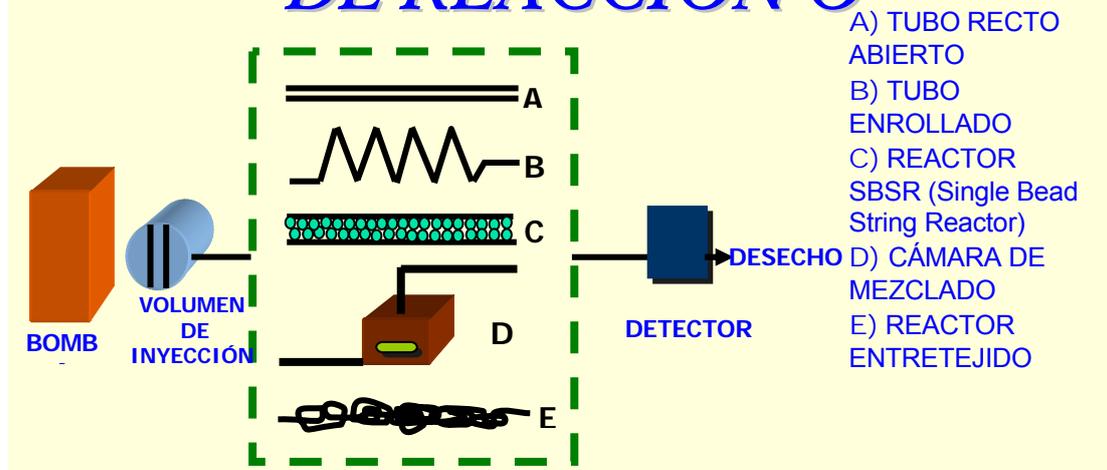


Figura 9. Tipos de reactores en FIA.

- Tubo recto abierto: Reciben este nombre los reactores constituidos por un tubo recto de diámetro y longitud variable, el cual se encuentra situado en el sistema de inyección y/o en el de detección.
- Tubo enrollado o serpentín (Figura10): Estos reactores reciben este nombre, ya que se encuentran enrollados helicoidalmente en torno a un cilindro de diámetro variable (varilla de vidrio o plástico). La longitud de este tubo está en función del tiempo de residencia requerido para la mezcla más adecuada del portador o reactivo y la muestra. El diámetro del serpentín modifica la dispersión de la muestra. Este tipo de reactores es el más común y es el que mas se utiliza tanto en la industria como en la investigación.



Figura 10. Reactor de tipo serpentín.

- Reactor SBSR o Single Bead String Reactor cuyo nombre en español sería: Reactor de Bolitas en Cadena Simple; consiste en un tubo de longitud variable relleno de bolitas o de un polímero químicamente inerte cuyo diámetro es de un 60 a un 80 % del diámetro del tubo, de forma que en cualquier sección del mismo existe una única bolita. El volumen no ocupado por el relleno es grande, por lo que el flujo no encuentra mucha resistencia a su paso. El uso de este reactor presenta una serie de ventajas, como son: el aumento del tiempo de residencia (benéfico cuando la reacción es muy lenta), disminución ostensible de la dispersión (incremento de la señal, utilizando menos muestra o concentraciones muy bajas de ésta) y aislamiento de la línea base en relación con los tubos abiertos, probablemente debido a que las bolitas actúan como supresoras de impulsos. El tiempo de retorno a la línea base permanece razonablemente constante para diferentes longitudes del reactor.
- Cámara de Mezclado: Se utiliza cuando se precisa un mayor grado de mezcla (punto de confluencia o minicámara sin agitación) o una total homogeneización de muestra y reactivo (minicámara con agitación). Generalmente se requiere un mayor grado de mezcla cuando se utiliza un sistema eléctrico de detección y cuando las diferencias de viscosidad, densidad específica, temperatura, contenido en detergentes, etc. entre el portador y la muestra son muy grandes. También se emplean para llevar a cabo las denominadas valoraciones FIA (14,16,17).
- Reactor entretrejido: Este permite presentar un camino especialmente desorientado, lo cual promueve la dispersión radial.

1.13.4 ZONA DE DETECCIÓN Y SISTEMA DE DETECCIÓN (ESPECTROFOTÓMETRO)

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

En la Figura 11 se muestran dos ejemplos de celda de flujo para FIA y en la Figura 12A un equipo comercial FIA, (15,18) En la Figura 12B se muestra el equipo utilizado para este proyecto en el laboratorio de la Facultad de Química de la UNAM en la unidad de posgrado del edificio B.



Figura 11. Celda de Peek. (Zona de detección)

EJEMPLO DE UN EQUIPO COMERCIAL



Figura 12A Ejemplo de un equipo comercial de FIA: incluye una bomba peristáltica (zona de propulsión), zona de reactor, zona de detección.



Figura 12B Equipo Comercial Lab 105 Facultad de Química UNAM Unidad de posgrado edificio B

1.14 VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS ANÁLISIS AUTOMÁTICOS

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

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

La tercera ventaja de la automatización es que con un buen analizador se pueden conseguir resultados, durante largos períodos de tiempo, más reproducibles que los que obtendrían con un operador utilizando un instrumento manual. Este aumento de la precisión de un dispositivo automatizado se considera que se debe a la elevada reproducibilidad de las medidas de los tiempos en las sucesivas operaciones de los instrumentos automatizados, una reproducibilidad que raramente se puede lograr con los métodos manuales. Por ejemplo, los analizadores automáticos permiten usar reacciones colorimétricas sin alcanzar el punto final, o las que dan lugar a productos cuya estabilidad no sea apta para medidas manuales. Asimismo, las técnicas de separación como diálisis o extracción con disolventes, en las que la recuperación del analito es incompleta, siguen siendo aplicables si se utilizan sistemas automatizados. En ambos casos, la gran reproducibilidad de la medida del tiempo en la secuencia de las operaciones, garantiza que las muestras y los patrones se procesen exactamente igual y exactamente en el mismo período de tiempo (14,19).

Las limitaciones en un análisis automatizado son referidas a un solo tipo de detección, lo que significa que el equipo sólo trabaje con una sola reacción, ya que si se está montando y desmontando el equipo para ser utilizado en varios tipos de reacción, en cada análisis diferente se tendría que ajustar todo el equipo junto con su curva de calibración. Esto provoca una pérdida de tiempo mayor y con esto aumentan las horas hombre y las horas de análisis.

Otra limitación es que este tipo de análisis requiere de un experto especializado en FIA monitoreando siempre el análisis para poder resolver los problemas que se puedan presentar.

Existe una limitación más que se debe a que el tipo de material utilizado como tubería, mangueras y celdas deben ser específicos para el análisis, según el caso para que soporten temperaturas, ciertos solventes etc.

Tomando las ventajas de los métodos de flujo continuo en este trabajo se optimizó y evaluó un método FIA para la determinación de glucosamina en suplementos alimenticios.

CAPITULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN

2.1.1 REACCIÓN ENTRE LA NINHIDRINA Y LOS AMINOÁCIDOS

La fórmula de la ninhidrina se muestra en la Figura 13, es un compuesto sólido de color amarillento a blanco, soluble en agua, que forma complejos de color púrpura con los aminoácidos según se muestra en la Figura 14.



Figura 13. Estructura química de la Ninhidrina

La ninhidrina reacciona con alfa-aminoácidos produciendo una aminodescarboxilación liberando dióxido de carbono y un aldehído.

En una disolución caliente el amino reactivo forma un complejo de color azul-púrpura (Púrpura de Ruhemann) con otra molécula de ninhidrina cuya absorbancia máxima es a 570nm.

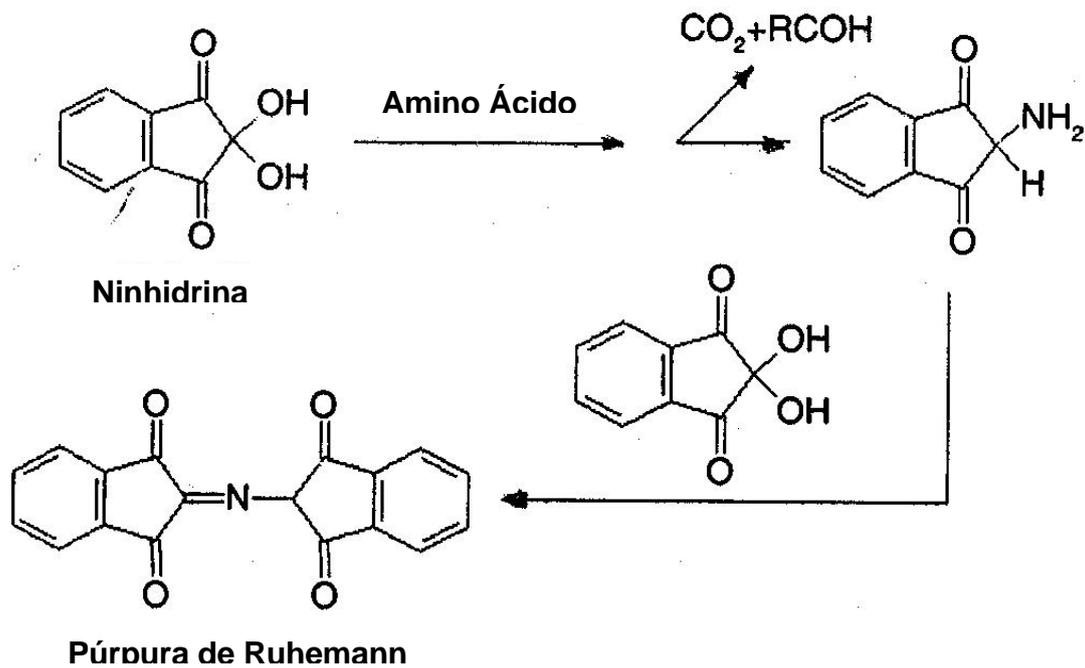


Figura 14. Reacción con un aminoácido.

2.1.2 REACCIÓN ENTRE NINHIDRINA Y GLUCOSAMINA

En la Figura 15 se propone el mecanismo de reacción entre la ninhidrina y la glucosamina para formar el complejo Púrpura de Ruhemann. Con base en la formación de una base de schiff, producto similar al de ninhidrina-aminoácidos(12).

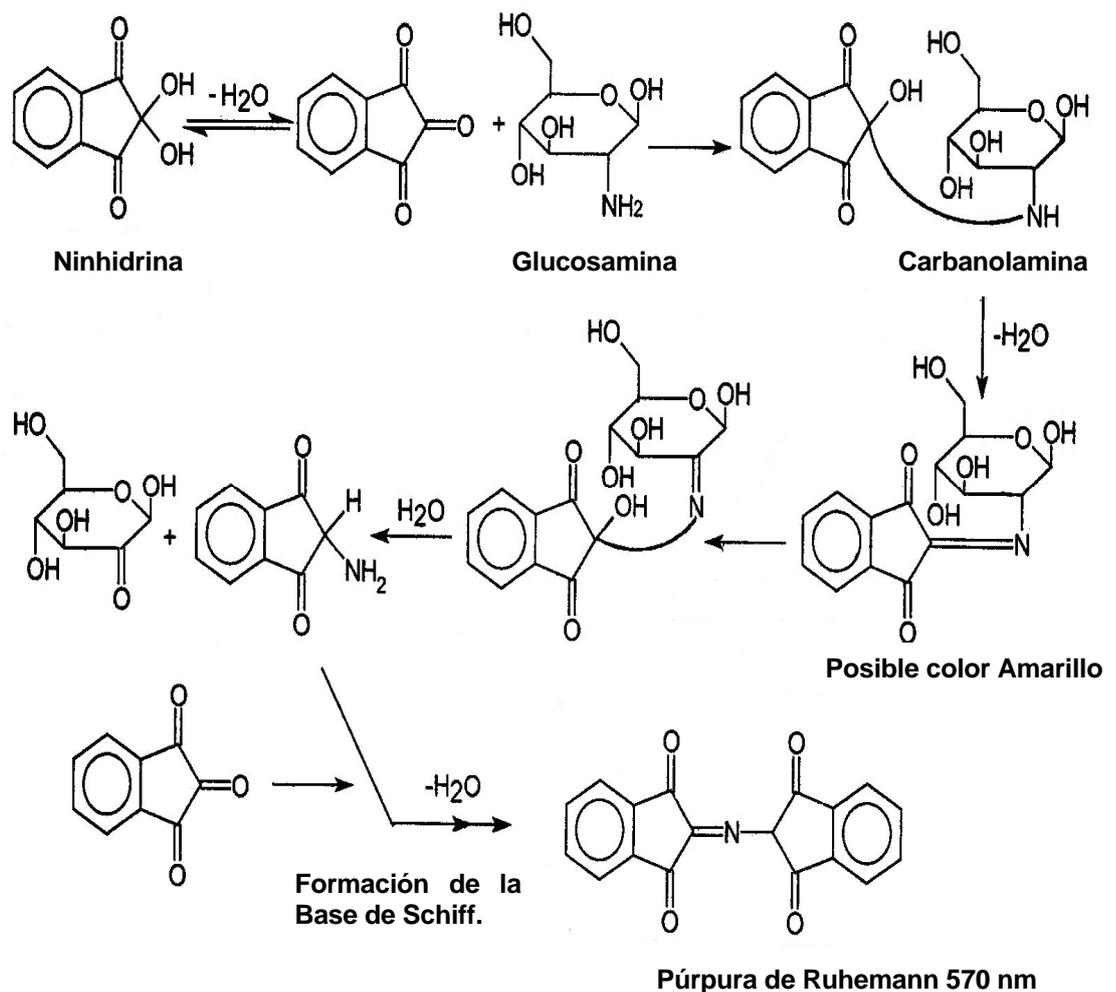


Figura 15 Reacciones que ocurren durante la formación del complejo

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 REACTIVOS

Los reactivos utilizados para este trabajo fueron grado analítico a menos que se indique otro.

➤ **Ninhidrina**

Marca Sigma-Aldrich $C_9H_6O_4$

➤ **Glucosamina**

Marca Fluka $\geq 99\%$ grado HPLC $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$

➤ **Fosfato monoácido de sodio**

Marca Mallinckrodt $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

➤ **Fosfato de diácido de potasio**

Marca Mallinckrodt KH_2PO_4

➤ **Agua destilada**

2.2.2 EQUIPOS

➤ **Espectrofotómetro CARY 1 UV-Visible (Varian, Sydney)**

➤ **Impresora EPSON Lx-810 impresora**

➤ **Bomba Peristáltica ISMATEC Tipo 1sM834C de 20 watts**

➤ **Tubos de Tygon y Teflón**

➤ **Balanza Análítica OHAUS Exploras Mod. E12140 precisión 0.1 mg**

➤ **Sonicador BRANSON 2510**

➤ **Centrifuga EBA 20 Heltich**

2.3 DISOLUCIONES

Para la preparación de 100 mL de la disolución de ninhidrina se pesó con precisión 800.0 mg de ninhidrina, se disolvió con ayuda de un agitador magnético y parrilla de agitación en un volumen de agua de aproximadamente 60 mL.

Para la preparación del buffer de fosfatos se pesaron con precisión 319.4 mg de fosfato mono ácido de sodio hepta hidratado y 2.5651 g de fosfato diácido de potasio. El fosfato mono ácido de sodio hepta hidratado se disolvió en aproximadamente 5 mL sin necesidad de aplicar mucha fuerza mecánica para su disolución y el fosfato diácido de potasio en aproximadamente 30 mL y con agitador magnético.

Posteriormente los 60 mL en los que se disolvió la glucosamina se unen con los 5 mL de fosfato mono ácido de sodio hepta hidratado y con los 30 mL de fosfato diácido de potasio, a esta mezcla se le ajusta el pH a 6, una vez que se encuentra en este pH se lleva al aforo en un matraz volumétrico de 100 mL.

Esta mezcla es de color amarillo y es recomendable almacenar en un frasco color ámbar y en refrigeración.

2.3.1 GLUCOSAMINA DISOLUCIÓN MADRE

Para la preparación de 100 mL de esta disolución se pesaron 6.0 g de glucosamina y se disolvieron en aproximadamente 80 mL de agua destilada y posteriormente se llevó al aforo con agua destilada.

2.4 COMPARACIÓN DE MÉTODOS

2.4.1 ANÁLISIS POR LOTE

Este tipo de análisis se refiere a que las muestras son analizadas una a una, esto es que cada muestra para su medición en el espectrofotómetro se coloca en la celda de medición y se lee, se vacía la celda, se lava y se coloca otra muestra para ser medida y se basa en la formación del complejo de Ruhemann, formado a partir de glucosamina y ninhidrina, a una temperatura de 100°C, debido a que el experimento fue replicado en México DF, la temperatura utilizada fue la de ebullición que es aproximadamente 95°C (12).

Disoluciones

Ninhidrina 0.8%

Buffer de fosfatos 0.2M pH 6

Disoluciones de glucosamina a partir de la disolución madre con concentraciones de 0.005%, 0.010%, 0.020%, 0.030%, 0.040% y 0.050%.

La metodología de este análisis fue la siguiente: se prepararon las disoluciones anteriores por separado, en una gradilla se colocaron tubos de ensaye, contando con un blanco, a cada tubo se le agregó 4mL de cada disolución de glucosamina, 0.5 mL de ninhidrina y 0.5 mL de buffer de fosfatos. Para el blanco 4mL de agua.

Estas muestras se calentaron en baño maría a temperatura de ebullición por 30 minutos, en este periodo de tiempo se desarrolla el complejo y la coloración, posteriormente las muestras se colocan en un baño de agua helada por 20 minutos y el color debe permanecer, después de este tiempo las muestras se leen a 570 nm.

2.4.2 ANÁLISIS POR FIA

Para este análisis el fundamento es el mismo, la formación de un complejo colorido a partir de la ninhidrina y la glucosamina, pero en este caso la temperatura de reacción fue de 75°C.

Disoluciones

Portador: Ninhidrina 0.8% + buffer de fosfatos 0.2M pH 6

Estándares: Disoluciones de Glucosamina a partir de la disolución madre 0.3%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%

2.5 CONFIGURACION FIA

En la Figura 16 se muestra la configuración FIA utilizada. Las condiciones FIA evaluadas fueron:

- Caudal (mL/minuto)
- Temperatura
- Volumen de inyección en μL
- Longitud del reactor en cm
- Concentración de reactivos

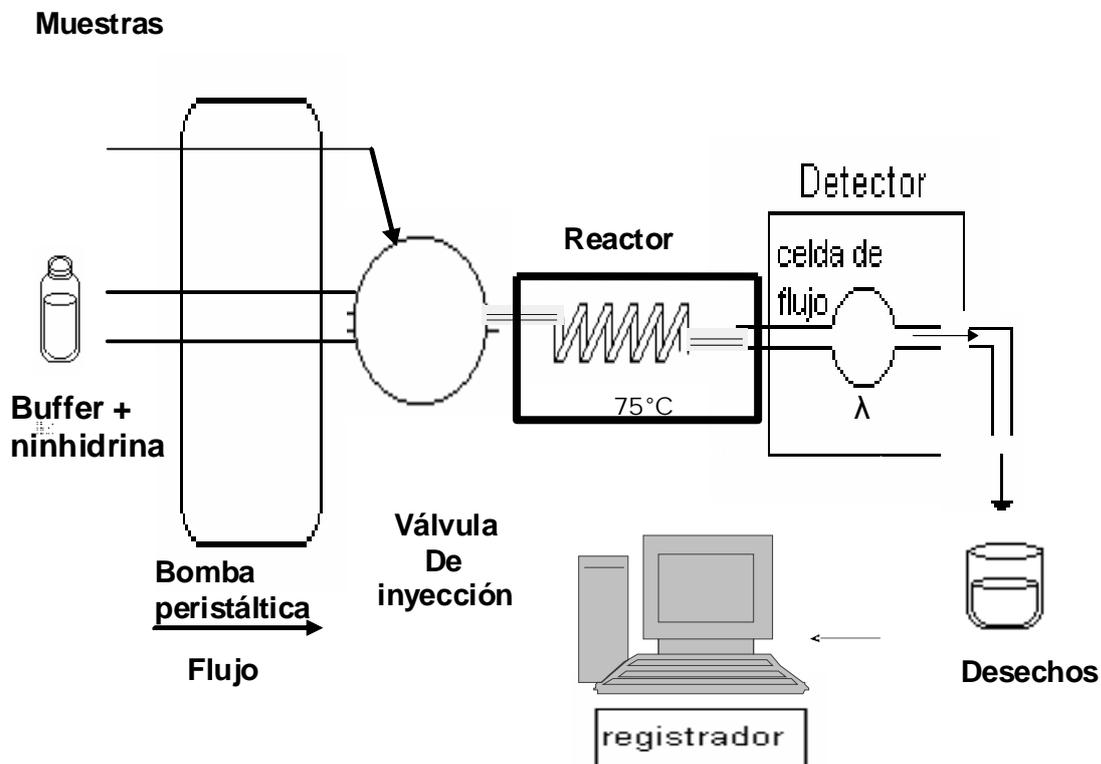


Figura 16. Configuración FIA seleccionada

Para la determinación de glucosamina se inyectaron 100 µL de muestra o estándar, a través de la válvula de inyección, dentro del portador buffer/ninhidrina. La glucosamina reaccionó con la ninhidrina a lo largo del reactor el cual se encontraba sumergido en un baño de agua a 75°C. Cuando el producto de reacción llegó a la celda de flujo, localizada en el espectrofotómetro UV- Vis, se midió a 570 nm. No hubo necesidad de usar el baño de agua helada ya que con el análisis FIA no se requiere que la reacción llegue al equilibrio para realizar su lectura, por lo que se disminuyó el tiempo de análisis y la cantidad de reactivos que se utilizaron.

2.6 MUESTRAS ANALIZADAS

2.6.1 Cápsulas

Cápsulas de gelatina blanda (1)

Contenido neto: 30 cápsulas

Fecha de caducidad: Mar-2012 Lote: 4703129

Ingredientes:

Glucosamina 500 mg

Aceite de soya, Aceite vegetal hidrogenado, Lecitina de soya, Cera de abeja y Dióxido de silicio

Glucosamina cápsulas (2)

Sulfato de Glucosamina 500 mg

Fecha de caducidad: Abr 2010

Ingredientes:

Sulfato de Glucosamina 500 mg

Excipientes cbp.

2.6.2 Tabletas

Glucosamina HCl + msm (1)

Glucosamina HCl

MSM

Fecha de caducidad: Jun 2010

Ingredientes:

Clorhidrato de Glucosamina 750 mg

Metilsulfonilmetano 1500 mg

Sulfato de Glucosamina 1000 mg (2)

Fecha de caducidad: Jun-12

Ingredientes:

Sulfato de Glucosamina 1000 mg

Sulfato de Glucosamina 500 mg (3)

Fecha de caducidad: May 2010

Ingredientes:

Sulfato de glucosamina 500 mg

Condroitina

Metilsulfonilmetano

2.7 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

2.7.1 Cápsulas

Cápsulas de gelatina blanda (1).

Se tomó el contenido de 6 cápsulas y se peso. Al contenido de las cápsulas se les adicionó aproximadamente 60 mL de agua destilada y se puso a baño maría, una vez que se comenzaron a reblandecer todas las grasas y aceites se hizo una extracción de éstos con hexano, 3 extracciones de 20 mL de hexano fueron suficientes. La extracción se hizo lentamente ya que algunas grasas emulsionan con agitación vigorosa, la fase acuosa donde se encuentra la glucosamina se y llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada en un matraz volumétrico, de

esta disolución se llevan a cabo las diluciones necesarias para obtener concentraciones que estén dentro de la linealidad de cada método para su análisis..

Glucosamina Cápsulas (2)

Se tomó el contenido de 6 cápsulas y se preparó una disolución madre Sólo se disolvió en un vaso de precipitados y se filtró, con esto evitamos que la disolución fuera turbia debido a los excipientes con los que se mezcla la glucosamina. Se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada. y de ésta se prepararon las diluciones necesarias que se encontraran en la linealidad de cada método para su análisis.

2.7.2 Tabletas

Glucosamina HCl + MSM (1)

Se tomó una muestra de 4 tabletas, se molieron y se disolvieron en un vaso de precipitados favoreciendo la disolución de la glucosamina en el medio acuoso a 37°C con agitación constante durante 1 hora, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se filtró el sobrenadante directamente en un matraz volumétrico de 100mL y se llevó al aforo con agua destilada, a partir de esta disolución se prepararon las diluciones necesarias que se encontraran en la linealidad del método para su análisis.

Tabletas de Glucosamina (2)

Se tomó una muestra de 4 tabletas, se molieron, se disolvieron en un vaso de precipitados favoreciendo la disolución de la glucosamina en el medio acuoso a 37°C con agitación constante durante 5 minutos, se centrifugo a 3000 rpm durante 5 minutos, se filtró el sobrenadante en matraz volumétrico de 100 mL y se llevo al aforo con agua destilada, a partir de esta disolución se prepararon las diluciones necesarias que se encontraran en la linealidad del método FIA para su análisis.

Tabletas de Glucosamina (3)

Se tomó una muestra de 3 tabletas, se molieron, se disolvieron en un vaso de precipitados favoreciendo la disolución de la glucosamina en el medio acuoso a 37°C con agitación constante durante 5 minutos, se centrifugo a 3000 rpm durante 5 minutos, se filtró el sobrenadante en matraz volumétrico de 100 mL y se llevo al aforo con agua destilada, a partir de esta disolución se prepararon las diluciones necesarias que se encontraran en la linealidad del método FIA para su análisis. .

2.8 ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

La capacidad de las técnicas de análisis instrumental para manejar un intervalo amplio de concentraciones de analito significa que se calculan los resultados y se evalúan los errores aleatorios de una manera concreta, que difiere de la que se utiliza cuando se repite una sola medición varias veces. El procedimiento habitual es como sigue: el analista toma una serie de disoluciones de concentración conocida (normalmente de cuatro a cinco, y posiblemente algunas más) en la que se conoce la concentración del analito. Estas calibraciones estándar se miden en el instrumento analítico en las mismas condiciones que las usadas para las muestras problema (es decir, las desconocidas). Una vez que se ha establecido la gráfica de calibración, se puede obtener la concentración del analito en cualquier muestra problema por interpolación, como se indica en la Figura 17 (20).

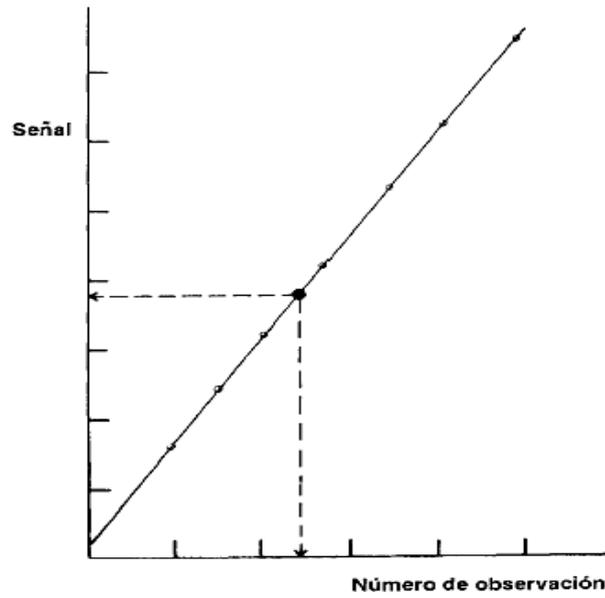


Figura 17. Procedimiento de calibración en análisis instrumental: puntos de calibración (°), Muestras (•).

2.9 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis es que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeñas que los métodos de análisis clásicos. Esta ventaja permite apreciar la importancia de las concentraciones en el nivel de trazas en muchos materiales, contribuyendo así con el desarrollo de muchas otras técnicas en las cuales los límites de detección bajos son el mejor criterio para aplicarlas con éxito.

Es evidente que los métodos estadísticos son importantes para la evaluación y la comparación de los límites de detección.

El límite de detección es un número, expresado en unidades de concentración o cantidad que define la menor concentración o cantidad de un compuesto o elemento que un químico analítico puede determinar y que sea estadísticamente diferente de la señal generada por un blanco.

Según la IUPAC, el límite de detección expresado como una concentración C_L o cantidad Q_L se deriva de la mención más pequeña, X_L , que pueda ser detectada con un razonable nivel de confianza, para un procedimiento analítico.

Una definición que se utiliza en la bibliografía de química analítica es que el límite de detección es la concentración de analito y que proporciona una señal igual a la señal del blanco, Y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, S_B .

$$Y = Y_B + 3 S_B$$

La significación de esta última definición se aclara con mayor detalle en la Figura 18.

Un analista que estudia concentraciones traza se enfrenta a dos problemas, por un lado no desea dar un informe de la presencia de analito cuando está realmente ausente, pero por otro lado, tampoco pretende informar que el analito está ausente cuando de hecho está

Para realizar este cálculo se mide la absorbancia del blanco siete veces y a partir de estas se obtiene el límite de detección partiendo del cálculo de la desviación estándar y la media.

El cálculo de Límite de Detección se realizó a partir de la siguiente ecuación

$$LD = X_{(media)} + 3S$$

2.10 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

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

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

Repetibilidad y reproducibilidad entre y dentro de días

Homogeneidad o Análisis de Varianzas: la varianza de los subgrupos ha de ser homogénea $\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots = \sigma^2_k$ ya que son debidas al error. Se comprobarán mediante la prueba de ANOVA (Figura 19) de un factor como se indica a continuación:

$$\begin{aligned} \sum \sum (Y_{ij} - \bar{y})^2 &= \sum \sum (Y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2 + n \sum_{i=1}^k (\bar{y}_{i.} - \bar{y})^2 \\ \text{S.C.T.} &= \text{S.C.I.} + \text{S.C.E.} \end{aligned}$$

Donde: S.C.T. = SUMA DE CUADRADOS TOTAL

S.C.I. = SUMA DE CUADRADOS INTRA-GRUPOS (within-groups)

S.C.E. = SUMA DE CUADRADOS ENTRE-GRUPOS (between-groups)

En el caso de NO ser BALANCEADO, no habría una solo n sino k distintos valores.

la descomposición quedaría entonces así:

$$\begin{aligned} \sum \sum (Y_{ij} - \bar{y})^2 &= \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2 + \sum_{i=1}^k n_i (\bar{y}_{i.} - \bar{y})^2 \\ \text{S.C.T.} &= \text{S.C.I.} + \text{S.C.E.} \end{aligned}$$

S.C.T. será la suma de las desviaciones de cada Y_{ij} respecto a la media general \bar{y}

S.C.I. será la variación total de las observaciones alrededor de cada una de las medias muestrales

S.C.E. será la variación de las medias muestrales de cada grupo alrededor de la media general

SI DIVIDIMOS LA DESCOMPOSICIÓN DE LA VARIABILIDAD POR LA VARIANZA

$$\frac{\text{S.C.T.}}{\sigma^2} = \frac{\text{S.C.I.}}{\sigma^2} + \frac{\text{S.C.E.}}{\sigma^2}$$

Dado que las observaciones de las k muestras son independientes, cada uno de los tres sumatorios desde $i=1$ hasta $i=k$ es la suma de k variables aleatorias que tienen distribuciones χ^2 de tal manera que

$$\begin{aligned} \text{S.C.T.} / \sigma^2 &\rightarrow \chi^2 \text{ con } (N-1) \text{ grados de libertad} \\ \text{S.C.I.} / \sigma^2 &\rightarrow \chi^2 \text{ con } k(n-1) \text{ grados de libertad} \\ \text{S.C.E.} / \sigma^2 &\rightarrow \chi^2 \text{ con } (k-1) \text{ grados de libertad} \end{aligned}$$

en el caso de diseño NO BALANCEADO $\text{S.C.I.} / \sigma^2 \rightarrow \chi^2$ con $(n_1-1) + (n_2-1) \dots (n_k-1)$ grados de libertad

Bajo la hipótesis nula, la variabilidad entre grupos no deberá superar significativamente a la variabilidad intra grupo luego el cociente **S.C.E / S.C.I. no deberá ser significativamente grande** . Esa **Significabilidad** nos la dará una distribución de probabilidad asociada. Así:

$$\begin{array}{l} \text{S.C.E.} \rightarrow \chi^2_{(k-1)} \\ \text{S.C.I.} \rightarrow \chi^2_{k(n-1)} \text{ ó bien } \chi^2_{(N-k)} \end{array} \quad \text{si multiplicamos el cociente por } N-k / k-1$$

$$\frac{\text{S.C.E.} \cdot (N-k)}{\text{S.C.I.} \cdot (k-1)} \begin{array}{l} \longrightarrow \\ = \end{array} \frac{\chi^2_{(k-1)} / (k-1)}{\chi^2_{(N-k)} / (N-k)} \longrightarrow \boxed{F_{(k-1),(N-k)} \Rightarrow \mathbf{F}}$$

Así para un nivel de significación **α**

Si **$F > F_{\alpha}$** se rechaza la H_0 medias de los grupos no son iguales .

Si **$F < F_{\alpha}$** no se puede rechazar la H_0 ; luego medias de los grupos son iguales

no influye el factor

no hay diferencias significativa entre los niveles

Figura 19. Tabla de ANOVA para un solo factor.

TABLA "ANOVA" DE UN FACTOR.

FUENTE DE VARIACIÓN	GL.	SUMA DE CUADRADOS $F_{(k-1)(N-k)}$
ENTRE-GRUPOS	$k-1$	S. C. E.
INTRA-GRUPOS	$N-:$ $(n_1-1)+(n_2-1)+\dots+(n_k-1)$ no balanceado	S. C. I.
TOTAL		S. C. T.

$$F = \frac{S.C.I. (N-k)}{S.C.E. (k-1)}$$

Para determinar la repetibilidad de la varianza para el método FIA se realizaron análisis durante siete días consecutivos. Estas pruebas consistieron en inyectar 2 estándares de glucosamina de la misma concentración con un mínimo de tres veces en la configuración propuesta. Con cada uno de los datos obtenidos por día se llevó a cabo el tratamiento de ANOVA para un sólo factor.

El resultado de una ANOVA es un valor estadístico de la "F." En este caso el valor de la "F" o la variación entre grupos. Si los resultados son significativos (o sea, si la probabilidad "P" tiene un valor menor a 0.05), el valor de la "F" necesita ser al menos igual al valor crítico para F. Si el valor de F es mayor al valor crítico para F los resultados de nuestras pruebas son significativos. La probabilidad demuestra a qué nivel los resultados son estadísticamente significativos.

Con la tabla de ANOVA se obtienen la suma de cuadrados, los grados de libertad y las medias de cuadrados entre grupos y dentro de grupos (estos grupos son los días). La variación entre grupos o repetibilidad (S_r^2) se determinó tomando en cuenta que S_r^2 es igual a la medida de cuadrados dentro de grupos. Mientras que para calcular la

reproducibilidad dentro de grupos (S^2_{WR}), se determinó de acuerdo a las ecuaciones siguientes:

$$S^2_{\text{entre}} = (\text{SUMA DE CUADRADOS}_{\text{entre}} - \text{SUMA DE CUADRADOS}_{\text{dentro}}) / nj$$

donde: nj es el número de replicas por grupo (día) y S^2 es la medida de cuadrados dentro de grupos (días) (20).

$$\text{dando : } S^2_{WR} = S_r^2 + S_w^2_{\text{entre}}$$

CÁPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA FIA

Los resultados de la optimización del sistema FIA se presentan por separado, aunque en la práctica, los parámetros químicos como los parámetros físicos e hidrodinámicos se optimizaron simultáneamente.

3.1.1 PÁRAMETROS QUÍMICOS

Para determinar la concentración del portador compuesto por ninhidrina y buffer de fosfatos se utilizaron las mismas concentraciones presentadas en la bibliografía encontrada para el método por lote (12).

Estas concentraciones fueron probadas y se observó una señal reproducible, así que las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

- Ninhidrina 0.8% en buffer de fosfatos

El disolvente fue agua destilada. Para el caso de la ninhidrina se probó la concentración de 0.4% y 0.8%, decidiendo trabajar con esta última concentración por presentar una mejor señal.

3.1.2 PARÁMETROS HIDRODINÁMICOS

Se evaluaron diferentes características hidrodinámicas: caudal, volumen de inyección de la muestra y longitud del reactor.

Caudal del portador:

Se evaluó un intervalo de 0.43 mL/min a 0.8 mL/min. En la Figura 20 se muestran las señales obtenidas. Se observa que a caudales bajos la señal es mayor para una concentración de glucosamina de 0.5%; pero cuando se probaron concentraciones de glucosamina mayores, la señal se saturó. El caudal es un parámetro crítico en este análisis ya que la velocidad de reacción del complejo es lenta por lo que el tiempo de reacción influye en la formación del complejo. Aunque un caudal menor a 0.8 mL/minuto aumenta el tiempo de reacción, una vez que se llega a la velocidad inicial la cinética aumenta y el complejo que se forma da una

absorbancia tan alta que satura el sistema. Es decir, si el caudal era muy bajo, la reacción genera una coloración muy intensa debido al tiempo que tarda la muestra en recorrer el reactor y las señales eran muy altas, si el caudal era muy alto, no se formaba el complejo; por lo tanto se tomó el compromiso entre caudal, intensidad de la señal, tiempo de análisis y concentración de saturación y se eligió 0.8 mL/min como el valor óptimo para realizar las siguientes pruebas de optimización.

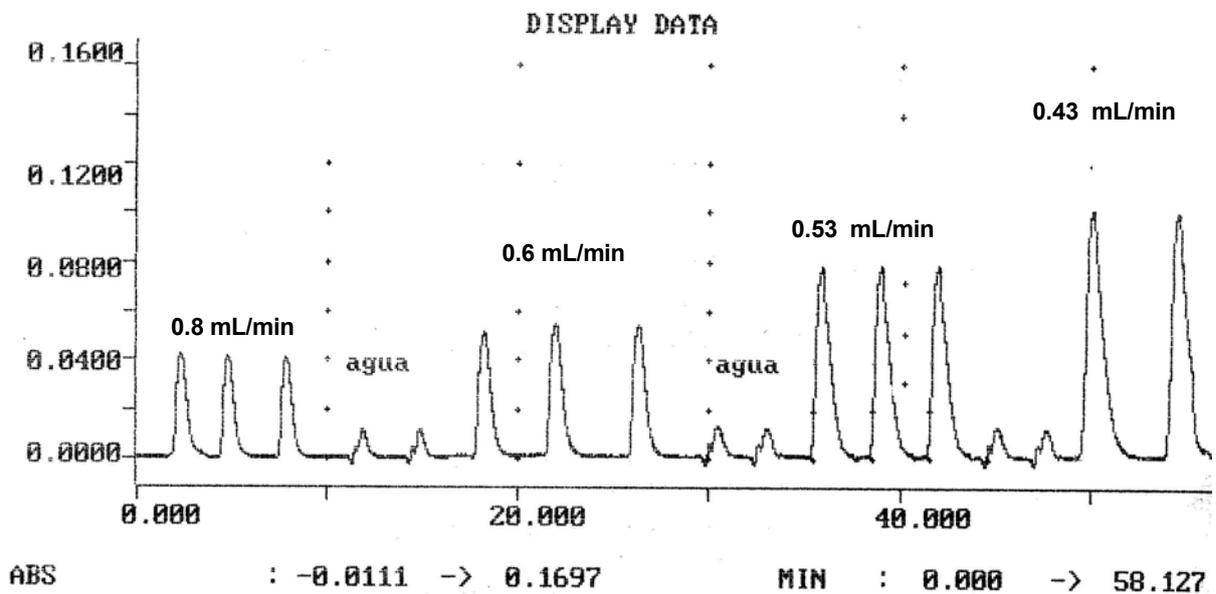


Figura 20. Diagrama para la optimización del caudal para una concentración 0.5% de glucosamina.

Volumen de inyección

Este parámetro se definió probando volúmenes entre 100 y 200 μL , dando mejores señales con 100 μL . A volúmenes más grandes como el de 200 μL la señal se saturaba provocando una deformación del pico y el aumento del tiempo de análisis.

Longitud del reactor en cm

Para este parámetro se probaron longitudes entre 50 y 200 cm. Se eligió el reactor de 200 cm por presentar buena señal y por que el tiempo de reacción es corto lo que implica que el gasto de reactivos no es muy grande. Con 50 cm la señal no se observó ya que el tiempo de reacción era muy corto para la formación del complejo. A 100 cm la respuesta es menor a la observada a 200 cm, así que a esta última longitud tiene el tiempo suficiente para llegar a un punto en que la cantidad de producto es suficiente para tener señales dentro de la linealidad.

Temperatura

Este parámetro presentó la mayor problemática debido a que es difícil de controlar, a pesar de utilizar un baño termostataado. Si la temperatura era muy alta, alrededor de 80°C dentro del reactor se formaban burbujas que llegaban al detector impidiendo medir la absorbancia de forma adecuada, además la coloración del complejo era muy intensa saturando el sistema. Después de probar varias temperaturas la que mejor se controlaba fue la de 75°C y la intensidad de la señales se encontraban dentro de los parámetros del equipo.

El baño utilizado tenía una precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$, lo que ocasionó diferencia en la absorbancia de una misma disolución, ya que a 74°C la señal era 7% menor que a 76°C .

En este trabajo la temperatura fue detectada como la responsable de los errores sistemáticos en este análisis. Como se comprobó al hacer el estudio estadístico de ANOVA.

3.1.3 CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS

a) Caudal.....0.8 mL/minuto (30rpm)

b) Volumen de inyección.....100 µL

c) Longitud del reactor.....200 cm

d) Portador

d.1 Concentración ninhidrina.....0.8%

d.2 Concentración del Buffer de Fosfatos.....0.2 M

d.3 pH del buffer6

e) Longitud de onda de medición.....570 nm

3.2 CURVAS DE CALIBRACIÓN

En esta sección se muestran los resultados obtenidos de las curvas de calibración con las disoluciones descritas en el apartado 2.4 tanto por el método por Lote como por FIA.

Método FIA

En la Tabla 2 y en la Figura 21 se muestran los datos y la representación gráfica de la curva de calibración.

Concentración (% glucosamina)	Absorbancia λ 570 nm (media)
0.3	$0.2792 \pm 9.555 \times 10^{-3}$
0.4	$0.6713 \pm 1.700 \times 10^{-3}$
0.6	$1.5149 \pm 1.500 \times 10^{-3}$
0.8	$2.3317 \pm 1.700 \times 10^{-4}$
1.0	$3.2401 \pm .0100$

Tabla 2. Datos para la curva de Calibración

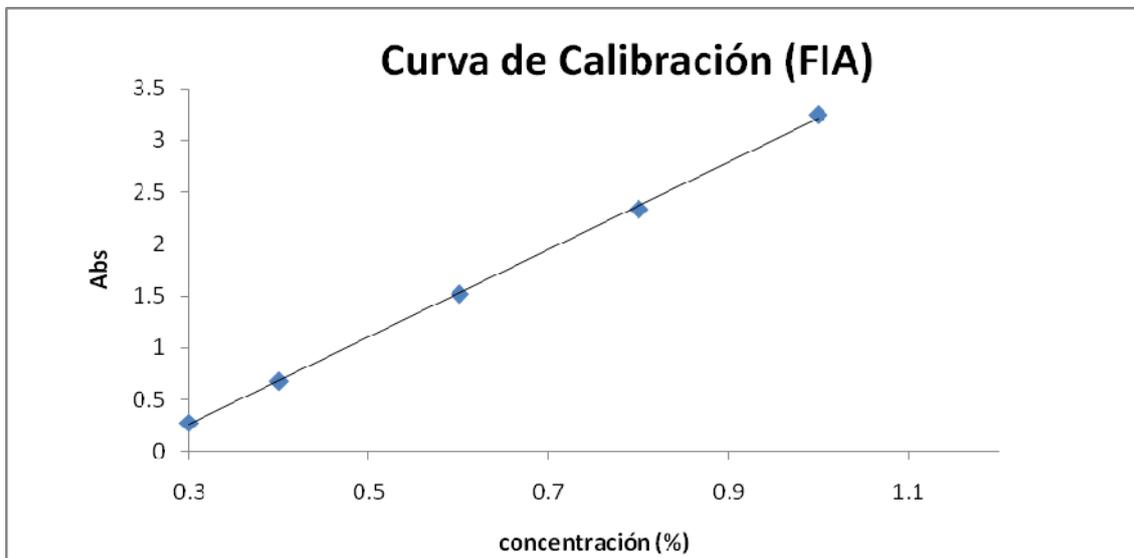


Figura 21. Curva de Calibración por FIA

La ecuación de la recta obtenida fue:

$$Y = 4.2183(\pm 0.13)x - 1.0079(\pm 0.09)$$

Con un coeficiente de correlación de:

$$r = 0.9998$$

y un límite de detección de 0.24 %.

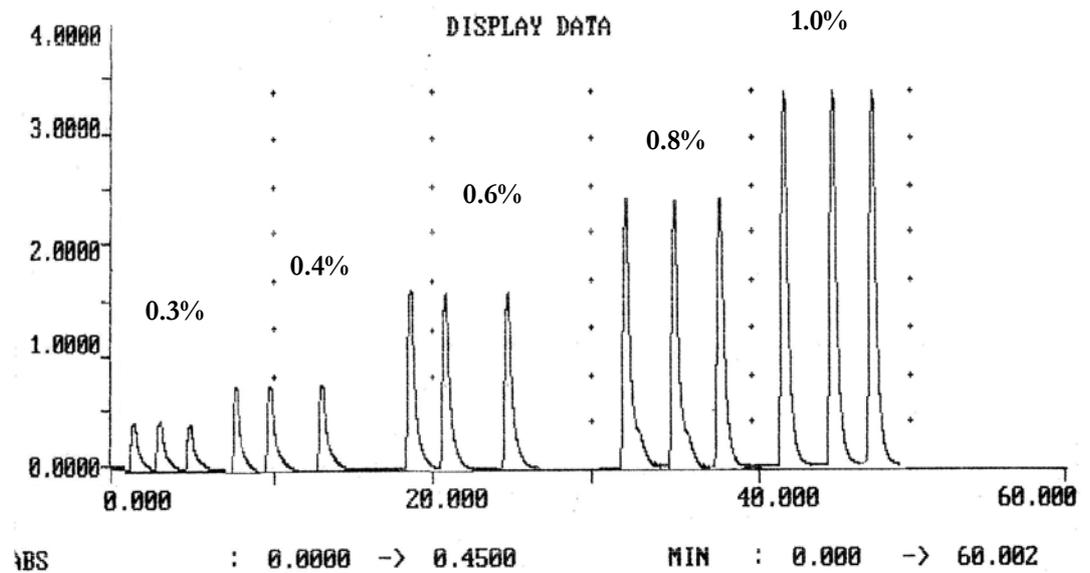


Figura 22 Diagrama Curva de Calibración

Método por Lote

En la tabla 3 y en la figura 23 se muestran los datos y la representación gráfica de la curva de calibración.

Concentración (% glucosamina)	Absorbancia λ 570 nm
0.01	$0.0215 \pm 1.247 \times 10^{-4}$
0.02	$0.5879 \pm 8.164 \times 10^{-5}$
0.03	$1.7483 \pm 4.1899 \times 10^{-4}$
0.04	$2.4259 \pm 8.9938 \times 10^{-4}$

Tabla 3. Datos para la curva de Calibración

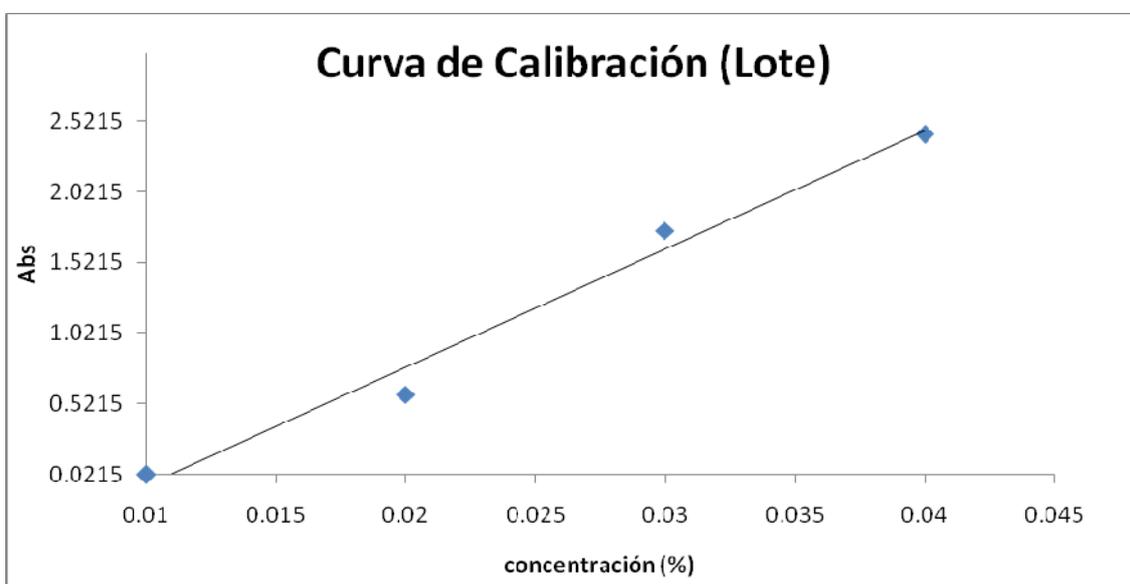


Figura 23. Curva de calibración para el método por Lote

La ecuación de la recta obtenida fue:

$$Y = 83.736(\pm 6.465)x - 0.8975(\pm 0.16)$$

Con un coeficiente de correlación de:

$$r = 0.9956$$

y un límite de detección de 0.006 %.

3.3 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO FIA

Para establecer la precisión del método propuesto se realizó un estudio de ANOVA. Se prepararon a diario dos muestras (utilizando el reactivo estándar) de la misma concentración (0.5% de glucosamina) y se inyectaron en el sistema FIA 5 veces cada muestra durante siete días. En la Tabla 4 se muestran los resultados, donde cada muestra se realizó con el estándar de glucosamina y los resultados están expresados en % de glucosamina

Día	Muestra 1 (%)	Muestra 2 (%)	Suma	Media
1	0.4220	0.4310	0.8530	0.4265
2	0.3750	0.3716	0.7466	0.3733
3	0.3850	0.3844	0.7694	0.3847
4	0.3944	0.3885	0.7829	0.3914
5	0.4131	0.4150	0.8281	0.4140
6	0.4174	0.4065	0.8239	0.4119
7	0.4073	0.4093	0.8166	0.4083

Tabla 4. Datos de absorbancia para repetibilidad y reproducibilidad.

Con los resultados de la Tabla 5 se calculó la repetibilidad y reproducibilidad del método utilizando una tabla ANOVA de un solo factor.

Donde H_0 (Hipótesis nula): No hay diferencia significativa en el análisis entre días y dentro de días.

FUENTE	SC	GL	CUADRADO MEDIO	Fcal
ENTRE DIAS (S _t)	0.0042	6	0.0007	F= 0.0007/ 1.81536 x 10 ⁻⁵ = 38.5598
DENTRO DE DIAS (S _R)	0.0012	7	1.81536 x 10 ⁻⁵	
TOTAL	0.00439	13	-----	

Tabla 5. Calculo ANOVA

Calculo para la determinación de Repetibilidad y Reproducibilidad del método.

Repetibilidad (Sr)

$$S_r^2 = 1.181536 \times 10^{-5} \text{ por lo tanto:}$$

$$S_r = 4.260704167 \times 10^{-3}$$

Reproducibilidad (SwR²)

$$S_{WR}^2 = S_r^2 + S_{r_{\text{entre}}}^2$$

$$S_{\text{entre}}^2 = (MC_{\text{entre}} - MC_{\text{dentro}}) / n_j \text{ donde } n_j \text{ es el número de columnas}$$

$$S_{\text{entre}}^2 = (0.000705473 - 1.81536 \times 10^{-5}) / 2 = 3.436597 \times 10^{-4} \text{ por lo tanto}$$

$$S_{WR}^2 = 1.81536 \times 10^{-5} + 3.436597 \times 10^{-4} = 3.618133 \times 10^{-4}$$

Repetibilidad

$$\% \text{ rsd} = (S_r / x_{(\text{media})}) \times 100; \text{ por lo tanto}$$

$$\% \text{ rsd} = (4.260704167 \times 10^{-3} / 0.4014) \times 100 = 1.0614\%$$

Reproducibilidad

$$\% \text{ rsd} = (S_{WR} / x_{(\text{media})}) \times 100 \text{ por lo tanto}$$

$$\% \text{ rsd} = (0.01902 / 0.4014) \times 100 = 4.7384\%$$

En la tabla 6 se muestra una diferencia notable en el MC entre días y dentro de días. Para que exista algún error sistemático $Mc_{Días}$ debe ser mayor que Mc_{Dentro} y el valor calculado de F será mayor que el valor crítico en tablas.

Valor crítico en tablas:

$$F_{tab} = 3.8659$$

$$F_{cal} > F_{tab}$$

Nota: El valor de significancia del cálculo es de 95%

Con el cálculo de la tabla ANOVA observamos que existe diferencia en el análisis entre días y dentro de días, este error sistemático lo asociamos como ya se mencionó a la temperatura ya que la formación del complejo es muy sensible a cambios pequeños de temperatura.

3.4 COMPARACIÓN DE MÉTODOS ENTRE LOTE Y FIA

En primer lugar se probaron las mismas concentraciones de glucosamina que para el método manual pero por el sistema propuesto no se observó ningún cambio en la absorbancia esto es que para el método FIA no se observaron señales diferentes a las de la lectura del blanco, así que se probaron concentraciones mayores dando un intervalo lineal desde 0.3 % hasta 1.0 %. La ecuación de la recta obtenida fue: $Y = 4.22X - 1.00$, con un coeficiente de regresión de 0.9995 y un límite de detección de 0.24 %. Aunque las concentraciones detectadas son mayores que por el método manual el intervalo lineal es más amplio.

Cuando las concentraciones son mayores a 1 %, el valor de absorbancia es tan alto que satura la señal y cuando son menores a 0.2 % no se observa diferencia con el blanco.

La reacción de glucosamina con ninhidrina depende en gran medida de la temperatura y del tiempo de reacción; con la configuración propuesta el tiempo de reacción fue el tiempo que

transcurre desde la inyección de la muestra hasta llegar al detector (2.15 min) a una temperatura de trabajo de 75 °C. Aún en estas condiciones se observa la formación del complejo de Ruhemann pero a concentraciones más altas que con el método manual debido a que la constante de reacción y la energía de activación son diferentes cuando la reacción se desarrolla en un sistema de flujo laminar, el cual origina un perfil parabólico de velocidades: las moléculas en las paredes del tubo tienen una velocidad lineal de cero mientras que las moléculas que discurren por el centro del tubo tienen una velocidad del doble de la velocidad media. En el Análisis por Inyección en Flujo la cinética de reacción es muy importante ya que las mediciones no se hacen al equilibrio lo que provoca que la señal analítica dependa mucho de la velocidad de reacción y de la energía de activación, ya que si aumenta la velocidad de reacción el producto medido tiene menor dispersión y la señal es más alta. En el caso del método propuesto la velocidad de reacción se incrementa y la energía de activación disminuye con respecto al método manual. Para calcular la constante de reacción aparente (K') se utilizó la curva de calibración para cada método a la temperatura de estudio. En el caso del método FIA se consideró el tiempo de reacción como el tiempo desde que se inyecta hasta el máximo de la señal (135 seg) que es la absorbancia que se utilizó para hacer las curvas de calibración. Para el método manual el tiempo fue de 30 min. La energía de activación aparente (E_a') se calculó a partir de la ecuación de la recta:

$$E_a' = \text{pendiente} \times 2.303R; \text{ Donde } R = 1.987 \text{ cal/mol } ^\circ\text{K}$$

En la Tabla 6 se muestran las energías de activación y la velocidad de reacción para el método por lote y el método propuesto.

Método	K' (s^{-1})	E' ($KJmol^{-1}$)
FIA (75 °C)	0.031	0.080
Lote (92.5 °C)	0.045	1.620

Tabla 6. Velocidad de reacción aparente (K') y Energía de activación aparente (E') para el método FIA propuesto y el método en Lote.

3.5 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras se analizaron por los dos métodos. La tabla 7 muestra los resultados de los análisis realizados por el método LOTE y la tabla 8 muestra los resultados para el análisis por FIA.

Cada muestra se realizó por duplicado, así que los resultados contenidos en la tabla 7 y 8 son el promedio de los dos análisis de cada muestra, para evaluar posibles interferencias en los métodos por Lote y FIA se fortificaron las muestras con 100 mg y 300 mg para cápsulas (1) y con 100 mg para cápsulas (2) y tabletas (1), (2) y (3), la fortificación se realizó de la siguiente forma para cada una de las muestras y replicas:

Se adiciona esta concentración conocida a una réplica de cada muestra, esta muestra fortificada es leída y a partir de este resultado se obtiene el % de recuperación, esto es utilizando la muestra no fortificada más la concentración conocida como el 100% y la muestra fortificada como la incógnita para obtener la recuperación.

Muestra	mg/unidad	mg encontrados/unidad	% recuperado
Tableta (1)	750	660 ± 60.7	103
Cápsula (1)	500	401 ± 14.8	98
Cápsula (2)	500	587 ± 12.6	100

Tabla 7 Resultados de las muestras analizadas por el método LOTE.

Los resultados obtenidos por el método por lote nos indican que la muestra contiene una cantidad en miligramos por unidad dentro de un 83% a un 120% de la indicada en el marbete, de igual forma, para el análisis FIA se observan concentraciones dentro de un 76% a un 110% de la indicada en el marbete, para los resultados de 83% en el caso del método por Lote y para 76% por el método FIA se trata de la misma muestra (Cápsula 1), este resultado puede ser atribuido al método de análisis de la muestra que contiene además de la glucosamina grasas y aceites así que está requiere de una extracción con hexano y la muestra puede quedar atrapada en alguna grasa o aceite y así obtener una cantidad en miligramos menor a la indicada en el marbete.

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos para el método por FIA donde los resultados muestran dosis muy similares a las indicadas en los marbetes de las presentaciones analizadas, de la misma forma podemos comparar entre los dos métodos y observar que las diferencias entre ellos es para el caso de: Capsula 1 una diferencia de 23 mg de glucosamina por unidad, para Capsula 2 la diferencia es de 115 mg de glucosamina y para el caso de Tableta 1 la diferencia es de 95 mg de glucosamina. Esto nos indica que los resultados entre ambos métodos no se encuentran tan alejados unos de otros, por lo que se decidió para Tabletas (2) y Tabletas (3) sólo analizarlas por el método FIA ya que el análisis por lote representa algunas complicaciones como es el largo tiempo de análisis, el poco control de la temperatura y un menor gasto de reactivos.

Muestra	mg/unidad	mg encontrados/unidad	% recuperado
Cápsula (2)	500	472 ± 45.0	99
Cápsula (1)	500	378 ± 15.6	103
Tableta (1)	750	755 ± 31.6	104
Tableta (2)	1000	1104 ± 31.6	109
Tableta (3)	500	510 ± 3.36	105

Tabla 8. Resultados de las muestras analizadas por el Método por FIA

La tabla 7 y 8 nos permiten observar los resultados de las muestras analizadas y observar si el suplemento alimenticio cumple con lo que declara en el marbete y de la misma manera analizar si el método propuesto en esta tesis se puede utilizar en la cuantificación de glucosamina en los llamados suplementos alimenticios promover que los suplementos alimenticios tengan más exigencia por aquellas instituciones dedicadas a la regulación de dichos productos, ya que muchos suplementos alimenticios han sido retirados del mercado por presentar toxicidad o no cumplir con lo que indica en el marbete.

Este método podría ser incluido en el sistema de control de calidad dentro de los laboratorios que se dedican a la producción de éstos.

A pesar de que las muestras antes descritas cumplan con lo descrito en el marbete estos productos manejan información confusa en etiqueta que manipula al cliente, ya que declara al frente de la etiqueta una cantidad de principio activo por tableta, cápsula etc. y en la tabla de información nutrimental otra, declarando que por dosis de 2, 3 etc. unidades se obtiene lo descrito al frente de la etiqueta.

Con los resultados del porcentaje de recuperación concluimos que el método propuesto mide glucosamina sin interferencias, ya que estos porcentajes se encuentran muy cerca al $100\% \pm 10\%$, con esto decimos que la cantidad adicionada de glucosamina en las fortificaciones es la cantidad recuperada, por lo que no interfiere ningún componente de las formulaciones en la lectura.

En el análisis por lote podemos observar que los porcentajes de recuperación son muy cercanos al 100% por lo que en este tipo de ensayo se asegura que no existen interferencias y nos permite analizar sólo glucosamina. Por lo que podemos decir que son métodos equivalentes y que es posible montar un equipo FIA confiable para el análisis de glucosamina con todas las ventajas de un análisis FIA como son la

obtención de una gran cantidad de análisis y en poco tiempo. El método FIA trabaja con muestras del orden de microlitros haciendo que el tiempo de análisis disminuya y sin necesidad de que la reacción que se lleva a cabo tenga que llegar al equilibrio, ya que la lectura siempre se da a un mismo caudal y a un mismo tiempo, logrando así que también el gasto de reactivos también sea menor y con esto se pueda tener un proceso de análisis más amigable con el medio ambiente al generar menos residuos. Todas estas ventajas nos llevan a tener un análisis menos costoso en insumos a pesar de requerir personal capacitado experto en FIA.

3.6 ESTUDIO DE COSTOS

Tipo de Análisis	Glucosamina	Ninhidrina	Buffer PO ₄ ²⁻ 0.2M	Agua Destilada	Tiempo de Análisis
Lote	4 mL	1.0 mL		4 mL	50 minutos
FIA	0.1 mL	1.4 mL		—	104 segundos

Tabla 7. Cantidad de reactivos y tiempo utilizado para ambos métodos

Ninhidrina

Tiene un costo de 93.50 USD por cada 50 g

En ambos análisis se prepara una solución de 0.8 % de ninhidrina que equivalen a un gasto de 1.496 USD cada análisis. Para el método FIA se necesitan 100 mL con los que se obtienen 70 análisis, cada uno de estos análisis tiene un costo de 2.1 centavos, por el método por Lote con 100 mL de ninhidrina se obtienen 200 análisis con un costo individual de 0.75 centavos, siendo el método por lote un 64% más barato en el consumo de ninhidrina.

Glucosamina

Tienen un costo de 72.10 USD por cada 100 g

Para el análisis por FIA el estándar con concentración más alta se tiene una disolución de 1g de glucosamina en 100 mL de agua destilada, en cada análisis sólo se inyectan 100 µL de muestra de glucosamina con un costo de 0.072 centavos. Para el método por lote se utiliza una disolución de 0.04 g de ninhidrina en 100 mL de agua destilada y de esta disolución se requieren 4 mL de muestra por análisis, que contienen 1.6×10^{-3} g de glucosamina con un costo de 0.11 centavos. El análisis por el método FIA es un 34.5% más barato en el consumo de glucosamina.

Agua Destilada

Tiene un costo de 87.40 USD por cada 4L

Para el análisis por FIA se utilizan 100 mL de agua destilada, con un costo de 2.185 USD, por cada lectura se gastan 1.4 mL de agua del portador más 100 μ L de muestra por lo que se gastan 1.5 mL por análisis, por cada 100 mL de agua se obtienen aproximadamente 64 análisis por lo que cada uno de los análisis tendría un costo de 3.26 centavos. Para el análisis por el método por lote se gasta 4 mL por análisis y cada análisis tiene un costo de 8.7 centavos por lo que el método FIA es un 62 % más barato.

El método FIA permite hacer 30 determinaciones por hora, mientras que en el método por Lote sólo se realiza 1 determinación. El análisis de una muestra o estándar se realiza en 2 min por FIA y en 50 min por el método por lote

El método FIA logra mejorar el costo del análisis no sólo en el gasto de reactivos, sino que también logra reducir horas hombre y tiempo de análisis, con esto las partes interesadas ofrecen mejores servicios y de buena calidad, todo en menos tiempo y con un costo más bajo.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

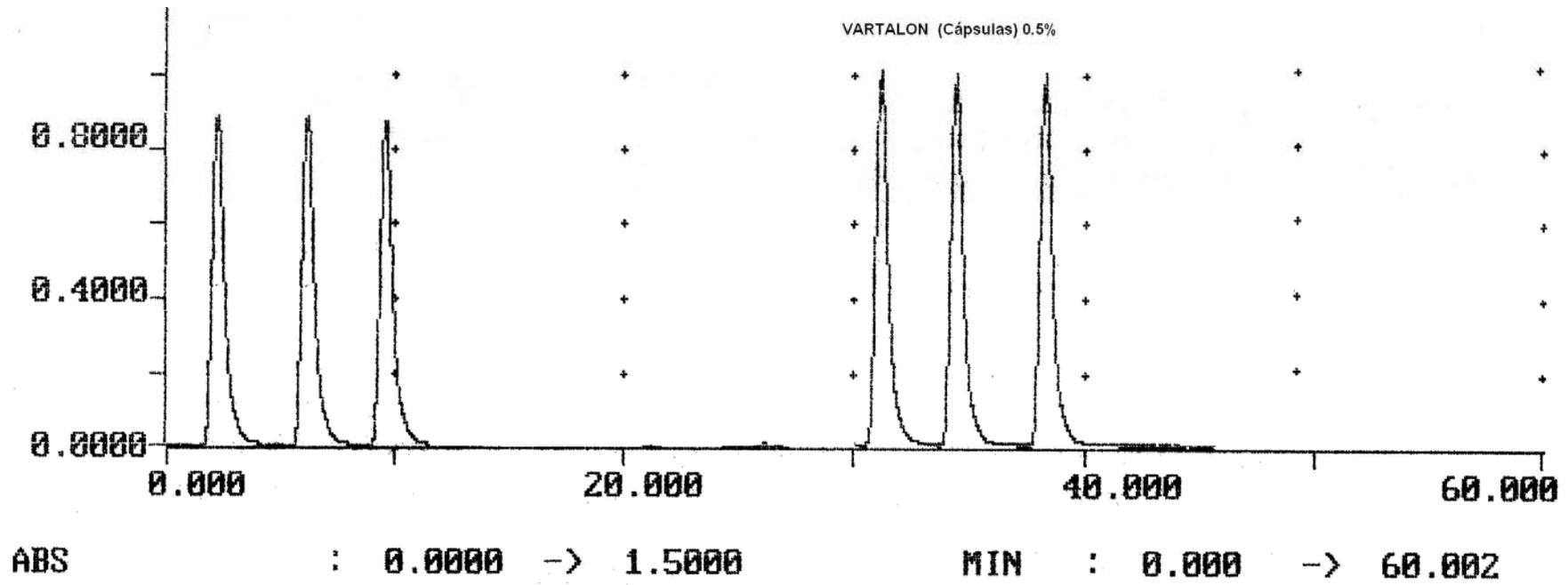
Al terminar el trabajo experimental se concluyen los siguientes puntos:

- Se desarrolló un sistema automático por análisis por inyección en flujo y detección espectrofotométrica para la determinación de glucosamina en suplementos alimenticios utilizando ninhidrina como reactivo principal.
- Se logró utilizar un mínimo de reactivos para el análisis y detección de glucosamina, generando menos residuos y con costos más bajos, por lo tanto se tiene un análisis más limpio.
- Se optimizaron las condiciones de trabajo para la cuantificación de glucosamina por FIA en suplementos alimenticios.
- Se establecieron diferentes tratamientos para las muestras, de acuerdo a su presentación
- La comparación de un método ya probado con este método propuesto nos permite generar toda la información escrita necesaria para validar el método propuesto, que tiene como ventajas el ser más rápido, preciso y con un menor costo

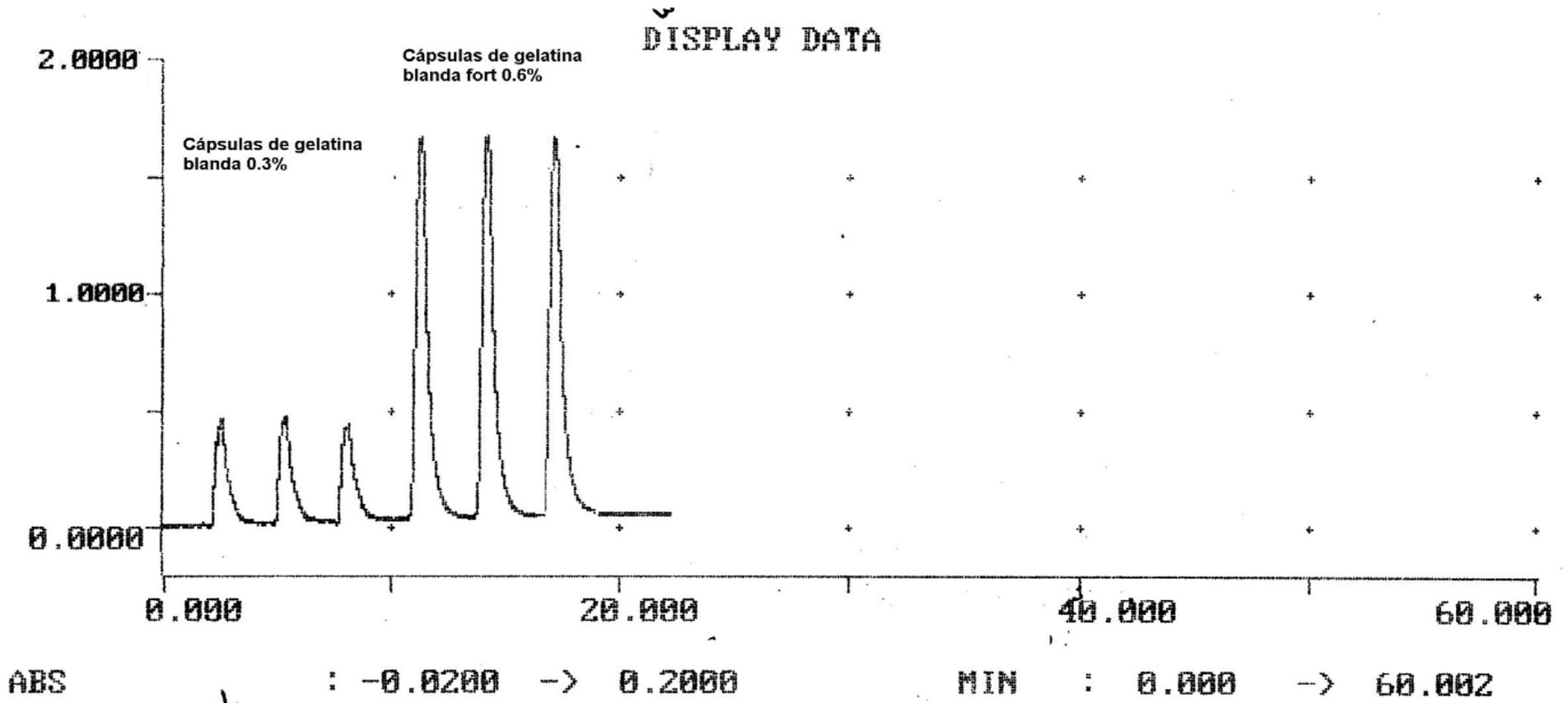
ANEXO I
FIAGRAMAS

ANEXO I

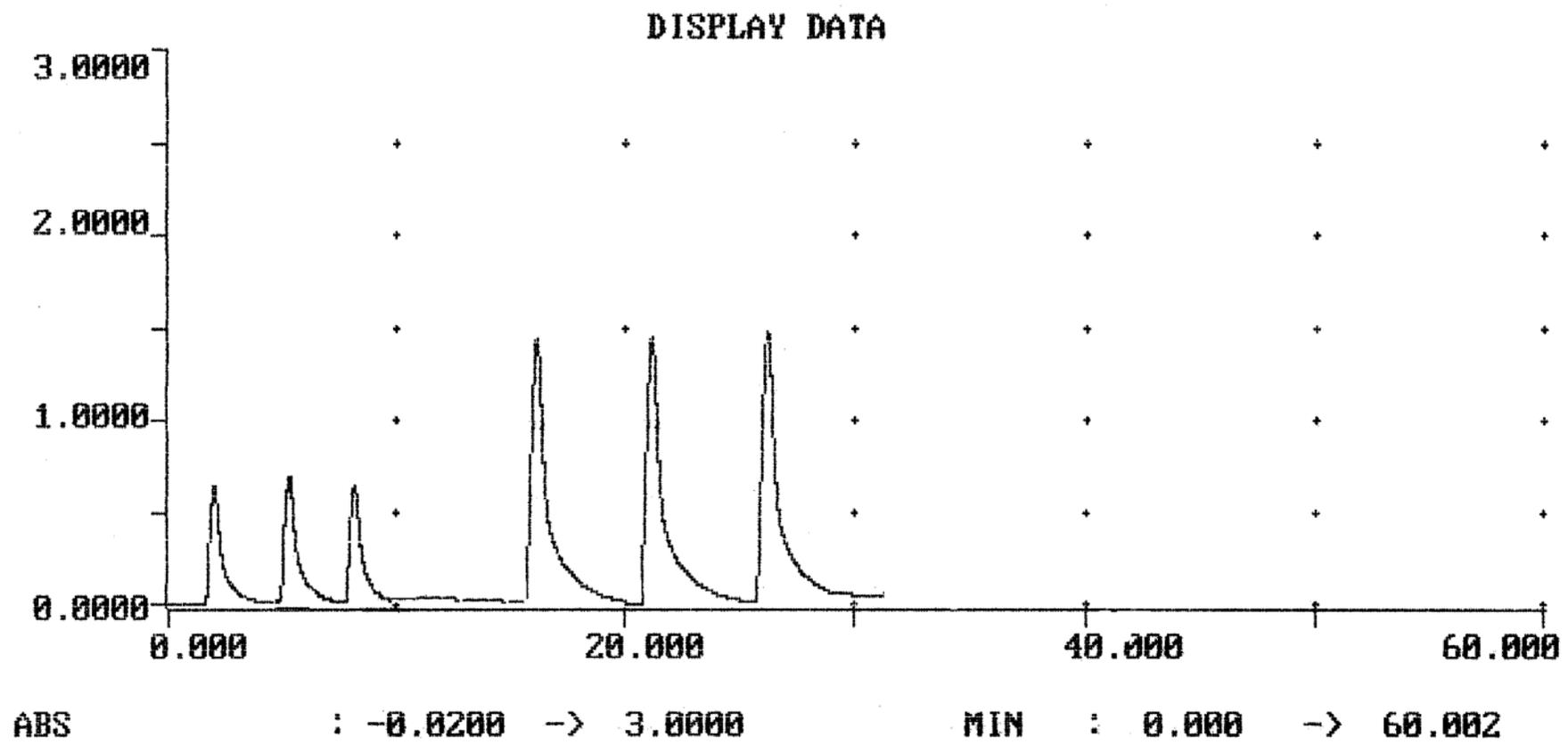
FIAGRAMAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS



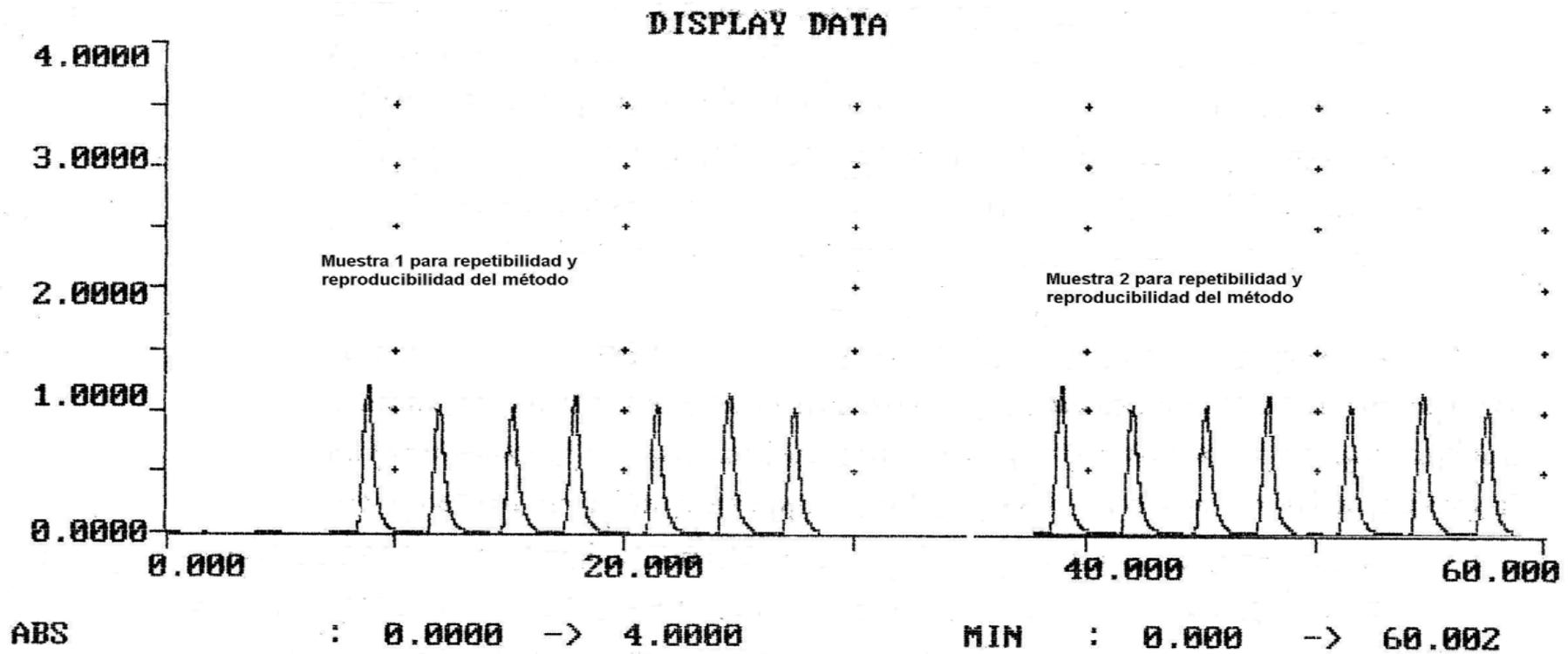
Figrama 1 Muestra Cápsula (2)



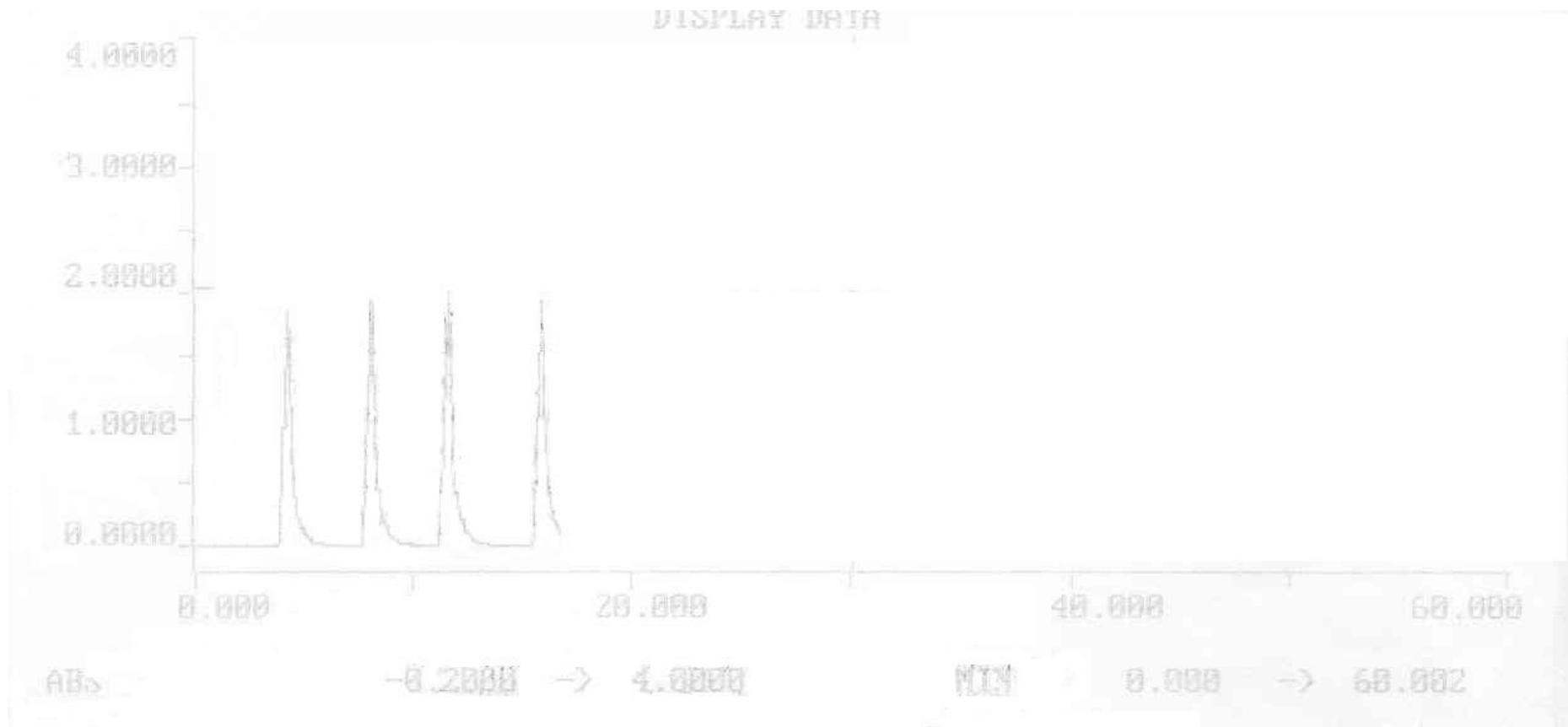
Figrama 2 Muestra Cápsulas (1)



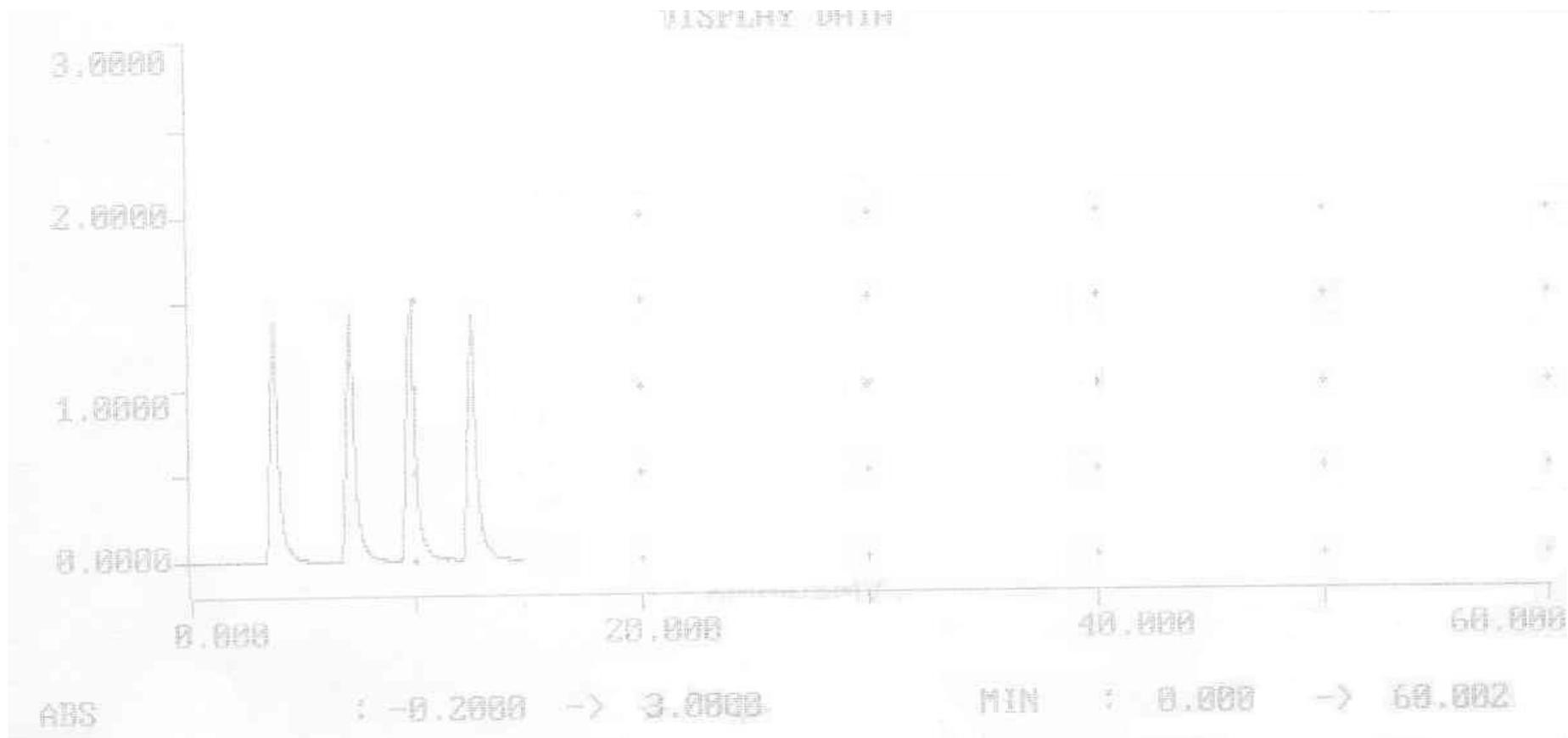
Figarama 3. Muestra Tableta (1)



Figurama 4 Ejemplo de lecturas para obtener repetibilidad y reproducibilidad del método



Figarama 5 Muestra Tableta (2)



Figarama 5 Muestra Tableta (1)

BIBLIOGRAFIA

- 1) Kirk, Raymond E: "Enciclopedia de Tecnología Química" Volumen 13 1ra Edición en Español. Editorial Hispano-Americana. México 1961. Pag. 423-428
- 2) <http://www.soyentrepreneur.com/pagina.hts?N=13297&Ad=S>
- 3) Cristóbal Láres Velásquez. Quitina y Quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. Avances en Química, 1 (2), 15-21 (2006)
- 4) AZTI-Tecnalia, Centro Tecnológico experto en Investigación Marina y Alimentaria. IRENE PERAL, IRENE GARTZIA. AZTI, Elementos valiosos en los residuos de industrias transformadoras de productos de la pesca: Quitina-Quitosano y sus aplicaciones
<http://www.azti.es/verpagina.asp?nodo1=32&nodo2=0&content=89&pagina=119&lista=si>
- 5) Francisco J. Blanco Sulfato de condroitina, Sulfato de glucosamine y Ácido hialurónico : Mecanismo de acción. Laboratorio de investigación, Servicio de reumatología. Hospital Juan Canalejo. A Coruña Condo Protección Diciembre 2002 pag. 4-6
- 6) Ingrid Möller Parera. Ventajas Terapéuticas de la utilización de los fármacos de acción sintomática lenta para el tratamiento de la artrosis. Especialista en Reumatología. Instituto Poal de Reumatología Barcelona. Condo Protección Diciembre 2002 pag. 7-8

7) Moskowitz RH Treatment of Osteoarthritis. States of the art lecture. American College of Rheumatology, Washington 1997

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

9) Alicia Pardo, Patricia Salazar, Marinela Colina, Rodolfo Salas, Brinolfo Montilla. Absorción de cobre y cobalto utilizando quitosano obtenido a partir de los desechos de la industria camaronera y cangrejera. LabCiencia con noticias en el laboratorio 4-2006 p. 14-16

10) The antioxidant activity of glucosamine (hydrochloride in vitro) Bioorganic & Medicinal Chemistry Vol. 14 issue 6,15 March 2006, Pages 1706-1709

11) Masato Tominaga, Makoto Magashima, Isao Taniguchi. Controlled potential electrosynthesis of glucosamine acid from glucosamine at a gold electrode. Electrochemistry Communications. Vol 9 (2007) pag. 911-914

12) Yunqui Wu, Munir Hussain, Reza Fassihi. Development of a simple analytical methodology for determination of glucosamine release from modified release matrix tablets Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.38 (2005) pag. 263-269

13) Para monografías sobre métodos automáticos, véase:

J. K. Foreman y P. B. Stockwe11, Automatic Chemical Analysis. New York: Wiley, 1975; M. Valcárcel y M. D. Luque de Castro, Automatic Methods of Analysis. New York: Elsevier, 1988; V. Cerda y G. Ramis, an Introduction to Laboratory Automation. New York: Wiley, 1990

14) Para las monografías sobre análisis por inyección en flujo, véase:

J. Ruzicka y E. H. Hansen, Flow Injection Analysis, 2.^a ed. New York: Wiley, 1988; M. Valcárcel y M. D. Luque de Castro, Flow Injection Analysis. Principles and Applications. Chichester, England: Ellis Horwood, 1987; B. Karlberg y G. E. Pacey, Flow Injection Analysis. A Practical Guide. New York: Elsevier, 1989.

- 15)** Análisis por inyección en flujo: Herramienta clave para la automatización analítica. Journal of Mexican Chemical Society, abril-junio, año/vol 46, numero 002 Sociedad Quimica de México pp.167-174. Ma.. Del Pilar Cañizares Macías 2002
- 16)** J. Ruzicka & E. H. Hansen, Analytica Chimica Acta, 78 (1975) pag 145-157.
- 17)** J. Ruzicka & E. H. Hansen, Analytical Chemistry, March 1 (2000) pag 212– 217.
- 18)** Kate Grudpan, Colin Taylor, Ans Sitter & Cornelius Keller; Fresenius J. Anal. Chem. 1993; 346. pag 882-884
- 19)** K. K. Stewart, G. R. Beecher y P. E. Hare, Anal. Biochem., 1976, 70, 167; J. Ruzicka y E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta, 1975, 78, 145
- 20)** J.C. Miller J.N. Miller Estadística para Química Análítica, Segunda edición, 1998 Cap del I al V
- 21)** Mathieu P. (Radiological progression of internal femoro-tibial osteoarthritis in gonarthrosis. Chondro-protective effect of chondroitin sulfates ACS4-ACS&) Presse Med. 2002 Sep 14;31(29): 1386-90. French
- 22)** [Http://www.arthritis.org/espanol/terapias-alternativas-cpcomplementarias-glucosamina.php](http://www.arthritis.org/espanol/terapias-alternativas-cpcomplementarias-glucosamina.php)
- 23)** K. K. Stewart, g. R. Beecher & p. E. Hare, anal. Biochem., 1976 pag
- 24)** Tesis Obtención de Glucosamina a partir de productos pesqueros no utilizados. UNAM Elva Elizabeth Maguey Reyes Abril 2007
- 25)** Tesis Desarrollo de un método automatizado para la determinación de metales pesados con ditizona micelar por análisis por inyección en flujo. UNAM José Manuel Orozco Gómez 2007