

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Análisis de la cantidad real de glucosamina contenida en varios suplementos dietéticos por
espectrofotometría ultravioleta (UV)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con
mención en Química Analítica

FREDDY RAFAEL SÁNCHEZ TAPIA

Quito, 2011

CERTIFICADO

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, mención Química Analítica, del candidato Freddy Rafael Sánchez Tapia, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha:

Dra. Lorena Meneses Olmedo

DEDICATORIA

A mis queridos padres por el permanente apoyo en este camino de formación personal y profesional, por todo el sacrificio que hicieron por darme una buena educación, por su ejemplo de responsabilidad, perseverancia y entrega. A mis hermanos, Carolina y Jorge, quienes con su paciencia y consejos han sido un soporte moral invaluable en mi vida. Finalmente, quiero dedicar este trabajo a una persona que ya es parte de mí, que motiva cada uno de mis días, mi sobrino Isaac Rafael.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Escuela de Ciencias Químicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), por facilitarme los medios necesarios para llevar a cabo la presente investigación. Quiero extender este reconocimiento al Ing. Christian Arias quien me ha colaborado desinteresadamente durante mi estancia en la universidad.

Un agradecimiento muy especial a mi directora de disertación, Dra. Lorena Meneses Olmedo, que en su particular forma, forjó en mí gran parte del profesional que hoy soy.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA	i
CERTIFICADO DE FINALIZACIÓN DE LA DISERTACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1. GLUCOSAMINA.....	6
1.1. BIOQUÍMICA.....	8
1.2. LA GLUCOSAMINA COMO SUPLEMENTO DIETÉTICO	11
1.2.1. Suplemento dietético	11
1.2.2. Propiedades de la glucosamina.....	12
1.2.2.1. Evidencia científica.....	14
1.3. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE GLUCOSAMINA.....	16
1.3.1. Proceso biológico.....	16
1.3.2. Proceso químico.....	17
1.3.2.1. Sulfato de glucosamina	19
1.3.2.2. Sulfato de glucosamina (forma covalente).....	20

1.3.2.3. Cocristales y coprecipitados de glucosamina.....	21
1.3.2.4. Clorhidrato de glucosamina	22
1.3.2.5. Mezclas físicas	23
1.3.2.6. Comparación de las distintas sales de glucosamina	24
1.3.3. Proceso industrial.....	26
1.4. DOSIFICACIÓN	28
1.4.1. Adultos (18 años y mayores)	29
1.4.2. Niños (menores de 18 años)	29
1.5. MECANISMO DE ACCIÓN	30
1.6. FARMACOCINÉTICA	31
1.7. PRECAUCIONES	32
1.8. INTERACCIONES.....	32
1.9. ANÁLISIS QUÍMICO.....	33
1.9.1. Ninhidrina	35
1.9.2. Ortoftalaldehído	37
1.9.3. Fenilisotiocianato.....	39
1.9.4. 9-fluoroenilmetil cloroformato	40
1.9.5. 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato	41
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1. MUESTRAS	44
2.2. ESTÁNDARES	46
2.3. REACTIVOS	46
2.4. MATERIALES	46
2.5. EQUIPOS.....	47
2.6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	47

2.6.1. Preparación de acetato de sodio 0.1M	47
2.6.2. Preparación de metanol al 60%	47
2.7. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	48
2.7.1. Preparación de la solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml) ...	48
2.7.2. Derivatización y análisis de la solución patrón de sulfato de glucosamina...	48
2.7.3. Preparación de muestras	49
2.7.4. Derivatización y análisis de muestras	50
2.8. PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	51
2.8.1. Linealidad	52
2.8.2. Exactitud	54
2.8.2.1. Método de adición de estándar	56
2.8.3. Selectividad.....	56
2.8.4. Precisión	57
2.9. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR ULTRAVIOLETA-VISIBLE	60
2.9.1. Ley de Beer.....	61
2.9.2. Limitaciones de la Ley de Beer	63
2.9.2.1. Desviaciones propias.....	63
2.9.2.2. Desviaciones instrumentales	64
2.9.2.2.1. Radiación policromática.....	64
2.9.2.2.2. Radiación parásita	65
2.9.2.3. Desviaciones químicas	65
2.9.2.3.1. Influencia del equilibrio	66
2.9.2.3.2. Influencia del disolvente	66
2.9.2.3.3. Influencia de la temperatura.....	66

2.9.2.3.4. Presencia de impurezas en los reactivos	66
2.9.2.3.5. Interacciones entre especies absorbentes	67
2.9.2.4. Desviaciones personales.....	67
2.9.3. Instrumentación	67
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
3.1. PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	70
3.1.1. Linealidad	70
3.1.2. Exactitud y Selectividad	75
3.1.3. Precisión	78
3.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	82
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	88
4.1. CONCLUSIONES	88
4.2. RECOMENDACIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	100
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Cantidad de glucosamina presente en diferentes formulaciones	24
Tabla 1.2. Algunos métodos analíticos para determinar glucosamina	34
Tabla 1.3. Reactivos empleados en la derivatización de glucosamina	43
Tabla 2.1. Descripción de las muestras	45
Tabla 2.2. Preparación de la curva de calibración	53
Tabla 2.3. Criterios aceptados de desviación estándar relativa	58
Tabla 3.1. Valores de absorbancia de ensayos en blanco para la solución patrón y soluciones de trabajo	72
Tabla 3.2. Valores de absorbancia de la solución patrón y soluciones de trabajo.....	72
Tabla 3.3. Valores de absorbancia reales de la solución patrón y soluciones de trabajo	73
Tabla 3.4. Prueba de linealidad	74
Tabla 3.5. Características de desempeño para la linealidad	75
Tabla 3.6. Evaluación de la exactitud del método objeto de estudio.....	77
Tabla 3.7. Resultados de repetibilidad.....	79
Tabla 3.8. Resultados de precisión intermedia	80
Tabla 3.9. Pruebas t y F para los análisis intra e interdía	81
Tabla 3.10. Valores de absorbancia de muestras analizadas	83
Tabla 3.11. Valores de absorbancia de ensayos en blanco para muestras.....	83
Tabla 3.12. Análisis del contenido real de glucosamina en suplementos dietéticos que contienen sulfato/clorhidrato de glucosamina	85
Tabla A.1. Parte de valores críticos de la prueba t	106
Tabla A.2. Parte de valores críticos de la prueba F (p=0.05)	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura química de la glucosamina.....	6
Figura 1.2. Representación esquemática de la estructura bioquímica de una articulación ..	10
Figura 1.3. Estructura química del sulfato de glucosamina.....	20
Figura 1.4. Estructura química de la glucosamina-6-sulfato	20
Figura 1.5. Estructura química del sulfato de glucosamina cocrystalizado con cloruro de sodio	21
Figura 1.6. Estructura química del clorhidrato de glucosamina	23
Figura 1.7. Estructura química de la N-acetil-glucosamina	25
Figura 1.8. Esquema de la preparación industrial de clorhidrato de glucosamina	26
Figura 1.9. Reacción de derivatización de glucosamina con ninhidrina	36
Figura 1.10. Reacción de derivatización de glucosamina con OPA.....	38
Figura 1.11. Reacción de derivatización de glucosamina con PITC	39
Figura 1.12. Reacción de derivatización de glucosamina con FMOC-Cl	40
Figura 1.13. Reacción de derivatización de glucosamina con AQC	42
Figura 1.14. Hidrólisis del exceso de AQC	42
Figura 2.1. Absorción de radiación	61
Figura 2.2. Esquema de un espectrofotómetro UV-VIS de haz sencillo.....	68
Figura 3.1. Curva de calibración para la determinación de glucosamina en suplementos dietéticos por espectrofotometría ultravioleta (UV).....	73
Figura 3.2. Porcentaje de glucosamina determinado en quince suplementos dietéticos que contienen sulfato/clorhidrato de glucosamina	86

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. CÁLCULOS	100
1.1. PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	100
1.1.1. Preparación de la solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml) .	100
1.1.2. Corrección de la concentración de glucosamina en solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml)	101
1.1.3. Determinación de la concentración del derivado en solución patrón	101
1.1.4. Preparación de las soluciones de trabajo	102
1.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	103
1.3. PRUEBA T DE STUDENT.....	104
1.4. PRUEBA F DE SNEDECOR-FISHER.....	106
ANEXO 2. CERTIFICADO DE ANÁLISIS PARA ESTÁNDAR DE SULFATO DE D- GLUCOSAMINA.....	108
ANEXO 3. CERTIFICADO DE ANÁLISIS PARA FENILISOTIOCIANATO	109
ANEXO 4. INFORME TÉCNICO DE MANTENIMIENTO Y CALIBRACIÓN DE BALANZA METTLER TOLEDO AB204	111
ANEXO 5. ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS CECIL 1021.....	114

RESUMEN

El objetivo de esta disertación fue analizar la cantidad real de glucosamina contenida en varios suplementos dietéticos. Se validó y desarrolló un método espectrofotométrico con el fin de establecer si existe una diferencia significativa entre la cantidad de glucosamina determinada y la etiquetada. Un total de quince suplementos que contienen glucosamina, en distintas formulaciones y presentaciones, fueron evaluados por espectrofotometría UV. En este método, se hizo reaccionar la glucosamina con fenilisotiocianato para formar un derivado de la feniltiourea, que presenta una absorbancia máxima a 240 nm.

En el proceso de validación se estimaron los valores de los parámetros que determinan el rendimiento del método, como son: linealidad, exactitud, selectividad y precisión. Se demostró que el método validado cumple con los niveles de aceptación establecidos y aseguran que el método es adecuado para ser aplicado.

En la mayoría de suplementos, la cantidad de glucosamina encontrada fue significativamente diferente a la expuesta en la etiqueta, con desviaciones desde 58.7 hasta 106%. Esta investigación evidencia los problemas de control de calidad que presentan estos productos, ya que la clasificación de la glucosamina como un suplemento nutricional en lugar de un medicamento, implica que los fabricantes no están obligados a cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura como se sigue para las industrias farmacéuticas.

Palabras clave: análisis, glucosamina, suplementos dietéticos, espectrofotometría ultravioleta, fenilisotiocianato.

ABSTRACT

The purpose of this work was to analyze the actual contents of glucosamine in several dietary supplements. A spectrophotometric method was validated and developed to determine if the amount of glucosamine found significantly deviate from label claim. A total of fifteen supplements containing glucosamine in different salt forms and chemical presentations were tested by UV spectrophotometry. In this method, glucosamine was reacted with phenylisothiocyanate to yield phenylthiourea derivate, which exhibits maximum absorbance at 240 nm.

In the process of validation the values of the parameters that determine the efficiency of the method were estimated, such as: linearity, accuracy, specificity and precision. It was shown that the validated method meets the performance levels set and ensures that the method is suitable for application.

The amounts of glucosamine found after analysis were significantly different from the label claim in most dietary supplements, with deviations ranging from 58.7 to over 106%. This report highlights the quality control issues of these products, since the classification of glucosamine as a nutritional supplement instead of a drug, implies that the manufacturers do not need to comply with Good Manufacturing Practice as outlined for pharmaceutical industries.

Key words: glucosamine, analysis, dietary supplements, ultraviolet spectrophotometry, phenylisothiocyanate.

INTRODUCCIÓN

La glucosamina es un amino monosacárido que se deriva del metabolismo de la glucosa celular y se encuentra en casi todos los tejidos humanos, pero en mayor concentración en el hígado, riñón y cartílago. La glucosamina es una sustancia natural que estimula la biosíntesis de macromoléculas, como los proteoglicanos, íntimamente relacionadas con la estructura y mantenimiento del cartílago articular [1,2].

Las investigaciones realizadas durante los últimos veinte años han revelado que la administración oral de glucosamina contribuye favorablemente en el tratamiento de pacientes con osteoartritis. La osteoartritis es una enfermedad asociada con alteraciones en la estructura y función de las articulaciones sinoviales, como resultado de una pérdida del equilibrio entre la síntesis y degradación de compuestos necesarios para proporcionar tejido conjuntivo. Los síntomas clínicos típicos son: dolor, rigidez y limitación del movimiento [3,4].

Según datos estadísticos, la edad es el factor más estrechamente asociado a la artrosis, pero existen serios argumentos en contra de que el envejecimiento, por sí solo, sea su causa. En una investigación radiográfica realizada con personas menores de 45 años, sólo 2% padecían de esta enfermedad, mientras que entre los 45 y 64 años, la prevalencia fue de 30%, y en las mayores de 65 años fue de 68%. Las tasas de afectación son similares en hombres y mujeres cuando se hace un análisis de todas las edades, pero en menores de 45 años es más frecuente en hombres y pasados los 55 años es más común en mujeres [5,6].

Los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos para la osteoartritis se usan con el fin de aliviar el dolor y la inflamación en las articulaciones comprometidas. La glucosamina exógena promueve la formación del cartílago, evita los síntomas de desgaste y puede reparar daños ya sufridos. Sin embargo, la glucosamina no es un analgésico y a largo plazo muestra su superioridad frente a simples analgésicos, ya que éstos no mejoran la capacidad de regeneración ni el funcionamiento de las articulaciones [7,8].

No existen fuentes de glucosamina en la dieta y se dispone de ella como un suplemento alimenticio. Los suplementos que contienen glucosamina son numerosos y populares, para satisfacer su demanda se encuentran disponibles en varias formulaciones y presentaciones. Estos compuestos de glucosamina se derivan generalmente de la quitina, un biopolímero presente en el exoesqueleto de invertebrados marinos, insectos y paredes celulares de ciertos microorganismos [3].

La comunidad científica durante muchos años ha expresado un alto grado de escepticismo hacia los suplementos dietéticos, esto debido a la ausencia de normas estrictas de calidad para su comercialización. El gobierno de los Estados Unidos reglamenta el uso de los suplementos dietéticos por medio de la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés). En la actualidad, lo hace de acuerdo con las normas para alimentos, que por lo general son menos estrictas que para los fármacos de venta con o sin prescripción médica. Consecuentemente, lo que se indica en la etiqueta puede no reflejar la composición real o la pureza del producto contenido [9,10].

Análisis independientes de una variedad de suplementos dietéticos destinados para la salud humana, han arrojado resultados preocupantes, por ejemplo: se ha determinado que no está

presente el ingrediente indicado, cantidades mayores o insuficientes del mismo, o que está contaminado [11,12]. Si bien la eficacia de los suplementos puede estar en duda, es obvio que si no están presentes en la dosis adecuada son inútiles. Es por todo esto, que el objetivo principal de esta investigación es evidenciar la cantidad real de glucosamina contenida en distintos suplementos dietéticos comercializados, y determinar si es significativamente diferente de la reportada en la etiqueta.

Para el desarrollo del presente trabajo, se recopiló toda la información necesaria sobre la glucosamina, la misma que se expone en el Capítulo 1, detallando no sólo los aspectos químicos de este amino monosacárido, sino también sus propiedades nutricionales como suplemento, procesos de obtención, etc. A continuación, en el Capítulo 2, se presenta toda la parte experimental, es decir, los materiales empleados así como el procedimiento analítico aplicado. Luego en el Capítulo 3, se encuentra la discusión y evaluación de los resultados obtenidos. Finalizando con el Capítulo 4, donde se exponen las conclusiones y recomendaciones de este estudio.

Con este trabajo se pretende dilucidar los problemas de control de calidad que exhiben los suplementos dietéticos, específicamente de aquellos que contienen glucosamina.

CAPÍTULO 1

GLUCOSAMINA

La glucosamina es una sustancia natural presente en el cartílago articular de los mamíferos, exoesqueleto de crustáceos y varios artrópodos, paredes celulares de hongos y otros organismos multicelulares. En la Figura 1.1 se indica la estructura química de la glucosamina, también conocida como 2-amino-2-desoxi-D-glucosa, 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa, o quitosamina [13,14].

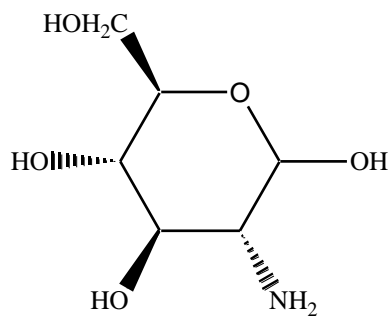


Figura 1.1. Estructura química de la glucosamina

La glucosamina es un amino monosacárido que se produce en el cuerpo humano en forma de glucosamina-6-fosfato, es el elemento de construcción fundamental para la biosíntesis de diversos compuestos necesarios para la formación y reparación del tejido cartilaginoso, estos son: glicolípidos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos [15].

Comercialmente, la glucosamina se sintetiza ya sea por hidrólisis del exoesqueleto de crustáceos o por la fermentación de granos, como el maíz y el trigo. La glucosamina

consumida en forma oral, como suplemento dietético, se emplea de forma bastante común en el tratamiento de artrosis, a pesar de que su aceptación como medicamento terapéutico sea variable [16].

Se vende como un suplemento dietético o nutricional en tres formas: clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina y N-acetil-glucosamina. Conforme a estudios científicos, no parece haber ninguna diferencia entre las tres formas en lo que respecta a su eficacia. Sin embargo, la mayor cantidad de estudios han sido orientados hacia las formas sulfato y clorhidrato, razón por la cual son más comercializados.

Los suplementos dietéticos con glucosamina a menudo contienen ingredientes extras: sulfato de condroitina, metilsulfonilmetano (MSM), cartílago de tiburón, colágeno B, vitamina C, vitamina D, zinc, boro y/o hierbas como extracto de corteza de sauce. Estas sustancias adicionales se considera actúan beneficiosamente en la terapia de la osteoartritis, como resultado de su capacidad de promover la reparación del cartílago y por sus efectos antiinflamatorios más prolongados [17].

El uso de la glucosamina en el tratamiento de la artrosis es considerado seguro entre la comunidad médica; sin embargo, no es completamente aceptada como eficaz para su tratamiento. Consecuentemente, la FDA no ha aprobado el uso de la glucosamina como parte de tratamiento médico en humanos.

La clasificación de la glucosamina como un suplemento nutricional en lugar de un medicamento, implica que los fabricantes no están obligados a cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), por lo que la seguridad y formulación están

determinadas únicamente por ellos. Los estudios han demostrado que hay una variación, tanto en pureza como en contenido de glucosamina, en diferentes fabricantes e incluso en lotes del mismo fabricante. En algunos suplementos, la cantidad de glucosamina presente en el producto ha variado desde cero hasta más de un 100% sobre la cantidad declarada en la etiqueta. En este mismo sentido, algunos productos han contenido clorhidrato de glucosamina en lugar de sulfato de glucosamina, como estaba indicado en la etiqueta [2,17].

1.1. BIOQUÍMICA

La glucosamina fue identificada por primera vez en 1876 por el Dr. George Ledderhose, durante la hidrólisis de quitina con ácido clorhídrico concentrado. Pero su estereoquímica no fue completamente definida hasta 1939 por el trabajo de Walter Norman Haworth [14].

Estructuralmente, la glucosamina es una molécula de glucosa modificada, por reemplazo de un grupo hidroxilo (OH) por un grupo amino (NH_2), en el segundo átomo de carbono (ver Figura 1.1) [18].

La glucosamina se sintetiza naturalmente en el organismo en forma de glucosamina-6-fosfato, por combinación de glutamina con fructosa, a través de la acción enzimática de la glucosamino sintetasa. La síntesis de glucosamina comienza con la reorganización estructural de la glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato para facilitar la interacción con la glutamina. La glucosamino sintetasa cataliza la transferencia de un grupo amino de la glutamina a la fructosa-6-fosfato. La enzima simultáneamente isomeriza este compuesto para formar glucosamina-6-fosfato, la cual es precursora de todas las hexosaminas

presentes en el organismo [19].

La glucosamina y sus derivados se encuentran en casi todos los tejidos humanos, no obstante, están íntimamente relacionados con la estructura y función articular, como se indica en la Figura 1.2 [2].

Los proteoglicanos son proteínas que contienen covalentemente unidas cadenas de polisacáridos denominadas glicosaminoglicanos. El porcentaje de carbohidrato presente en un proteoglicano es alrededor del 95% de su peso. Hay por lo menos siete tipos de glicosaminoglicanos: sulfato de condroitina, ácido hialurónico, sulfato de queratán I, sulfato de queratán II, sulfato de dermatán, heparina, sulfato de heparán, etc.

Un glicosaminoglicano es un polisacárido no ramificado hecho de unidades repetitivas de disacáridos, uno de los componentes es siempre un amino azúcar, tal como N-acetil-glucosamina o N-acetil-galactosamina, el otro componente es un ácido urónico como el ácido glucurónico. A excepción del ácido hialurónico, todos los glicosaminoglicanos contienen grupos sulfato [20].

Directa o indirectamente, la glucosamina juega un papel en la formación de superficies articulares, tendones, ligamentos, líquido sinovial, piel, huesos, uñas, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, mucosa en los sistemas digestivo, respiratorio y urinario [2].

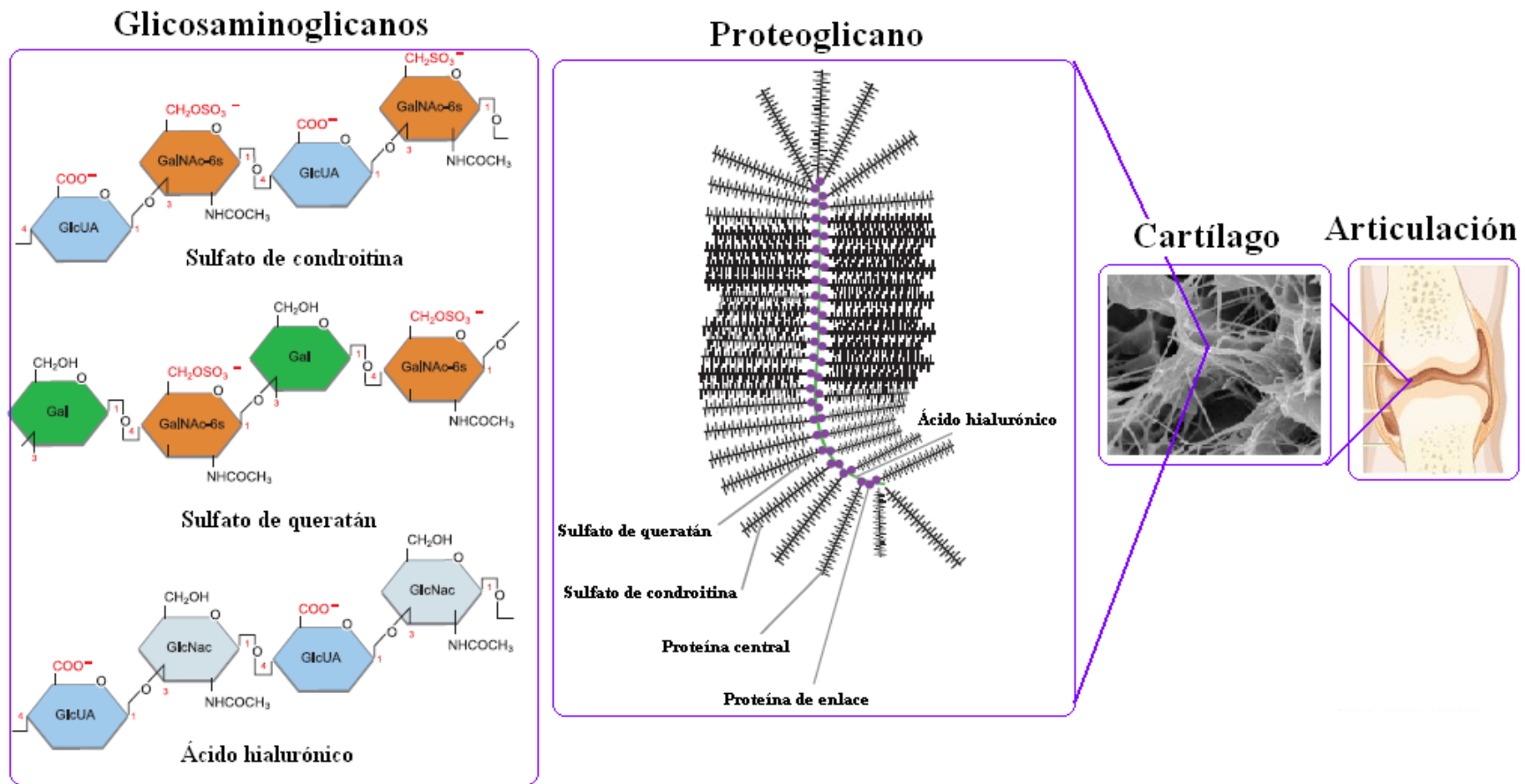


Figura 1.2. Representación esquemática de la estructura bioquímica de una articulación [20,21]

Abreviaturas: GlcUA, ácido glucurónico; GalNAc-6s, N-acetil-galactosamina-6-sulfato; Gal, galactosa; GlcNac, N-acetil-glucosamina.

1.2. LA GLUCOSAMINA COMO SUPLEMENTO DIETÉTICO

La glucosamina es una de las sustancias más estudiadas últimamente, sus grandes cualidades nutricionales para mejorar la calidad de vida del ser humano la han convertido en uno de los suplementos alimenticios más importantes de la última década [15].

1.2.1. Suplemento dietético

Un suplemento dietético es un producto cuyo objeto es complementar la dieta y contiene tanto ingredientes dietéticos como componentes inactivos. El ingrediente dietético es la sustancia que afecta a la estructura o función del organismo. Un componente inactivo, también denominado excipiente, es cualquier componente agregado a propósito a una forma farmacéutica como: agente de recubrimiento, colorante, saborizante, edulcorante, diluyente o aglutinante [22].

En la Ley de Salud y Educación sobre Suplementos Dietéticos (DSHEA, por sus siglas en inglés), aprobada por el Congreso de los Estados Unidos en 1994, se definió que un suplemento dietético es un producto que:

- ❖ Está destinado a complementar la alimentación.
- ❖ Contiene uno o más ingredientes dietéticos, entre ellos: vitaminas, minerales, hierbas o plantas medicinales, aminoácidos, entre otros.
- ❖ Está destinado a ser ingerido por la boca en forma de: tabletas, cápsulas, geles blandos, líquidos o polvos.
- ❖ Posee una etiqueta que lo identifica como suplemento dietético.

El gobierno de los Estados Unidos reglamenta el uso de los suplementos dietéticos por medio de la FDA. En la actualidad, lo hace de acuerdo con las normas para alimentos y no para medicamentos. Las reglamentaciones federales para los suplementos dietéticos son distintas y menos estrictas de las que se aplican a los fármacos de venta con o sin orden médica [12]. Por lo tanto:

- ❖ Un fabricante no está obligado a demostrar la inocuidad ni la eficacia de un suplemento dietético antes de lanzarlo al mercado.
- ❖ Se prevé que los fabricantes adopten ciertas BPM para asegurar que los suplementos dietéticos se procesen siempre de la misma manera y cumplan con las normas de calidad pertinentes.
- ❖ Una vez que un suplemento dietético sale al mercado, la FDA se encarga de vigilar su inocuidad.

Es posible que la etiqueta no informe sobre el contenido real del frasco. Algunas veces los análisis de los suplementos dietéticos encuentran diferencias entre los ingredientes mencionados en la etiqueta y los que realmente están dentro del suplemento. Por ejemplo, es posible que un suplemento no presente el ingrediente correcto, contenga cantidades mayores o insuficientes del mismo, o esté contaminado [12].

1.2.2. Propiedades de la glucosamina

En la mayoría de individuos jóvenes y saludables, la glucosamina como sustancia matriz está adecuadamente disponible para la formación de proteoglicanos, esto porque el cuerpo sintetiza cantidades normales de glucosamina. Sin embargo, en personas de mayor edad o

después de experimentar un trauma o proceso degenerativo, los niveles de glucosamina en el organismo no son los adecuados, por lo que este nutriente se vuelve indispensable y necesario ingerirlo a través de fuentes externas. No existen fuentes de glucosamina en la dieta, pero se dispone de ella como un suplemento nutricional bajo la forma de clorhidrato, sulfato o N-acetil-glucosamina [23].

La razón más importante para el uso de glucosamina como suplemento es que se deposita en el espacio articular y se incorpora a los proteoglicanos del cartílago para mantener la estructura y reparar daños. La glucosamina estimula los condrocitos (células del cartílago) para producir cartílago nuevo y sano [24].

Numerosos estudios europeos y valiosos reportes estadounidenses demuestran un claro beneficio de los suplementos de glucosamina para aliviar el dolor y rigidez articular asociado a la artrosis [24]. Además de la osteoartritis, la glucosamina también se utiliza para aliviar los síntomas de dolor en las piernas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal (como la colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), y trastornos de la articulación temporomandibular. Los resultados científicos muestran algunas pruebas positivas para el uso efectivo de la glucosamina en la osteoartritis, sin embargo, la evidencia no es muy clara para las otras enfermedades [13].

La glucosamina ha sido aceptada en Europa (excepto en Reino Unido) como un Fármaco de Acción Sintomática Lenta para la Osteoartritis (SYSADOA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, su uso en Estados Unidos ha sido controversial ya que es comercializado como suplemento dietético y sin ningún tipo de prescripción médica [25].

1.2.2.1. Evidencia científica

La glucosamina y el sulfato de condroitina han recibido gran atención en el tratamiento de la artrosis. Se venden de manera extensa en farmacias, supermercados y tiendas naturistas, pero su consumo no ha sido aprobado por la FDA. En varios estudios se ha demostrado que la glucosamina es mejor que el placebo y similar a los Antiinflamatorios no Esteroides (AINEs), en cuanto a su eficacia en pacientes con artrosis de rodilla, e inclusive tiene un mayor perfil de seguridad que éstos últimos. Sin embargo, esta información no se ha corroborado en estudios grandes, bien diseñados y comparativos con testigos [6].

En un metaanálisis de varios estudios aleatorios controlados, doble ciego y comparativos de glucosamina y sulfato de condroitina, se encontraron ciertos beneficios de ambos fármacos comparados con el placebo. En los estudios sobre sulfato de condroitina, los pacientes mostraron mejoría sintomática hasta 12 meses después de iniciado el tratamiento. Sin embargo, al examinar únicamente los estudios clínicos de gran calidad o muy grandes, el efecto de la glucosamina y el sulfato de condroitina se redujo, es decir, cuanto mejor es el diseño del estudio, tanto menor es el beneficio terapéutico. En tres estudios aleatorios, doble ciego y en los que el fabricante no tuvo acceso a los datos ni participó en el análisis de resultados, la glucosamina no resultó ser más eficaz que el placebo [6,23].

Los resultados de dos estudios clínicos aleatorios recientes, indican que la glucosamina no sólo mejora el dolor articular en los pacientes con artrosis de rodilla sino que también protege contra el daño del cartílago articular, esto en base a los análisis de cambios que se suscitan en el espacio articular. No obstante, han surgido inquietudes sobre la

interpretación de los resultados de estos estudios, por la limitación de los métodos radiográficos utilizados [23].

En el ensayo clínico multicéntrico, doble ciego y aleatorio: Estudio de la Intervención de Glucosamina/Condroitina en la Artritis (GAIT, por sus siglas en inglés), patrocinado por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés), se evaluó la eficacia y seguridad de la glucosamina, el sulfato de condroitina, la combinación de ambos y el celecobix frente a placebo en pacientes con artritis de rodilla. El parámetro principal de valoración fue la disminución del dolor articular después de seis meses de tratamiento [6].

Desde un punto de vista global, el único fármaco que demostró una efectividad superior al placebo fue el celecobix. Sin embargo, cuando se dividió a los pacientes según el grado de dolor, la combinación glucosamina más sulfato de condroitina, fue el único tratamiento que obtuvo una respuesta positiva (79.2%) en cuanto al alivio del dolor en pacientes que presentaban un nivel de dolor elevado. Sorprende de este estudio la falta de eficacia de la glucosamina y sulfato de condroitina en pacientes que experimentan poco dolor, pero sorprende aún más la falta de respuesta de celecobix en pacientes que experimentan dolor de rodilla moderado o severo.

Diversas razones podrían explicar estos resultados. En primer lugar, hubo un enorme efecto placebo (60.1%), explicable en parte por el elevado número de comprimidos que los pacientes tomaban (n=7), por el efecto “suelo”, es decir, la incapacidad de un paciente con poco dolor para detectar la respuesta al tratamiento, y por la enorme expectación que el estudio levantó entre la población norteamericana. La investigación aportó datos de

enorme interés, como el hecho de que se produjo una disminución significativa de la hinchazón en el grupo de pacientes tratados con sulfato de condroitina comparado con el grupo placebo [26].

1.3. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE GLUCOSAMINA

La glucosamina se prepara comercialmente por hidrólisis ácida de la quitina [poli- β -(1,4)-N-acetil-glucosamina], que es la sustancia más abundante presente en los exoesqueletos de crustáceos, como cangrejos y camarones. Al igual que la celulosa, la quitina es el biopolímero natural más abundante en la tierra. En el exoesqueleto de los crustáceos, la quitina está combinada con proteínas y carbonato de calcio. La purificación de la quitina y su hidrólisis posterior produce glucosamina [25].

1.3.1. Proceso biológico

La glucosamina también puede ser preparada exitosamente a partir de mariscos usando procesos enzimáticos. Por ejemplo, la Ingeniería de Biopolímeros ha establecido un mecanismo para elaborar glucosamina a través de una hidrólisis enzimática de quitina extraída de langostas y langostinos. La glucosamina también puede ser preparada a partir de quitina obtenida de la fermentación de biomasa. En los años setenta, una compañía japonesa patentó un proceso basado en la hidrólisis ácida de cultivo desproteínizado de *Azobacter*, un género de bacterias usualmente móviles que forman quistes de pared gruesa y pueden producir grandes cantidades de baba capsular [27].

En este mismo sentido, una compañía estadounidense patentó un proceso en el que la glucosamina es producida por hidrólisis de quitina aislada de biomasa fúngica

(*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., y una combinación de estas). La patente manifiesta que la hidrólisis con ácido clorhídrico produce glucosamina con un 97% de pureza y un rendimiento del 15% en 8 horas. Este dato es sorprendente ya que investigaciones previas indican, que se necesita por lo menos el doble de ácido clorhídrico del utilizado en este estudio para hidrolizar completamente oligómeros de quitina. Sin embargo, el grado de hidrólisis depende del tipo de quitina, el grado de desacetilación, el tamaño molecular y el tipo de cristalinidad [27].

Las propiedades fisicoquímicas de la quitina fúngica son usualmente diferentes de la obtenida a partir de mariscos y, por lo tanto, la hidrólisis puede requerir condiciones no tan severas. En la actualidad se prepara glucosamina de *Aspergillus niger*, un hongo consumido en Japón como alimento. Los checos patentaron la producción de glucosamina por hidrólisis de polisacáridos obtenidos del micelio húmedo de *Aspergillus niger*, utilizado en la producción de ácido cítrico [27].

Otras compañías han aplicado patentes relacionadas con métodos y materiales para producir glucosamina a partir de la fermentación de microorganismos genéticamente modificados. De igual manera, se ha reportado un proceso para elaborar glucosamina a través de fuentes de glucosa como, almidón, glucógeno y fructosa, y fuentes de aminos [27].

1.3.2. Proceso químico

El ácido clorhídrico es el químico estándar utilizado para hidrolizar quitina en glucosamina, aunque ha habido ensayos para llevar a cabo la hidrólisis con otros ácidos como: ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico y ácido nítrico.

Una solución acuosa de ácido fluorhídrico generalmente conduce a la hidrólisis parcial de la quitina después de varias horas y una temperatura de 20°C. En un período de 24 horas, el espectro ¹³C-NMR muestra la presencia del ion glucofuranosil oxazolin, que es un precursor de la N-acetil-glucosamina. Recientemente, un grupo de japoneses intentó patentar un método para producir glucosamina y oligómeros usando ácido fluorhídrico concentrado. Sin embargo, éste ácido es costoso y altamente corrosivo que no puede ser usado con recipientes de vidrio o acero inoxidable, por lo que el uso comercial de ácido fluorhídrico no es viable [27].

Un grupo de científicos chinos patentaron un proceso para elaborar glucosamina por hidrólisis de quitina con ácido sulfúrico al 20-80%. La hidrólisis de la quitina con ácido sulfúrico es de interés industrial ya que no necesita reactores revestidos de vidrio, condición indispensable en la producción de glucosamina con ácido clorhídrico. También es posible producir directamente sulfato de glucosamina, en lugar de una reacción posterior o mezcla con sulfato de potasio [27].

En los inicios del siglo veinte, químicos alemanes se mostraron interesados en la producción y química de la glucosamina. Hudson y Dale desarrollaron un proceso para obtener glucosamina del exoesqueleto de cangrejo y langosta, empleando ácido clorhídrico pero sin incluir un proceso de desproteinización. Komori preparó glucosamina a partir de larvas de insectos usando, en primer lugar, hidróxido de potasio para desproteinizar y, posteriormente, ácido clorhídrico para hidrolizar la quitina. Alphen aisló glucosamina de caparazones de langostas, después de un simple proceso de desmineralización con ácido clorhídrico. Stacey y Webber describieron un simple proceso de producción de glucosamina a partir de exoesqueletos de cangrejos con bajo contenido proteico, seguido

de un proceso de desmineralización con ácido clorhídrico 2M, y un tratamiento de la materia seca con ácido clorhídrico concentrado. Tanto la desmineralización como la desproteínización fueron también incluidos en el proceso para aislar glucosamina de exoesqueletos de crustáceos [25].

Los fabricantes chinos son bien conocidos por sus investigaciones en la producción de glucosamina y son, actualmente, los mayores proveedores de glucosamina en el mundo. Desafortunadamente, sus estudios han sido divulgados, en su mayoría, en publicaciones chinas, haciendo muy difícil su acceso a investigadores y productores occidentales. Un estudio chino describe la preparación de sulfato de glucosamina a partir de clorhidrato de glucosamina utilizando cromatografía líquida de intercambio aniónico [27].

La glucosamina al ser una base orgánica débil puede transformarse en sus distintas formas: 1) sulfato de glucosamina, 2) cocristales o coprecipitados de sulfato de glucosamina con cloruro de potasio o sodio, 3) clorhidrato de glucosamina, y 4) mezclas físicas de clorhidrato de glucosamina y sulfato de potasio o sodio [25,27].

1.3.2.1. Sulfato de glucosamina

El sulfato de glucosamina puro es altamente higroscópico. Debido a la hidratación y consecuente disminución de pH, el grupo amino es potencialmente oxidable. Debido a estas propiedades, la formulación debe ser preservada dentro de un desecante y bajo condiciones extremadamente controladas. Así, la elaboración comercial de sulfato de glucosamina puro y el desarrollo de un ensayo clínico de esta formulación no es viable. En la Figura 1.3 se muestra la estructura química del sulfato de glucosamina [25].

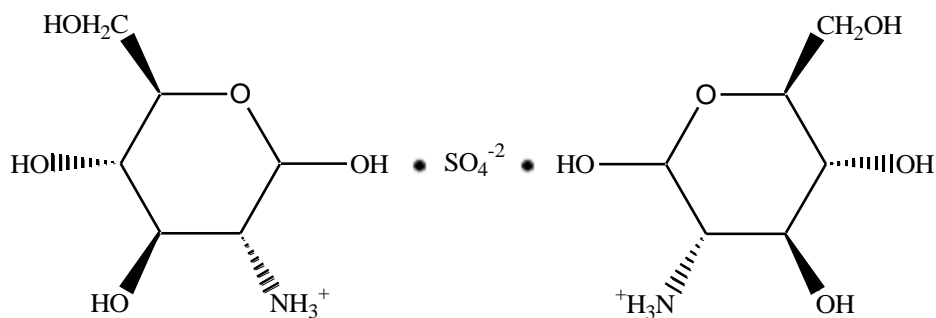


Figura 1.3. Estructura química del sulfato de glucosamina [25]

1.3.2.2. Sulfato de glucosamina (forma covalente)

Existen otras sustancias disponibles que son denominadas “sulfato de glucosamina”. Sin embargo, estos compuestos no son la sal sulfatada de glucosamina en su forma estricta; más bien, son compuestos de glucosamina con grupos sulfato unidos covalentemente a la hexosamina en diferentes sitios. Algunos son: glucosamina-2,3-disulfato; glucosamina-2,6-disulfato; glucosamina-3,6-disulfato; y glucosamina-6-sulfato. Sus estructuras se encuentran autorizadas por la Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés). Estas moléculas no son parte del llamado “sulfato de glucosamina estabilizado” ni tampoco están disponibles en dosis orales [25]. Un ejemplo de este tipo particular de sal sulfata de glucosamina se ilustra en la Figura 1.4.

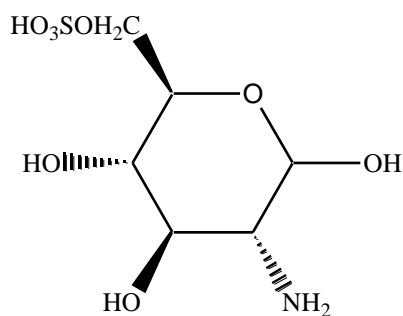


Figura 1.4. Estructura química de la glucosamina-6-sulfato [25]

1.3.2.3. Cocristales y coprecipitados de glucosamina

Por cuanto el clorhidrato de glucosamina estaba disponible más no patentado, se realizaron esfuerzos para usar el sulfato de glucosamina con fines comerciales. Sin embargo, debido a los inconvenientes descritos anteriormente, el desarrollo comercial para la distribución masiva de este producto no se pudo realizar. Para superar estos inconvenientes, se desarrolló y patentó un proceso para producir sulfato de glucosamina cocrystalizado con cloruro de sodio. En la Figura 1.5 se presenta la estructura química de esta forma “estabilizada” de glucosamina.

Este método “estabiliza” el sulfato de glucosamina, ya que la adición del cloruro de sodio disminuye las propiedades higroscópicas del compuesto y permite producir formulas de dosis orales. El producto desde entonces ha sido utilizado en ensayos clínicos como parte de tratamiento de la osteoartritis [25].

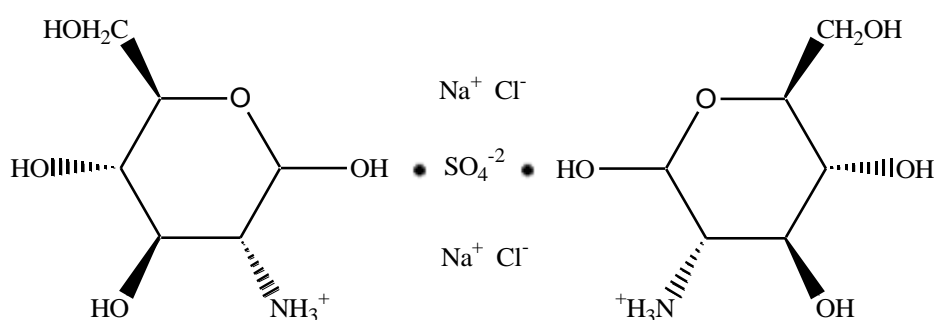


Figura 1.5. Estructura química del sulfato de glucosamina cocrystalizado con cloruro de sodio [25]

Consecuente a la producción de “sulfato de glucosamina estabilizado”, se difundió que esta formulación es terapéuticamente mejor que otras, aunque ningún estudio clínico lo avaló. En este sentido, es importante considerar que el ácido del estómago es ácido clorhídrico;

por lo tanto, toda la glucosamina ingerida, independientemente de su formulación, se absorbe en el intestino delgado como clorhidrato de glucosamina. Es también interesante notar que todos los estudios farmacocinéticos de glucosamina en humanos, han sido llevados a cabo utilizando clorhidrato y sulfato de glucosamina marcada con ^{14}C [25].

Otro método de estabilización de glucosamina fue también patentado. Similar al proceso descrito anteriormente, esta técnica utiliza liofilización para coprecipitar sulfato de glucosamina con cloruro de potasio. Este método también ha sido autorizado y está comercialmente disponible en el mercado.

En estas dos formulaciones, el sulfato de glucosamina es el sustrato que es cocrystalizado o coprecipitado para producir “sulfato de glucosamina estabilizado” [25].

1.3.2.4. Clorhidrato de glucosamina

El clorhidrato de glucosamina es mucho más estable que el sulfato de glucosamina, y se obtiene por hidrólisis de la quitina con ácido clorhídrico. Está disponible en una forma altamente pura (>99%), estable y con una larga vida útil. Este material puede ser certificado por la FDA conforme con las actuales BPM, y elaborado bajo estrictos estándares farmacológicos. La Figura 1.6 indica la estructura química de esta sal de glucosamina [25].

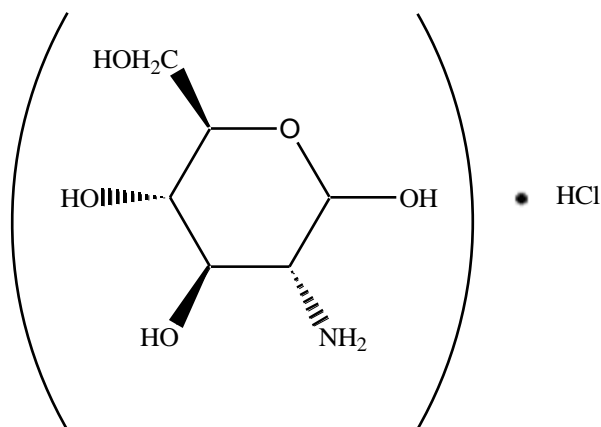


Figura 1.6. Estructura química del clorhidrato de glucosamina [25]

1.3.2.5. Mezclas físicas

Algunos productos comercializados como “sulfato de glucosamina” son simples combinaciones físicas de clorhidrato de glucosamina y una sal sulfatada, como el sulfato de potasio. Las razones para usar esta combinación es la posibilidad que tanto la glucosamina como el sulfato de potasio lleguen a ser terapéuticos, o que ésta última sal promueva la absorción de la glucosamina en el intestino [25].

No obstante, es importante considerar que cuando el sulfato se disocia de la glucosamina en el tracto gastrointestinal, se generan aniones altamente cargados que no cruzan fácilmente las membranas del intestino y que potencialmente causan diarrea. Niveles normales de sulfato en la sangre (0.3mM) son críticos para muchas funciones celulares, incluyendo la síntesis de glicosaminoglicanos. Sin embargo, la farmacocinética de compuestos sulfatados y su potencial efecto en el metabolismo del cartílago son inciertos, aunque algunos han sugerido un papel esencial de los sulfatos en la artrosis [25].

Un estudio indica que los pacientes con artritis evidencian una deficiencia de azufre, y la restauración de los niveles del mismo pueden mejorar sustancialmente las condiciones de pacientes con esta enfermedad. En un trabajo reciente se sugiere que el sulfato puede mediar el efecto terapéutico de la glucosamina. De este modo, en ciertos casos la administración de sulfato puede ser útil, pero no existen pruebas científicas para escoger el sulfato de glucosamina en lugar del clorhidrato de glucosamina. Algunas formulaciones contienen clorhidrato de glucosamina y azufre en forma de metilsulfonilmetano (MSM). El MSM no sólo proporciona azufre sino también parece tener propiedades antiinflamatorias [27].

1.3.2.6. Comparación de las distintas sales de glucosamina

Como se analizó anteriormente, existen consideraciones terapéuticas inherentes en cada formulación de glucosamina. En la Tabla 1.1, sin embargo, se puede observar como la cantidad real de glucosamina en las formulaciones varía de acuerdo al tamaño de la sal formada. Así, en la recurrente dosis diaria de 1500 mg de formulación, la cantidad real de glucosamina puede estar entre 892 y 1246 mg/día [25].

Tabla 1.1. Cantidad de glucosamina presente en diferentes formulaciones [25]

Atributos comparativos	HCl glucosamina	SO ₄ ⁻² NaCl glucosamina	SO ₄ ⁻² KCl glucosamina
Pureza (%)	>99	79.5 (20.5% NaCl)	75 (25% KCl)
Porcentaje en peso de glucosamina	83.1	62.7	59.5
Dosis (mg/día) para obtener 1500 mg de glucosamina	1805	2392	2521
Contenido de glucosamina (mg) en 1500 mg de formulación	1246.5	940.5	892.5

Nota: No se incluye la comparación con mezclas físicas de clorhidrato de glucosamina y sulfato de potasio porque pueden ser preparadas en varias concentraciones.

Frecuentemente se preparan sales de las sustancias puras para mejorar las características de solubilidad. Las sales de clorhidrato son algunas de las formas más comunes de bases orgánicas débiles, esto porque el cloruro es fácilmente disponible, se encuentra naturalmente en el cuerpo humano y produce sales bastante estables. Una ventaja adicional es que estas sales son más pequeñas que aquellas conformadas por iones como, los citratos, lactatos y sulfatos; por ejemplo, el peso molecular del HCl es 36, mientras que la del H₂SO₄ es 98. Esto es importante cuando una dosis se refiere a la cantidad del principio activo o a la cantidad de formulación [25].

Adicional a la controversia entre el sulfato y clorhidrato de glucosamina, algunos también consideran que la N-acetil-glucosamina es tan efectiva como las otras sales de glucosamina. Esto parece ser falso ya que estudios indican que esta forma de glucosamina no tiene transporte intestinal activo, pese a que es digerida por bacterias intestinales y excretada por las heces como complejo lectina-N-glucosamina [27,28]. En la Figura 1.7 se muestra la estructura química de la N-acetil-glucosamina.

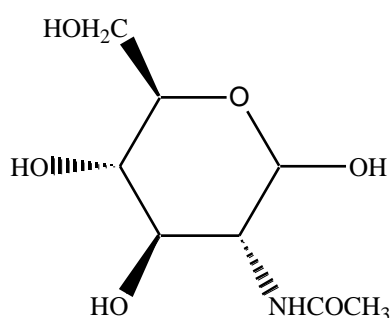


Figura 1.7. Estructura química de la N-acetil-glucosamina

El control terapéutico de pacientes que reciben una forma de sal de un fármaco, se realiza mediante la concentración sanguínea del fármaco original, más no de la sal. En el caso de la glucosamina, la sal se disocia cuando se disuelve en el tracto gastrointestinal; por lo

tanto, para realizar la farmacocinética del clorhidrato o sulfato de glucosamina sólo se analiza la fracción de glucosamina. No se han publicado evidencias ni se ha observado ninguna diferencia en el grado de disolución y absorción de cualquier formulación de glucosamina [25].

1.3.3. Proceso industrial

Actualmente, el proceso industrial más común para obtener glucosamina es a partir de los exoesqueletos de crustáceos. El mecanismo se resume en la Figura 1.8.

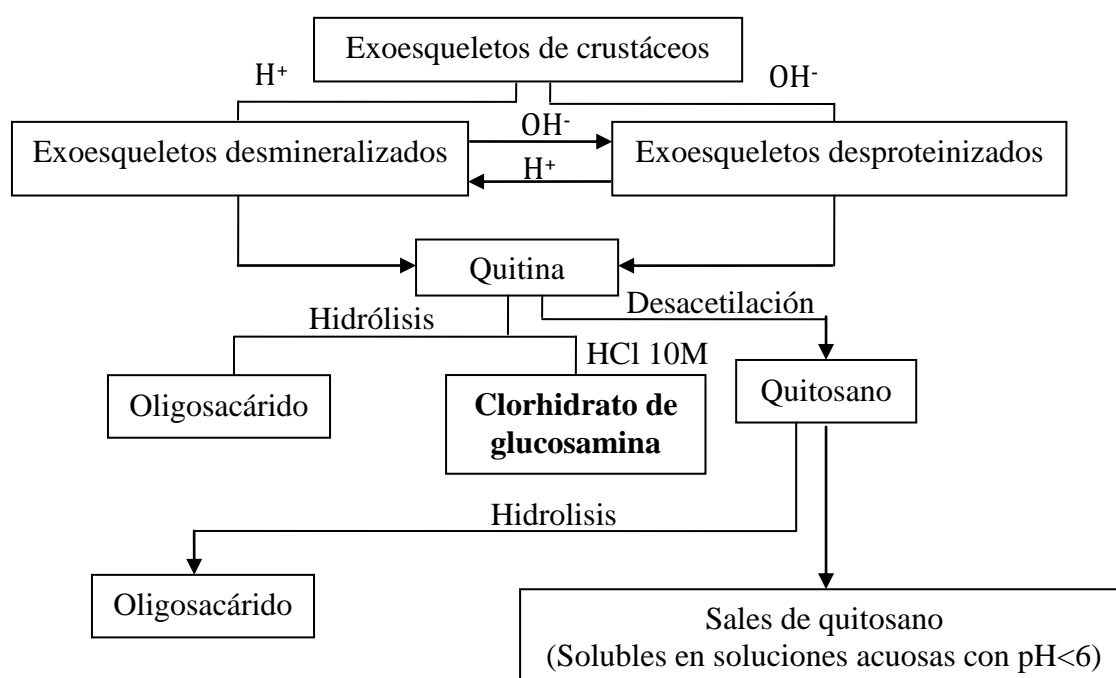


Figura 1.8. Esquema de la preparación industrial de clorhidrato de glucosamina [18]

En una variación del proceso, conocido como variante HCl-NaOH-HCl o variante ácido-base-ácido, los exoesqueletos son molidos hasta un tamaño de partícula entre 0.5 y 5 mm y desmineralizados usando ácido clorhídrico diluido. Usualmente, se usa ácido clorhídrico 2M, pero contrario a la preparación de quitosano, se puede utilizar un ácido de

concentración mayor a 3M. El material desmineralizado se separa del líquido por filtración y luego se desproteiniza usando hidróxido de sodio diluido y caliente, usualmente 1.5M a 90°C. La quitina después es filtrada e hidrolizada, habitualmente con ácido clorhídrico 10M [18].

La otra variante de este proceso involucra la secuencia base-ácido-ácido (NaOH-HCl-HCl), es decir, un cambio base-ácido con respecto a la primera variante. La desproteinización es más efectiva sobre el material desmineralizado, no obstante, la opción depende mucho del tipo de caparazón usado y particularmente del contenido de calcio [18].

No es admisible usar concentraciones bajas de ácido clorhídrico para hidrolizar la quitina, ya que el grado de hidrólisis es menor cuando se usa concentraciones de ácido menores a 9M. Se ha demostrado que al utilizar ácido clorhídrico con concentraciones entre 4 y 10M, se produce una hidrólisis incompleta y oligómeros de quitosano, que son fácilmente identificados por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés).

La hidrólisis incompleta también puede ser resultado de reacciones insuficientes en el tiempo, incluso cuando se utiliza ácido clorhídrico 10M. Debido a que este método de hidrólisis involucra procesos de desproteinización, la glucosamina obtenida es relativamente limpia y puede ser fácilmente cristalizada en agua o ácido clorhídrico diluido.

La remoción efectiva de ácido clorhídrico durante el secado es importante, y puede dificultarse debido a la temperatura de ebullición de la mezcla ácido y agua

(109°C/760 Torr para ácido clorhídrico 6M). Un número de fabricantes recristaliza glucosamina en etanol, en lugar de ácido o agua. El clorhidrato de glucosamina es escasamente soluble en etanol, por lo tanto, el ácido puede ser completamente removido por recristalización y lavado con dicho alcohol [18].

Criterios importantes pueden ser rescatados al analizar la glucosamina en solución y como producto final seco. Este amino monosacárido tiene una fuerte capacidad buffer (amortiguadora), por lo que no son sencillos los análisis del contenido de clorhidrato de glucosamina. Una determinación exacta de ácido libre en solución acuosa de glucosamina se lleva a cabo, ya sea por medio de una titulación ácido-base o analizando el contenido de ácido en el residuo después de un secado exhaustivo.

Es también importante controlar la presencia de oligómeros para establecer si la hidrólisis ha sido completa. El análisis de oligómeros puede ser determinada usando un analizador de aminoácidos, o por HPLC usando una columna de intercambio catiónico y posterior derivatización con ninhidrina. También se puede emplear HPLC, derivatización precolumna con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccimidil carbamato (AQC) y detector ultravioleta (UV), o un detector infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) [18].

1.4. DOSIFICACIÓN

Según la Fundación de Artritis y Reumatismo, la glucosamina es un suplemento nutricional y como tal no está sujeto a las mismas reglamentaciones estrictas requeridas para los fármacos prescritos. El principal uso de la glucosamina es en el tratamiento de la osteoartritis; por lo tanto, es importante recordar que este suplemento aún no se ha

estudiado como tratamiento de otras formas de artritis o enfermedades asociadas, tales como la artritis reumatoide o la gota, o como tratamiento de otras causas de dolor, tales como las fracturas por esfuerzo [29].

Las siguientes dosis están basadas en investigaciones científicas, publicaciones, uso tradicional u opinión experta; sin embargo, se recomienda leer las etiquetas del producto y analizar la dosis con un médico calificado antes de iniciar una terapia. Clínicamente, la glucosamina se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, intraarticular y oral (las tres primeras técnicas se practican en Europa, menos en Reino Unido) [2,30].

1.4.1. Adultos (18 años y mayores)

En la mayoría de los estudios disponibles se han usado 500 mg de sulfato de glucosamina, administrados por vía oral, en tabletas o cápsulas, tres veces al día, por un periodo de 6 a 8 semanas. También se han usado 1500 mg de sulfato de glucosamina, administrados por vía oral, en tabletas o cápsulas, una vez al día, por el mismo tiempo.

Las investigaciones han usado 1500 mg diarios de sulfato de glucosamina en polvo cristalino, o 500 mg de clorhidrato de glucosamina tres veces al día. En algunas publicaciones se han recomendado dosis de 20 mg diarios por kilogramo de peso corporal, incluso se ha usado dosis de 2000 mg diarios por 12 semanas [30].

1.4.2. Niños (menores de 18 años)

No existe suficiente evidencia científica para recomendar el uso de glucosamina en los

niños. Las investigaciones han mostrado que puede haber una relación entre la ingestión de metilsulfonilmetano (MSM) y autismo; no está claro si es beneficiosa o perjudicial [30].

1.5. MECANISMO DE ACCIÓN

La glucosamina es un amino azúcar que es producido en condiciones naturales en el organismo. Es el sustrato fundamental empleado en la síntesis de macromoléculas importantes del cartílago articular, que lo que hacen es ayudar en la reconstrucción del tejido conectivo y la lubricación de la articulación.

La glucosamina es importante en el metabolismo de las glicoproteínas, incluyendo las presentes en el cartílago, lugar donde juega un papel importante en la formación de agregados de cadenas de glicosaminoglicanos. Estos agregados le confieren al cartílago hidrofiliidad y elasticidad, es decir, una resistencia deformadora necesaria para su función [23].

El aporte exógeno de glucosamina además de estimular la biosíntesis de proteoglicanos, mejora la fijación de azufre en la síntesis del sulfato de condroitina y la disposición normal de calcio en el tejido óseo. Asimismo, posee una actividad antiinflamatoria independiente de la ciclooxigenasa, de ahí la buena tolerancia gastrointestinal de la glucosamina.

Está demostrado que la glucosamina inhibe la acción de algunas enzimas destructoras del cartílago (colagenasa, agrecanasa y fosfolipasa A2), y la formación de otras sustancias que dañan los tejidos, como los radicales superóxido de los macrófagos. Los efectos sobre la síntesis de óxido nítrico, favorecedor de la degradación del cartílago, no están totalmente

claros; algunos estudios han encontrado que disminuye la síntesis de óxido nítrico mientras que otros no han encontrado efecto alguno [15].

Todo lo expuesto explica su actividad beneficiosa en el tratamiento de la osteoartritis, así como para detener su avance.

1.6. FARMACOCINÉTICA

El metabolismo de la glucosamina en los seres humanos ha sido estudiado luego de su infusión intravenosa, inyección intramuscular o ingesta oral, a través de la detección de la actividad con diferentes técnicas que utilizaron como marcador al ^{14}C . Luego de la administración intravenosa, se detectó glucosamina plasmática libre con una vida media de 17 minutos. También se observó una captación rápida por parte de las proteínas plasmáticas y se hallaron concentraciones tisulares más altas en hígado, riñón y cartílago. La radioactividad dentro del compartimiento plasmático tuvo un pico entre 8 y 10 horas posteriores a la administración, y decreció con una vida media de 70 horas. La administración intramuscular siguió un patrón farmacocinético similar [31].

Después de la administración oral se observó un 90% de absorción, el 10% restante apareció en la materia fecal. Se incorporó a los tejidos del 8% al 12% luego de la excreción renal y de la pérdida a través del dióxido de carbono exhalado. A pesar de que tiene una semivida plasmática bastante corta, la unión a las proteínas plasmáticas a través de esta vía siguió un patrón similar, donde se mantuvo durante más de 28 horas; sin embargo, la concentración tisular fue cinco veces más baja, probablemente debido al efecto del primer paso hepático.

Aunque en algunos estudios se utilizó el derivado sulfato para determinar la biodisponibilidad y el volumen de distribución, se hallan disponibles otras formas de glucosamina que difieren en aspectos como: pureza, biorreactividad y equivalencia de la dosis [32,33].

1.7. PRECAUCIONES

Como la glucosamina puede ser obtenida en el laboratorio de forma sintética o extraída de los exoesqueletos marinos, los pacientes con historia de alergia a los mariscos deben primero confirmar la procedencia de la glucosamina antes de consumirla [23].

Los estudios clínicos han demostrado consistentemente que es seguro el uso de la glucosamina cuando se administra de forma correcta. Sin embargo, los efectos secundarios pueden incluir: somnolencia, dolor de cabeza, malestar estomacal, insomnio, reacciones en la piel y sensibilidad a la luz. Así como síntomas poco comunes: dolor abdominal, pérdida de apetito, vómitos, náuseas, gases intestinales, acidez estomacal y diarrea.

Las personas con sobrepeso, diabetes o enfermedades del hígado, deben revisar los niveles de azúcar en la sangre con más frecuencia al consumir glucosamina, porque como se mencionó anteriormente es un amino azúcar. Adicionalmente, no existen datos de consumo de glucosamina en embarazo o período de lactancia, por este motivo, la Fundación de Artritis y Reumatismo aconseja no tomar glucosamina a mujeres en estas condiciones [13].

1.8. INTERACCIONES

En su mayor parte, la glucosamina no muestra ninguna contraindicación con otras drogas, es decir, los estudios científicos han demostrado que su uso no produce ningún problema

grave y permanente. La glucosamina tomada por encima de la dosis recomendada puede reducir la efectividad de la insulina u otros medicamentos que controlan los niveles de azúcar en la sangre [13].

Los informes de los NIH sugieren que la glucosamina puede también aumentar el riesgo de sangrado, especialmente al tomar aspirina, anticoagulantes, fármacos antiplaquetarios y medicamentos AINEs. El uso de glucosamina también puede estar relacionado con el aumento en la frecuencia y la severidad del asma.

El uso de alcohol, tranquilizantes, sedantes, medicamentos anticonvulsivos, medicamentos contra la ansiedad, relajantes musculares y antihistamínicos pueden intensificar el efecto secundario de la somnolencia que es posible con la glucosamina. Así, al tomar glucosamina y cualquiera de estos medicamentos juntos, los usuarios deben ser conscientes que puede afectar negativamente a la propia concentración [13].

1.9. ANÁLISIS QUÍMICO

En la Tabla 1.2 se ponen en consideración algunos métodos químicos por los cuales se puede determinar la presencia de glucosamina en suplementos dietéticos. La derivatización química es una herramienta de análisis recurrente para la detección tanto por espectrofotometría ultravioleta como por fluorescencia.

La derivatización es la modificación química de un compuesto para obtener otro con propiedades más adecuadas para el procedimiento analítico utilizado [36]. Se derivatizan compuestos o mezclas de compuestos para:

- ❖ Determinar la presencia de una sustancia que no se puede analizar mediante un método particular.
- ❖ Mejorar la eficacia analítica del compuesto.
- ❖ Potenciar la sensibilidad y selectividad del método analítico.

Tabla 1.2. Algunos métodos analíticos para determinar glucosamina [28,34,35]

Método analítico	Descripción
Volumétrico	Titulación con ácido perclórico.
Espectrofotométrico	UV (240 nm), derivatización con fenilisotiocianato (PITC, por sus siglas en inglés).
Cromatográfico	HPLC, con derivatización precolumna utilizando: a) PITC, con detector UV (240 nm). b) 9-fluorenilmetil clorofornato (FMOC-Cl, por sus siglas en inglés), con detector de fluorescencia (λ excitación = 263 nm, λ emisión = 315 nm). c) N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo) succinimida (FMOC-OSu, por sus siglas en inglés), con detector UV (265 nm).
	HPLC, con detector amperométrico de pulso (PAD, por sus siglas en inglés).
	HPLC, con detector de luz dispersada tras evaporación (ELSD, por sus siglas en inglés).
	HPLC, con detector de espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), modo monitoreo del ion seleccionado (SIM, por sus siglas en inglés) (m/z=180).

Para desarrollar un proceso de derivatización existen varios requerimientos:

- ❖ El reactivo derivatizante debe reaccionar rápida y completamente con el analito bajo condiciones moderadas.
- ❖ No debe haber interferencia del reactivo, ya sea por productos de hidrólisis o reacciones secundarias.
- ❖ Los derivados deben ser estables por varios días, de preferencia a temperatura ambiente, para permitir el análisis automatizado de varias muestras.
- ❖ La reacción debe ser reproducible bajo un tiempo y condiciones de operación.

- ❖ Debe haber una respuesta lineal del derivado a los intervalos de concentración típicos de la mayoría de las aplicaciones.

Se han investigado diferentes reactivos de derivatización, pero ninguno ha podido alcanzar una aceptación universal debido a que no cumple con uno o más de los requerimientos anteriormente mencionados. A continuación se discuten las ventajas y desventajas de los reactivos derivatizantes comúnmente utilizados para el análisis de glucosamina [36].

1.9.1. Ninhidrina

La glucosamina reacciona con la ninhidrina en medio ácido (pH 6) y en caliente, produciendo glucosa, dióxido de carbono y un complejo de color púrpura azulado (púrpura de Ruhemann), con máxima absorción a 570 nm. En la Figura 1.9 se ilustra el mecanismo de esta reacción [37,38].

La reacción coloreada de la glucosamina con la ninhidrina puede ser analizada después de una separación por electroforesis o cromatografía; o directamente por medio de un espectrofotómetro UV-VIS. En la cuantificación puede utilizarse el coeficiente de absorción molar del compuesto coloreado, aunque su valor debe determinarse para las condiciones particulares del análisis [38].

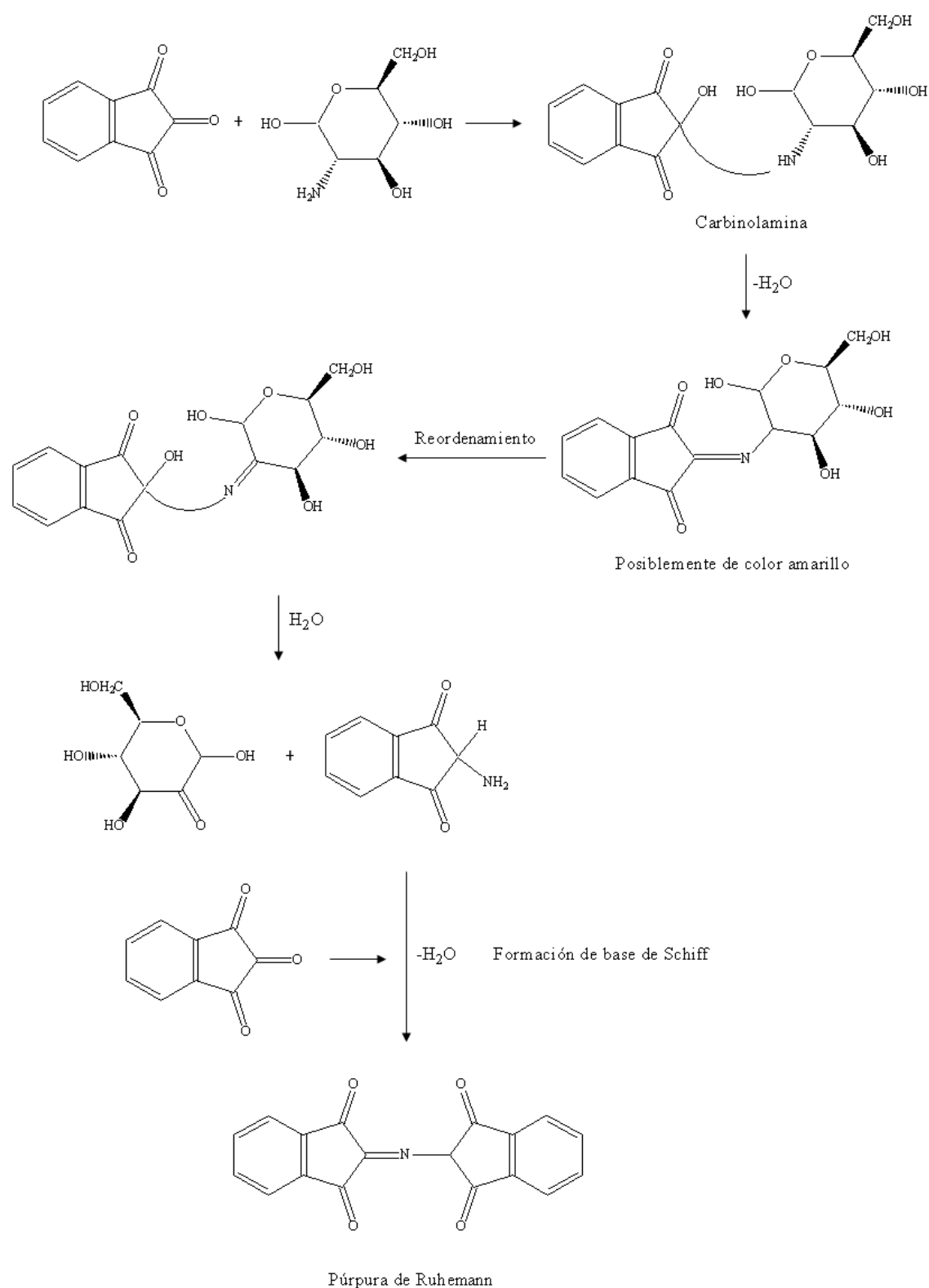


Figura 1.9. Reacción de derivatización de glucosamina con ninhidrina [38]

1.9.2. Ortoftalaldehído

El ortoftalaldehído (OPA, por sus siglas en inglés) fue originalmente introducido como un reactivo alternativo a la ninhidrina en la derivatización, y suministró un significativo incremento en la sensibilidad. En la Figura 1.10 se esquematiza como la glucosamina reacciona con el OPA en presencia de un reductor fuerte (2-mercaptoetanol o etanotiol), en condiciones alcalinas (pH 9-11), para formar un compuesto altamente fluorescente [38].

Las ventajas que presenta este método de derivatización es que la reacción se lleva a cabo rápidamente (1 minuto a temperatura ambiente) y la separación cromatográfica en fase reversa, seguida de detección fluorescente (λ excitación = 340 nm, λ emisión = 445 nm), constituye un método de análisis rápido, sensible y selectivo [36,39,40].

Una desventaja del OPA reside en la relativa inestabilidad de sus derivados, sin embargo, al bajar ligeramente el pH, se amortigua la reacción y estabiliza ligeramente los productos de reacción; este inconveniente no se tiene en la técnica de derivatización postcolumna. No obstante, el método con OPA se utiliza específicamente con derivatización precolumna porque es más sensible y tarda menos tiempo que otros métodos HPLC [37].

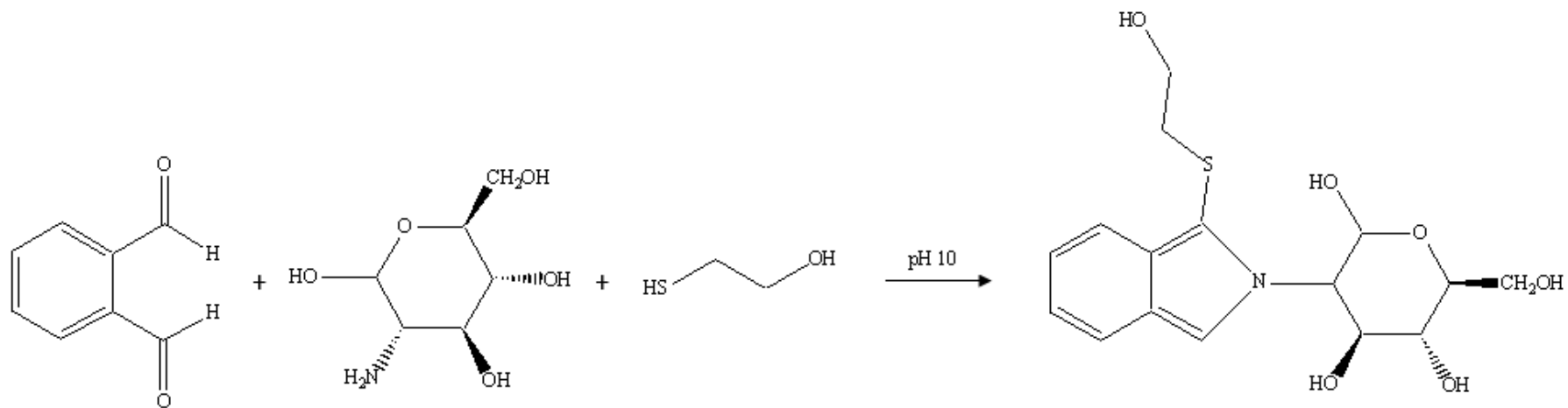


Figura 1.10. Reacción de derivatización de glucosamina con OPA [36]

1.9.3. Fenilisotiocianato

El PITC también conocido como reactivo de Edman, ha sido largamente usado para la secuenciación de polipéptidos y proteínas, y fue introducido para el análisis de aminoácidos al principio de los años ochenta. Es actualmente, el agente más usado en derivatización precolumna, seguido de cromatografía en fase reversa, para análisis tanto de glucosamina como de aminoácidos. La glucosamina es analizada como un derivado de la feniltiourea [2-desoxi-2-(3-feniltioureido)-glucopiranososa] [37]. En la Figura 1.11 se puede observar la reacción de la glucosamina con el PITC.

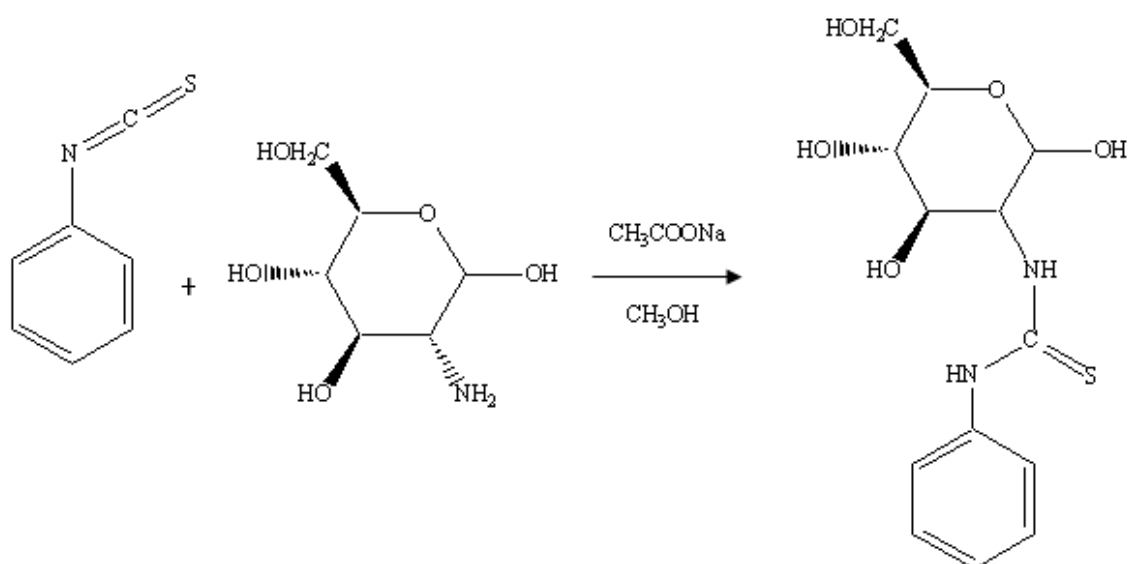


Figura 1.11. Reacción de derivatización de glucosamina con PITC [36]

Bajo condiciones moderadas, la reacción es prácticamente completa a los 5-10 minutos; ya que el reactivo es volátil se puede usar en exceso y eliminarlo fácilmente bajo presión reducida en un rotavapor. Aunque no es tan sensible como algunos reactivos fluorescentes, el derivado puede cuantificarse en niveles picomolares en la región ultravioleta a 240 nm, y puede ser estable hasta por 4 semanas a 20°C [36,41].

El reactivo PITC puede ser considerado superior al resto de agentes derivatizantes en un gran número de aspectos, sin embargo, tiene la desventaja que el derivado es fuertemente afectado por la presencia de algunas sales, cationes divalentes, metales e iones tampón. Así, mientras el acetato de amonio, cloruro de sodio y borato de sodio se ha encontrado que no tienen efectos, otras sales, como el fosfato de sodio y bicarbonato de sodio sí afectan la estabilidad del derivado [37].

1.9.4. 9-fluoroenilmetil cloroformato

Otro reactivo fluorescente para derivatizar la glucosamina es el FMOC-Cl. Reacciona rápidamente con la glucosamina a pH alcalino y temperatura ambiente, para producir un derivado carbamado altamente estable, que tiene una fluorescencia comparable al derivado del OPA (λ excitación = 263 nm, λ emisión = 315 nm) [34,37]. La Figura 1.12 muestra como la glucosamina reacciona con el FMOC-Cl.

En contraste con otros reactivos de derivatización, el FMOC-Cl es fluorescente por sí sólo. De igual manera, los productos de hidrólisis del reactivo que se forman tienen fluorescencia parecida a la del derivado, por lo que el exceso de reactivo y los productos fluorescentes secundarios tienen que ser eliminados antes de la detección de glucosamina [36].

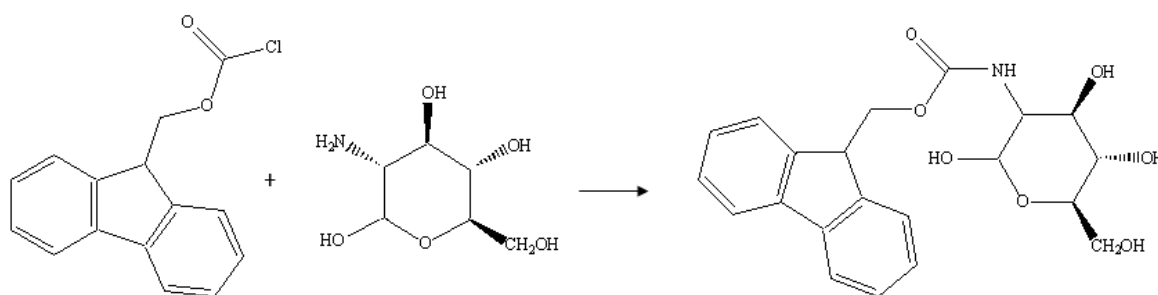


Figura 1.12. Reacción de derivatización de glucosamina con FMOC-Cl [36]

1.9.5. 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato

El AQC reacciona rápidamente con la glucosamina formando un producto altamente estable, con una fuerte fluorescencia (λ excitación = 250 nm, λ emisión = 395 nm). El derivado que resulta es estable a temperatura ambiente durante, al menos, una semana, y se separa fácilmente por cromatografía líquida en fase reversa [42]. La Figura 1.13 esquematiza la reacción de la glucosamina con el AQC.

Como se puede ver en la Figura 1.14, el exceso de reactivo se hidroliza durante la reacción para formar 6-aminoquinolina (AMQ), cuyas características espectrales son netamente diferentes a la del derivado. Ello permite programar una longitud de onda que maximice la respuesta de emisión del derivado y reduzca al mínimo la respuesta del AMQ. En la hidrólisis del reactivo también se forma N-hidroxisuccinimida (NHS) y dióxido de carbono, pero estos no interfieren en el análisis cromatográfico. La hidrólisis del exceso de reactivo se completa en un minuto [42].

Utilizando un detector UV a 250 nm (máximo de absorción del derivado de glucosamina), el AMQ absorbe alrededor de 200 veces más que el derivado y esto puede ocasionar dificultades en la cuantificación de la glucosamina. Esto no ocurre cuando la detección se lleva a cabo por fluorescencia, ya que la señal del AMQ es mucho menor a la obtenida en el UV. Este método ha sido optimizado para su uso con detector de fluorescencia y así lograr límites de detección a nivel femtomolar [42,43].

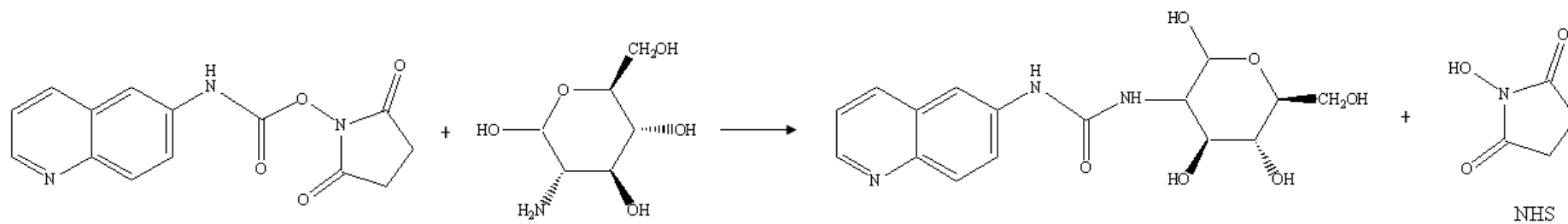


Figura 1.13. Reacción de derivatización de glucosamina con AQC [43]

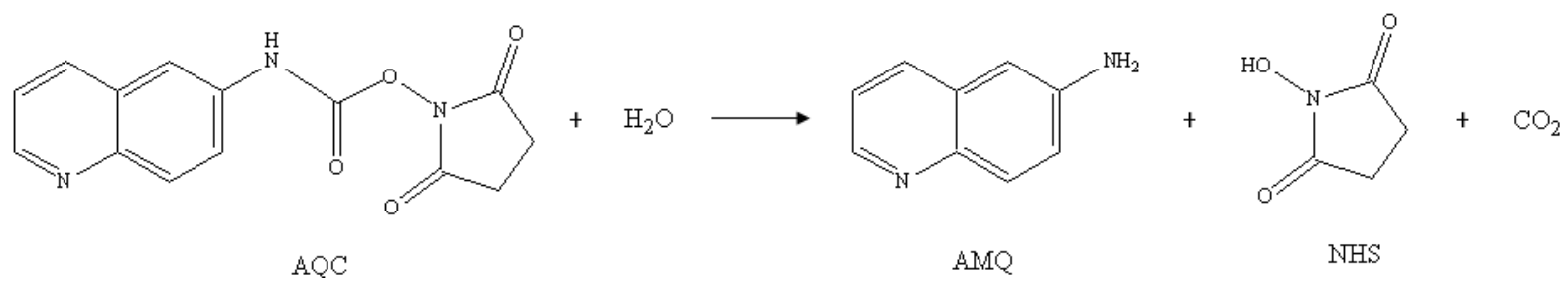


Figura 1.14. Hidrólisis del exceso de AQC [43]

En la Tabla 1.3 se muestra un resumen de las diferentes características de los reactivos derivatizantes más usados en el análisis de glucosamina.

Tabla 1.3. Reactivos empleados en la derivatización de glucosamina [35,37,43,44]

Reactivo derivatizante	Método de análisis/separación	Tipo de detección
Ninhidrina	Espectrofotometría Cromatografía iónica (postcolumna) Electroforesis capilar	VIS a 570 nm
OPA	Cromatografía líquida en fase reversa/iónica (pre y postcolumna) Electroforesis capilar	Fluorescencia λ excitación= 340 nm λ emisión= 445 nm UV a 340 nm
PITC	Espectrofotometría Cromatografía líquida en fase reversa (precolumna)	UV a 240 nm
FMOC-Cl	Cromatografía líquida en fase reversa (precolumna)	Fluorescencia λ excitación = 263 nm λ emisión = 315 nm UV a 254 nm
AQC	Cromatografía líquida en fase reversa (precolumna)	Fluorescencia λ excitación = 250 nm λ emisión = 395 nm UV a 250 nm

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTRAS

Los suplementos dietéticos que contienen glucosamina se encuentran comúnmente en el mercado en forma de: glucosamina pura, sulfato de glucosamina o clorhidrato de glucosamina; en tres tipos de presentaciones: tabletas, cápsulas o granulado para solución oral; y en combinación con: sulfato de condroitina, metilsulfonilmetano (MSM), astaxantina, sodio, manganeso, vitamina C, etc. En el presente estudio se adquirieron, de manera aleatoria y por triplicado, un total de quince productos disponibles en farmacias y tiendas naturistas. En la Tabla 2.1, se indica en detalle las muestras analizadas en esta investigación.

Tabla 2.1. Descripción de las muestras

Muestra	Dosis	Composición por dosis	Marca
Suplemento A	1 sobre*	Sulfato de Glucosamina (1500 mg)	Sandoz S.A.
Suplemento B	1 sobre**	Sulfato de Glucosamina (1500 mg)	Tecnofarma S.A.
Suplemento C	1 sobre***	Sulfato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina + Astaxantina (1500 mg + 1300 mg + 4 mg)	Biogenet S.A.
Suplemento D	3 cápsulas	Sulfato de Glucosamina + Astaxantina (1500 mg + 6 mg)	Biogenet S.A.
Suplemento E	1 sobre*	Sulfato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina (1500 mg + 1200 mg)	Tecnofarma S.A.
Suplemento F	1 sobre*	Sulfato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina (1500 mg + 1200 mg)	Procaps S.A.
Suplemento G	3 tabletas	Sulfato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina + Metilsulfonilmetano (1500 mg + 1200 mg + 1500 mg)	Bronson Laboratories
Suplemento H	2 tabletas	Clorhidrato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina + Metilsulfonilmetano + Sodio (1500 mg + 800 mg + 750 mg + 70 mg)	Nature Made
Suplemento I	2 tabletas	Clorhidrato de Glucosamina + Metilsulfonilmetano (1500 mg + 1500 mg)	Kirkland Signature
Suplemento J	2 tabletas	Clorhidrato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina + Sodio (1500 mg + 1200 mg + 100 mg)	Spring Valley
Suplemento K	3 cápsulas	Clorhidrato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina + Metilsulfonilmetano + Sodio (1500 mg + 1700 mg + 1700 mg + 45 mg)	Puritan`s Pride
Suplemento L	2 tabletas	Clorhidrato de Glucosamina + Sulfato de Condroitina + Metilsulfonilmetano + Sodio + Vitamina C + Manganese (1500 mg + 1250 mg + 1250 mg + 50 mg + 60 mg + 2 mg)	Berkley&Jensen
Suplemento M	2 tabletas	Clorhidrato de Glucosamina + Vitamina D (1500 mg + 400 UI)	Schiff Nutrition
Suplemento N	2 tabletas	Clorhidrato de Glucosamina + Metilsulfonilmetano (1500 mg + 1500 mg)	Schiff Nutrition
Suplemento O	3 cápsulas	Glucosamina + Sulfato de Condroitina + Metilsulfonilmetano + Vitamina E + Calcio + Magnesio + Manganese (1500 mg + 200 mg + 150 mg + 15 IU + 100 mg + 100 mg + 1 mg)	Diet Market

* 1 sobre contiene 4 g de polvo para solución oral

** 1 sobre contiene 3.3 g de polvo para solución oral

*** 1 sobre contiene 5.5 g de polvo para solución oral

2.2. ESTÁNDARES

- ❖ Sulfato de D-glucosamina, MP Biomedicals, $C_6H_{13}NO_5 \cdot \frac{1}{2} H_2SO_4$, PM 228.2, Número CAS: 29031-19-4.

2.3. REACTIVOS

- ❖ Agua desionizada.
- ❖ Acetato de sodio trihidratado.
- ❖ Metanol.
- ❖ Éter etílico.
- ❖ Fenilisotiocianato para síntesis, $\geq 98\%$, Merck, Número CAS: 103-72-0.

2.4. MATERIALES

- ❖ Papel filtro.
- ❖ Termómetro.
- ❖ Espátula metálica.
- ❖ Anillos metálicos.
- ❖ Soportes universales.
- ❖ Embudos de vidrio.
- ❖ Varillas de agitación.
- ❖ Vasos de precipitación de 100 y 250 ml.
- ❖ Embudos de separación de 100 ml.
- ❖ Tubos de ensayo de 13x100mm y 18x150mm.

- ❖ Balones de aforo de 10, 25, 50, 250, 1000 y 2000 ml (Clase A).
- ❖ Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml (Clase A).
- ❖ Probetas de 25 y 1000 ml (Clase A).
- ❖ Bureta de 50 ml (Clase A).
- ❖ Pipeta automática RAININ LTS 1-10 ml, precisión 0.2 ml.
- ❖ Celdas de cuarzo.

2.5. EQUIPOS

- ❖ Plancha de calentamiento BOECO Magnetic Stirrer MSH 300.
- ❖ Balanza analítica METTLER TOLEDO AB 204, precisión 0.1 mg.
- ❖ Espectrofotómetro UV-VIS CECIL 1021.

2.6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

2.6.1. Preparación de acetato de sodio 0.1M

1. Se pesó 27.2120 g de acetato de sodio trihidratado en un vaso de precipitación.
2. Se agregó aproximadamente 100 ml de agua desionizada. Se agitó y disolvió.
3. Se transfirió cuantitativamente la solución a un balón de aforo de 2000 ml.
4. Se diluyó con agua desionizada hasta la marca.
5. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.

2.6.2. Preparación de metanol al 60%

1. Se midió 600 ml de metanol en una probeta de 1000 ml.

2. Se transfirió cuantitativamente el metanol medido a un balón de aforo de 1000 ml.
3. Se diluyó con agua desionizada hasta la marca.
4. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.

2.7. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

2.7.1. Preparación de la solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml)

1. Se pesó 328.3 mg de estándar de sulfato de glucosamina en un vaso de precipitación.
2. Se agregó aproximadamente 50 ml de acetato de sodio 0.1M. Se agitó y disolvió.
3. Se transfirió cuantitativamente la solución a un balón de aforo de 250 ml.
4. Se aforó hasta la marca con acetato de sodio 0.1M.
5. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.
6. La solución necesita un tiempo de estabilización de por lo menos 24 horas antes de su análisis.

Nota: Se corrige la concentración de la solución en forma de base libre, es decir, en forma de glucosamina pura. Los detalles de los cálculos realizados se encuentran en el Anexo 1.

2.7.2. Derivatización y análisis de la solución patrón de sulfato de glucosamina

1. Se agregó 4 ml de la solución patrón de sulfato de glucosamina en un balón de aforo de 25 ml.
2. Se añadió 0.4 ml de fenilisotiocianato.
3. Se adicionó 15 ml de metanol y se agitó hasta disolución total del fenilisotiocianato.
4. Se diluyó con metanol al 60% hasta la marca.

5. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.
6. Se colocó una alícuota de 10 ml de la solución antes preparada en un tubo de ensayo calibrado.
7. Se calentó en un baño de agua a 80°C por 20 minutos.
8. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se diluyó con agua desionizada hasta la marca.
9. Se trasvasó cuantitativamente la solución a un embudo de extracción de 100 ml y se agregó 15 ml de éter etílico.
10. Se agitó la mezcla por un minuto para extraer el fenilisotiocianato sin reaccionar.
11. Se dejó decantar la mezcla y se recogió la fase acuosa (inferior) en un tubo de ensayo.
12. Se colocó una alícuota de 5 ml de la fase acuosa en un balón de aforo de 50 ml, y se diluyó con agua desionizada hasta la marca.
13. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.
14. Se preparó, a partir de la solución patrón del derivado (22 µg/ml), cinco soluciones de diferentes concentraciones: 2.5, 5, 10, 15 y 20 (µg/ml).
15. Se leyeron las absorbancias de las distintas soluciones en un espectrofotómetro UV-VIS a 240 nm.

2.7.3. Preparación de muestras

1. Para muestras en forma de tabletas y cápsulas, primeramente se pesó la muestra, posteriormente se molió finamente en un mortero de porcelana, y finalmente se pesó en un vaso de precipitación el equivalente a 50 mg de sulfato/clorhidrato de glucosamina. En el caso de las muestras en forma de polvo para solución oral, se pesó directamente la cantidad mencionada.

2. Se añadió aproximadamente 25 ml de acetato de sodio 0.1M. Se agitó y disolvió.
3. Se filtró la solución y el residuo se lavó exhaustivamente con acetato de sodio 0.1M.
4. Se recogió el filtrado y los lavados en un balón de aforo de 50 ml, y se aforó hasta la marca con acetato de sodio 0.1M.
5. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.
6. Las muestras al igual que la solución estándar de sulfato de glucosamina necesitan un tiempo de estabilización de por lo menos 24 horas antes de su análisis.

2.7.4. Derivatización y análisis de muestras

1. Se agregó 4 ml de la muestra previamente preparada en un balón de aforo de 25 ml.
2. Se añadió 0.4 ml de fenilisotiocianato.
3. Se adicionó 15 ml de metanol y se agitó hasta disolución total del fenilisotiocianato.
4. Se diluyó con metanol al 60% hasta la marca.
5. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.
6. Se colocó una alícuota de 10 ml de la solución antes preparada en un tubo de ensayo calibrado.
7. Se calentó en un baño de agua a 80°C por 20 minutos.
8. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se diluyó con agua desionizada hasta la marca.
9. Se trasvasó cuantitativamente la solución a un embudo de extracción de 100 ml y se agregó 15 ml de éter etílico.
10. Se agitó la mezcla por un minuto para extraer el fenilisotiocianato sin reaccionar.
11. Se dejó decantar la mezcla y se recogió la fase acuosa (inferior) en un tubo de ensayo.

12. Se colocó una alícuota de 5 ml de la fase acuosa en un balón de aforo de 50 ml, y se diluyó con agua desionizada hasta la marca.
13. Se tapó, agitó y etiquetó el balón.
14. Se agregó 2 ml de la solución antes preparada en un balón de aforo de 10 ml, y se diluyó hasta la marca con agua desionizada.
15. Se leyó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro UV-VIS a 240 nm.

2.8. PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método analítico es el proceso que permite establecer que las características representativas del método analítico son adecuadas para la aplicación que se pretende [45].

En este sentido es importante señalar que para obtener los mejores resultados deben considerarse todas las variables del método, que incluyen la etapa de muestreo, la preparación de la muestra, análisis de los datos, es decir se deben considerar todas las etapas del proceso.

El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico proporcione resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto [45].

Hay importantes razones para validar un método analítico. En primer lugar la validación es una parte integral del desarrollo de un método analítico, en segundo lugar, las BPM así lo exigen para un aseguramiento de la calidad. Por último, desde el punto de vista analítico y

comercial, hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos aportan [45,46].

Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, es decir, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos, para poder resolver un problema analítico particular [46].

Los requisitos o criterios de validación que son evaluados en este estudio son los siguientes:

- ❖ Linealidad
- ❖ Precisión
- ❖ Exactitud
- ❖ Selectividad

2.8.1. Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado [45].

Los pasos que se siguieron para determinar la linealidad del método analítico en estudio fueron los siguientes:

1. Se realizó un ensayo en blanco para cada solución de trabajo, exactamente bajo las mismas condiciones experimentales a la preparación de la curva de calibración, una vez por día y durante tres días consecutivos.

En la Tabla 2.2 se indica el volumen de la solución patrón del derivado necesario para preparar 10 ml de cada una de las soluciones de trabajo. En este caso los volúmenes son equivalentes a la de la solución patrón blanco.

Tabla 2.2. Preparación de la curva de calibración

Solución de trabajo ($\mu\text{g/ml}$)	Solución patrón del derivado (ml)
2.5	1.14
5	2.28
10	4.54
15	6.80
20	9.08

2. Se preparó a partir de la solución patrón del derivado (22 $\mu\text{g/ml}$), cinco soluciones de diferentes concentraciones: 2.5, 5, 10, 15 y 20 ($\mu\text{g/ml}$). Para ello se emplearon los volúmenes detallados en la Tabla 2.2.
3. Se elaboró tres curvas de calibración por día, durante tres días consecutivos.
4. Se determinó la media aritmética, desviación estándar absoluta y relativa de las absorbancias, tanto de las soluciones del derivado como de los blancos.
5. Se graficó la absorbancia del derivado (promedio y corregida) contra la concentración de la solución.
6. Se calculó la ecuación de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.
7. Se estimó la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico, calculando el coeficiente de correlación (r^2).

8. Se realizó una prueba de linealidad comparando la media de los factores de respuesta con el valor de la pendiente de la recta de calibración, utilizando para ello la prueba de t de Student. Los factores de respuesta se calculan por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{Y}{X} \quad (2.1)$$

Donde, Y = absorbancia

X = concentración de la solución

9. Se determinó la desviación estándar relativa (RSD) de los factores de respuesta. Más adelante, en el numeral 2.8.4, se indica lo que representa este parámetro estadístico, así como la ecuación con la cual se calcula.

Los criterios de aceptación tomados en consideración fueron [47-49]:

- ❖ El coeficiente de correlación (r^2) de la regresión lineal debe ser mayor a 0.995.
- ❖ La desviación estándar relativa (RSD) de los factores de respuesta debe ser menor al 3%.
- ❖ Pendiente distinta de cero (t_{exp} menor que t_{tabla})

2.8.2. Exactitud

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es

inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse [45].

La falta de veracidad puede ser por defecto o por exceso:

- a. Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas del método y la selectividad no es la adecuada; los resultados finales son superiores a los verdaderos. En este caso, debería modificarse el método para hacerlo más selectivo.
- b. Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos en varias fases, extracciones, purificaciones, etc., que se traducen inevitablemente en una disminución de la recuperación.

La exactitud se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero [46]. Lo más usual es emplear como parámetro de medida el porcentaje de recuperación y se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\text{valor obtenido (X)}}{\text{valor real}} \times 100 \quad (2.2)$$

La determinación del porcentaje de recuperación se puede llevar a cabo a través de tres procedimientos: a) análisis repetido de una muestra de concentración única conocida (material de referencia certificado), b) método de adición de estándar y c) comparación con otro método analítico ya validado [45]. Dependiendo del tipo de método aplicado se definen criterios de aceptación, en nuestro caso se siguió el procedimiento b y se consideró

que el porcentaje de recuperación obtenido debe encontrarse entre el 90 y 110%, lo cual es equivalente a $\pm 10\%$ de error relativo [47].

2.8.2.1. Método de adición de estándar

1. Se analizó una muestra de sulfato de glucosamina, clorhidrato de glucosamina y glucosamina pura, por el mismo método en estudio, por triplicado y en condiciones de repetibilidad (el mismo día, por el mismo analista y en el mismo laboratorio). Se calculó la cantidad promedio de analito en cada muestra.
2. Se agregó a las muestras previamente analizadas, antes del tratamiento, 5 ml de la solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml).
3. El procedimiento se lo efectuó por triplicado y en las mismas condiciones de repetibilidad.
4. Se determinó la cantidad promedio de analito en las muestras enriquecidas.
5. Se calculó el porcentaje de recuperación por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (2.3)$$

Donde, C_1 = cantidad de analito en la muestra fortificada

C_2 = cantidad inicial de analito en la muestra

C_3 = cantidad de estándar añadido

2.8.3. Selectividad

La selectividad o especificidad se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas u otros

componentes que puedan estar presentes en la muestra. La selectividad es una condición esencial para conseguir una buena exactitud, por lo que constituye un criterio clave en la validación de un método analítico [46].

La selectividad depende de las características del propio método analítico y de la naturaleza y composición de la muestra (matriz) que se analiza. De ahí, que al validar un método de análisis, debe señalarse claramente no solo el analito que se certifica sino también la matriz para la cual es válida la determinación [46].

Este parámetro se evalúa usualmente a través del estudio de exactitud (porcentaje de recuperación), empleando alguno de los procedimientos antes descritos.

2.8.4. Precisión

La precisión es el grado de correlación o cercanía entre los resultados analíticos individuales que se obtienen al aplicar repetidamente el método sobre una misma muestra, muestras semejantes o patrones, en condiciones definidas [45].

La precisión se calcula matemáticamente a través de la desviación estándar relativa, RSD, según la Ecuación 2.4:

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.4)$$

Donde, SD, es la desviación estándar absoluta, que es un parámetro estadístico que expresa la desviación de los valores con respecto al valor medio y se calcula a través de la Ecuación 2.5:

$$SD = \sqrt{\frac{(\bar{X} - x_i)^2}{n-1}} \quad (2.5)$$

Un método es más preciso, en tanto menor es la desviación estándar absoluta calculada, es decir, cuanto más se acerquen entre sí los resultados obtenidos de varios análisis realizados a una misma muestra [45].

Los valores de desviación estándar relativa reportados para que un método analítico sea considerado preciso, se mueven en rangos más o menos amplios en la literatura científica que aborda esta temática. En la Tabla 2.3 se presentan los criterios de aceptación seguidos por el colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.

Tabla 2.3. Criterios aceptados de desviación estándar relativa [45]

Tipo de método	RSD aceptado
Cromatográficos	≤ 2%
Químicos y Espectrofotométricos	≤ 3%
Microbiológicos	≤ 5%

Las dos medidas más comunes de precisión, que generalmente se definen en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa, son la repetibilidad y la reproducibilidad [46].

La repetibilidad es la medida de la precisión de un método cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones: utilizando la misma muestra, el mismo operador, el mismo equipo, en el mismo laboratorio, con los mismos reactivos y durante un periodo corto. La repetibilidad describe la variabilidad mínima del proceso analítico [45,50].

La reproducibilidad es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados

sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas, en días diferentes, en otros laboratorios, empleando diferentes reactivos, columnas, etc. La reproducibilidad representa la máxima variabilidad de un procedimiento analítico [45,50].

La desviación estándar relativa en el estudio de reproducibilidad puede ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma muestra, debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad [50].

La precisión intermedia se refiere a la precisión evaluada sobre la misma muestra, utilizando el mismo método, en el mismo laboratorio, pero definiendo exactamente cuáles son las condiciones a variar (una o más), tales como: operadores, equipos o tiempos. Esta medida de la precisión es reconocida como la más representativa de la variabilidad de los resultados en un laboratorio y, como tal, más aconsejable para ser usada [51].

Para evaluar tanto la repetibilidad como la precisión intermedia del método analítico en estudio se cumplió con el siguiente procedimiento:

1. Para el estudio de repetibilidad, el análisis se realizó utilizando las lecturas de absorbancia obtenidas en la evaluación del parámetro de exactitud.
2. Para determinar la precisión intermedia, se prepararon igualmente estas muestras, con la misma fortificación, en distintos días, pero se leyeron en el mismo equipo y por el mismo analista.
3. En los dos casos se evaluó la precisión en términos de desviación estándar relativa.

2.9. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La espectrofotometría de absorción molecular en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético es, posiblemente, la más utilizada en la práctica del análisis cuantitativo de todas las técnicas espectroscópicas. Asimismo, puede resultar de utilidad como técnica auxiliar para la determinación de estructuras de especies químicas [52].

Se basa en la absorción de radiación ultravioleta-visible por el analito, como consecuencia de lo cual se origina un estado excitado, que posteriormente elimina su exceso de energía en forma de calor. Este proceso se representa esquemáticamente de la siguiente manera:



Por un lado, la absorción de radiación ultravioleta o visible origina transiciones entre distintos niveles de energía electrónicos; mientras que la cantidad de calor disipado es muy pequeño, que el método tiene la ventaja de originar un trastorno mínimo en el sistema que se estudia.

El término generalmente empleado en la medida de la radiación absorbida es el de absorciometría, si bien, normalmente se utiliza la denominación de colorimetría cuando se trabaja en la región visible del espectro electromagnético y se emplean aparatos que utilizan filtros para seleccionar la radiación utilizada. Por otra parte, el término espectrofotometría suele aplicarse cuando la radiación utilizada se extiende a las regiones

ultravioleta e infrarroja, y además, se utilizan monocromadores en lugar de filtros, así como sistemas de detección más sensibles, como tubos fotomultiplicadores [52].

En cuanto a la región ultravioleta, hay que indicar que la zona de mayor interés en la práctica analítica ordinaria es la denominada ultravioleta cercana (200-400 nm), pues la ultravioleta lejana o ultravioleta de vacío (10-200 nm) presenta el inconveniente de que el oxígeno atmosférico absorbe en esa región, siendo necesario eliminarlo del instrumento de medida. Debido a ello, la espectrofotometría en esa región espectral no se ha desarrollado suficientemente [52].

2.9.1. Ley de Beer

Cuando un haz de radiación monocromática atraviesa una capa de disolución conteniendo una especie absorbente, la potencia del haz incidente P_o se atenúa, disminuyendo hasta P , como se ilustra en la Figura 2.1 [52].

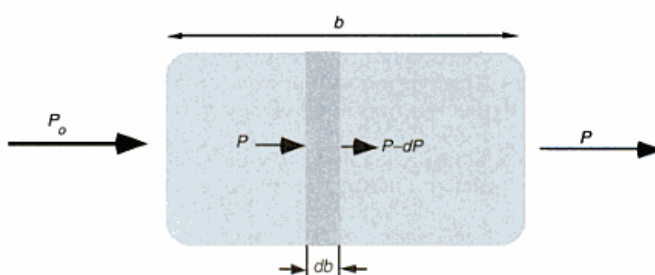


Figura 2.1. Absorción de radiación

Se define la transmitancia, T , como la fracción de radiación incidente que consigue atravesar la muestra. Varía de 0 a 1 y puede expresarse como se indica en la Ecuación 2.6:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (2.6)$$

Un parámetro de mayor utilidad práctica es la absorbancia, A, que se define por medio de la siguiente ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad (2.7)$$

En la Ecuación 2.8, se muestra como para una capa de disolución absorbente de espesor infinitamente pequeño, db, la disminución de la potencia radiante, dP, es proporcional a la propia potencia incidente, P, a la concentración de la especie absorbente, C, y al espesor db.

$$dP = -k P C db \quad (2.8)$$

Donde, k, es una constante de proporcionalidad. Reagrupando la Ecuación 2.8 e integrando se obtiene la Ecuación 2.9:

$$A = \epsilon b C \quad (2.9)$$

Donde, $\epsilon = k/2.3$. La Ecuación 2.9 se denomina Ley de Beer y es fundamental en análisis cuantitativo al relacionar la absorbancia con la concentración.

La constante, ϵ , recibe el nombre de absortividad molar, cuando la concentración, C, se expresa en moles/litro y el camino óptico, b, en centímetros. La absortividad es una propiedad característica de la sustancia absorbente y depende de la longitud de onda. Por ello, para aplicar la Ley de Beer debe seleccionarse una determinada longitud de onda, y

para este propósito se utiliza el espectro de absorción, siendo éste una gráfica que indica la variación de la absorbancia con la longitud de onda [52].

2.9.2. Limitaciones de la Ley de Beer

Se han encontrado pocas excepciones a la generalización de que la absorbancia está relacionada linealmente con el camino óptico, b . Sin embargo, con frecuencia se han encontrado desviaciones de la proporcionalidad entre la medida de la absorbancia y la concentración cuando b es constante.

En algunas ocasiones estas desviaciones están relacionadas con el fundamento de la ley y representan limitaciones propias. Otras veces surgen como consecuencia de la forma en que se realizan las medidas de absorbancia o como resultado de cambios químicos asociados con cambios de concentración; las dos últimas son conocidas a veces como desviaciones instrumentales y desviaciones químicas, respectivamente [52].

Las desviaciones de la Ley de Beer pueden ser: Propias, Instrumentales, Químicas y/o Personales.

2.9.2.1. Desviaciones propias

La Ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas, en este sentido, es una ley límite. A concentraciones altas (generalmente $>0.01M$), la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula

altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración [53].

También surgen desviaciones de la Ley de Beer como consecuencia de la dependencia de ϵ con el índice de refracción del medio. Por ello, si los cambios de la concentración causan alteraciones significativas en el índice de refracción de una disolución se observan desviaciones [52].

2.9.2.2. Desviaciones instrumentales

Las fluctuaciones producidas en la corriente eléctrica, la inestabilidad de algunas fuentes de radiación o la respuesta no lineal del detector pueden originar el funcionamiento incorrecto de un determinado instrumento. Además de éstos, pueden considerarse los siguientes factores de tipo instrumental como causas de desviaciones de la Ley de Beer [52]:

2.9.2.2.1. Radiación policromática

El cumplimiento estricto de la Ley de Beer sólo se observa cuando la radiación es realmente monocromática. Desafortunadamente, en la práctica es raro el uso de radiación restringida a una sola longitud de onda debido a que los dispositivos que aíslan porciones

de la señal de salida de una fuente continua generan una banda de longitudes de onda más o menos simétricas en torno a la deseada.

Se ha observado que las desviaciones de la Ley de Beer resultantes del uso de un haz policromático no son apreciables, siempre y cuando, la radiación no abarque una región del espectro en la cual el absorbente muestre cambios grandes en la absorción en función de la longitud de onda [53].

2.9.2.2. Radiación parásita

El haz de radiación que emerge del monocromador suele estar contaminado con pequeñas cantidades de radiación dispersada parásita, la cual alcanza la rendija de salida como resultado de dispersiones y reflexiones en varias superficies internas. La radiación parásita, con frecuencia difiere sustancialmente en su longitud de onda de la radiación principal y puede, en ocasiones, llegar al detector sin haber atravesado la muestra. Es importante mencionar que cuando se trata de concentraciones y caminos ópticos elevados, la radiación parásita puede causar desviaciones significativas en la relación lineal que existe entre la absorbancia y el camino óptico [53].

2.9.2.3. Desviaciones químicas

Se incluyen las desviaciones de la Ley de Beer producidas como consecuencia de procesos químicos en los que participan las especies absorbentes [53].

2.9.2.3.1. Influencia del equilibrio

Cuando la sustancia problema interviene o forma parte de un sistema en equilibrio con otras especies, el desplazamiento del equilibrio implica una modificación en la concentración y, en consecuencia, en la absorbancia [52,53].

2.9.2.3.2. Influencia del disolvente

Como consecuencia de las interacciones soluto-disolvente se originan con frecuencia desplazamientos espectrales, ensanchamientos de bandas y otros fenómenos que pueden provocar desviaciones en la Ley de Beer [52].

2.9.2.3.3. Influencia de la temperatura

La temperatura puede influir modificando el equilibrio de algunos sistemas, así como, en ocasiones, dan lugar a desplazamientos batocrómicos (desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores). De todas formas, la temperatura no suele ser un factor a considerar en la mayor parte de los sistemas absorbentes sencillos [52].

2.9.2.3.4. Presencia de impurezas en los reactivos

Muchos métodos espectrofotométricos son lo suficientemente sensibles como para detectar cantidades a nivel de trazas, por lo que la presencia de impurezas absorbentes en los mismos reactivos pueden originar errores considerables. Debido a ello, en la práctica analítica ordinaria, las medidas espectrofotométricas se llevan a cabo frente a un blanco

constituido por la propia celda, el disolvente y los reactivos. Por lo tanto, interesa que la absorbancia del blanco sea pequeña, pues si es grande, un pequeño error en su medida puede implicar un gran error relativo en el resultado final [52,53].

2.9.2.3.5. Interacciones entre especies absorbentes

Cuando en una disolución existen varias especies absorbentes, la Ley de Beer se cumple para cada una de ellas, si todas actúan independientemente. Sin embargo, la interacción entre ellas puede producir alteraciones en la distribución de cargas, como consecuencia de lo cual puede modificarse la energía requerida para la absorción y, en consecuencia, variaciones en la posición, forma y altura de las bandas de absorción. Por otra parte, estas alteraciones en la distribución de cargas también pueden ser originadas por la presencia de sales inertes, con el consiguiente aumento de la fuerza iónica de la disolución [52].

2.9.2.4. Desviaciones personales

Los errores indeterminados en la lectura de la transmitancia o absorbancia son errores que potencialmente siempre están presentes y es necesario tenerlos en cuenta. Pequeños errores en la lectura de la transmitancia o de la absorbancia pueden ocasionar grandes errores en la determinación de la concentración, especialmente cuando se opera en los extremos de la escala ($0M < C < 0.01M$) [52]. Otra fuente de errores personales suele ser el uso inadecuado de las celdas de absorción.

2.9.3. Instrumentación

El instrumento que normalmente se utiliza para medir la transmitancia o absorbancia de una muestra en función de la longitud de onda es el espectrofotómetro. En la Figura 2.2 se

observa un esquema de los componentes básicos de un espectrofotómetro: fuente de radiación, monocromador, celda o recipiente que contenga la muestra o el blanco, detector de radiación y, un sistema de tratamiento y lectura de la señal detectada [52].

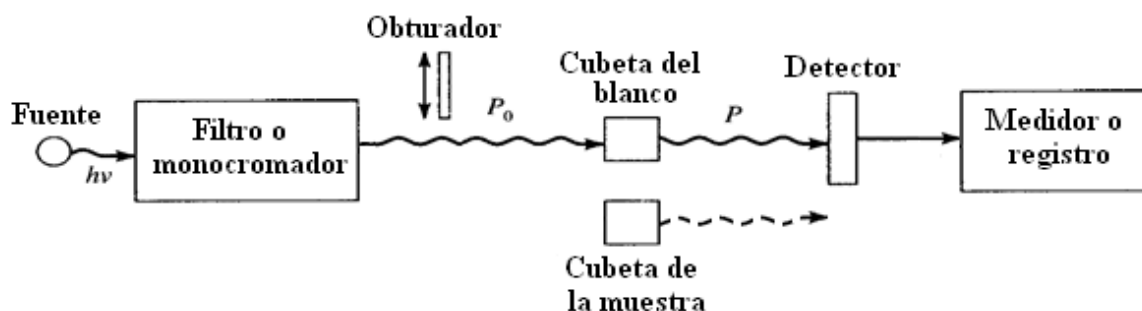


Figura 2.2. Esquema de un espectrofotómetro UV-VIS de haz sencillo [53]

Fuente de radiación: Las fuentes de radiación utilizadas en espectrofotometría ultravioleta-visible deben ser continuas en una amplia zona del espectro, de intensidad elevada y ser esencialmente constante con la longitud de onda. Las fuentes más empleadas son: lámpara de wolframio, lámpara de deuterio, lámpara de descarga de xenón o lámpara de vapor de mercurio.

Filtros y monocromadores: La misión de los filtros y monocromadores es seleccionar un haz de radiación monocromática. Están constituidos por rendijas de entrada y salida, colimadores y el elemento de dispersión.

Recipientes para las muestras: En espectrofotometría analítica, casi siempre se trabaja con disoluciones, por lo cual la mayoría de los recipientes para las muestras son celdas para colocar líquidos en el haz del espectrómetro. Estos recipientes deben estar fabricados con un material que permita el paso de radiación de la región espectral de interés. Así, el vidrio puede emplearse entre 350 y 2000 nm, mientras que en la región ultravioleta se necesita

cuarzo o sílice fundida, ambas sustancias también son transparentes en la región visible.

Detectores: Los detectores usados en espectrofotometría ultravioleta y visible son transductores que convierten la energía radiante en una señal eléctrica. Un detector ideal deberá presentar las siguientes características:

- ❖ Sensibilidad elevada en la región espectral de interés.
- ❖ Respuesta lineal para la energía radiante.
- ❖ Tiempo de respuesta corto.
- ❖ Utilizable en un amplio intervalo de longitudes de onda.
- ❖ Elevada relación señal/ruido.

Sin embargo, no existe el detector ideal, por lo que en la práctica, se evalúan todos los factores anteriores y se selecciona algún detector que resulte adecuado al caso. Los más utilizados son: células fotovoltaicas, fototubos y tubos fotomultiplicadores.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La glucosamina carece en su estructura química de la presencia de un grupo cromóforo que sea responsable de la absorción de radiación en la región ultravioleta cercana (200-400 nm), sin embargo, la solución acuosa de glucosamina muestra una absorbancia máxima a 190 nm, pero posee baja sensibilidad y selectividad. Para mejorar las condiciones de cuantificación, se hace reaccionar el grupo funcional amino de la glucosamina con fenilisotiocianato, en presencia de una base (acetato de sodio), para formar el derivado 2-desoxi-2-(3-feniltioureido)-D-glucopiranososa, que presenta una absorbancia máxima a 240 nm. El propósito de las condiciones alcalinas es liberar la glucosamina en forma de base libre por desplazamiento del ion sulfato o clorhidrato que conforma la sal. Consecuentemente, este método no es aplicable a formulaciones de glucosamina con grupos sulfato unidos covalentemente a la hexosamina [28,41,52].

3.1. PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.1.1. Linealidad

Para determinar el intervalo de concentraciones en el cual el derivado cumple con la Ley de Beer, se procedió a construir la curva de calibración. Para ello, se prepararon una serie de soluciones acuosas con concentraciones del derivado comprendidas entre 2.5 y 22 µg/ml. Estas soluciones de trabajo se elaboraron de manera que sus concentraciones fueran

equivalentes a las concentraciones de glucosamina esperadas en los suplementos dietéticos, ya sea en forma de sulfato, clorhidrato o pura.

Se debe considerar que la etapa de preparación de la muestra tiene como objetivo poner al analito en condiciones de ser cuantificado, lo que involucra un tratamiento de la matriz con el fin de eliminar la mayor cantidad de interferencias, es decir, sustancias presentes en la matriz sensibles a experimentar la misma reacción que el analito. Sin embargo, existen procedimientos de cuantificación, que por el gran número de etapas, operaciones y reactivos que involucran, o por las propias condiciones de trabajo, pueden introducir interferencias en el análisis conduciendo a la sobrevaloración del resultado analítico. Precisamente, con el propósito de eliminar en el cálculo final de cuantificación, la influencia de interferencias que no provienen de la matriz se realiza un ensayo en blanco [45].

Un ensayo en blanco es un análisis que se realiza de forma paralela a la determinación del analito, exactamente bajo las mismas condiciones experimentales (etapas, operaciones, reactivos, etc.), pero sin adición del mismo [45].

Se pudo evidenciar en los primeros ensayos en blanco, obtenidos en las mismas circunstancias para la solución patrón del derivado, que no eran totalmente transparentes a 240 nm y la absorbancia disminuía conforme se aumentaba el grado de dilución. Por lo tanto, con el fin de eliminar la influencia de interferencias que no provienen de la matriz, se realizó un ensayo en blanco para cada una de las soluciones de trabajo. El procedimiento se llevó a cabo una vez por día y durante tres días consecutivos. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores de absorbancia de ensayos en blanco para la solución patrón y soluciones de trabajo

	Derivado (µg/ml)	2.5	5	10	15	20	22
Absorbancia	Día 1	0.051	0.058	0.068	0.081	0.092	0.091
	Día 2	0.052	0.057	0.068	0.082	0.091	0.091
	Día 3	0.052	0.058	0.067	0.080	0.091	0.089
	Promedio	0.052	0.058	0.068	0.081	0.091	0.090
	SD	5.77×10^{-4}	5.77×10^{-4}	5.77×10^{-4}	1.00×10^{-3}	5.77×10^{-4}	1.15×10^{-3}
	RSD (%)	1.12	1.00	0.85	1.23	0.63	1.28

Ahora bien, para la construcción de la curva de calibración se midió la señal de respuesta de cinco soluciones con concentraciones espaciadas en forma uniforme a lo largo del intervalo de interés: 2.5, 5, 10, 15 y 20 (µg/ml). Estas soluciones de trabajo se prepararon, por triplicado, a partir de la solución patrón del derivado (22 µg/ml). Como se observa en la Tabla 3.2, el procedimiento se repitió en forma independiente durante tres días.

Tabla 3.2. Valores de absorbancia de la solución patrón y soluciones de trabajo

	Derivado (µg/ml)	2.5	5	10	15	20	22
Absorbancia	Día 1	0.187	0.316	0.589	0.856	1.142	1.258
		0.184	0.310	0.586	0.845	1.120	1.240
		0.181	0.311	0.582	0.851	1.134	1.248
	Día 2	0.192	0.319	0.605	0.894	1.190	1.300
		0.188	0.314	0.587	0.851	1.130	1.246
		0.183	0.309	0.573	0.834	1.112	1.230
	Día 3	0.190	0.327	0.607	0.880	1.172	1.288
		0.186	0.314	0.580	0.846	1.118	1.242
		0.185	0.324	0.604	0.883	1.174	1.294
	Promedio	0.186	0.316	0.590	0.860	1.144	1.261
	SD	3.46×10^{-3}	6.24×10^{-3}	1.22×10^{-2}	2.05×10^{-2}	2.82×10^{-2}	2.62×10^{-2}
	RSD (%)	1.86	1.98	2.06	2.38	2.47	2.08

Los resultados de la Tabla 3.1 garantizan la cuantificación de interferencias que aparecen durante la preparación de la curva de calibración. Por lo tanto, a la absorbancia promedio de cada solución del derivado (ver Tabla 3.2), se resta la señal promedio del blanco

correspondiente (ver Tabla 3.1). En la Tabla 3.3 se muestran las absorbancias corregidas de cada una de las soluciones de trabajo así como de la solución patrón.

Tabla 3.3. Valores de absorbancia reales de la solución patrón y soluciones de trabajo

Derivado ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
2.5	0.135
5	0.258
10	0.523
15	0.779
20	1.052
22	1.170

Como se observa en la Figura 3.1, con los resultados presentados en la Tabla 3.3 se construye la curva de calibración para el derivado de la feniltiourea, ajustada para la determinación de glucosamina en suplementos dietéticos por espectrofotometría ultravioleta (UV). Para verificar si el intervalo de trabajo presenta una relación lineal entre la absorbancia y la concentración del derivado, se determinó: la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación (r^2) de la curva de calibración mediante el método de mínimos cuadrados.

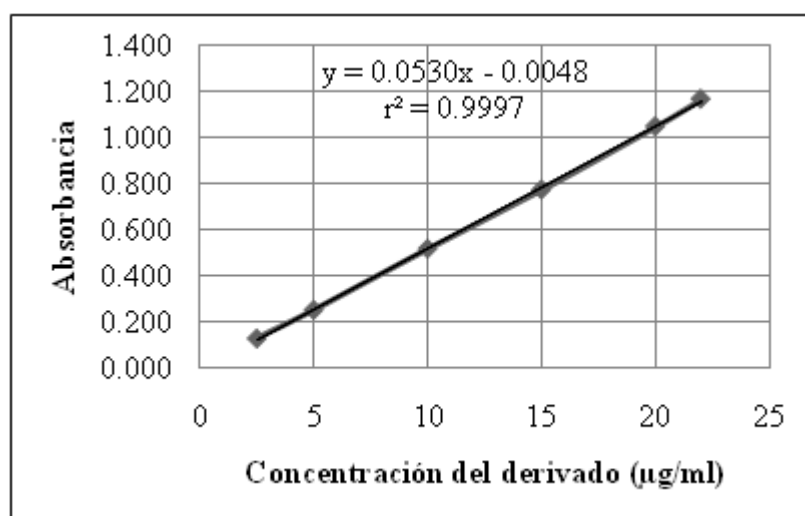


Figura 3.1. Curva de calibración para la determinación de glucosamina en suplementos dietéticos por espectrofotometría ultravioleta (UV)

De la misma manera, en la Tabla 3.4 se presentan los resultados de la prueba de linealidad realizada, al comparar la media de los factores de respuestas con el valor de la pendiente de la recta de calibración, a través de la prueba t de Student; así como el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD) de los factores de respuesta.

Tabla 3.4. Prueba de linealidad

Solución (µg/ml)	Absorbancia	Factor de respuesta
2.5	0.135	5.38×10^{-2}
5	0.258	5.17×10^{-2}
10	0.523	5.23×10^{-2}
15	0.779	5.19×10^{-2}
20	1.052	5.26×10^{-2}
22	1.170	5.32×10^{-2}
Promedio		5.26×10^{-2}
SD		8.09×10^{-4}
RSD (%)		1.54
$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}} (0.05, 5)$		$1.26 < 2.57$

Los datos de la Tabla 3.4 evidencian que no existen diferencias significativas entre la media de los factores de respuesta y la pendiente de la recta de calibración, puesto que al aplicar la prueba de Student se obtuvo un valor t experimental menor que el tabulado, para una probabilidad de 0.05 (dos colas) y 5 grados de libertad. Por su parte, la desviación estándar relativa (RSD) total de los factores de respuesta (1.54%) fue inferior al 3%, establecido como límite indicativo de linealidad.

El hecho de usar un contraste de dos colas en la prueba t, implica que no es primordial conocer el sentido en que difiere la media de los factores de respuesta con la pendiente de la recta; es decir, si la diferencia es positiva o negativa. Los detalles de la prueba t de Student aplicada se encuentran en el Anexo 1 [54].

En la Tabla 3.5 se resumen las características de desempeño para el parámetro de linealidad.

Tabla 3.5. Características de desempeño para la linealidad

Parámetro para el derivado	Observación
Longitud de onda óptima (nm)	240
Rango de linealidad (µg/ml)	2.5 - 22
Ecuación de regresión lineal ($y = mx+b$)	$y = 0.0530x - 0.0048$
Pendiente (m)	0.0530
Intercepto (b)	0.0048
Coefficiente de correlación (r^2)	0.9997

Consecuentemente, se puede decir que el intervalo de concentración comprendido entre 2.5 y 22 µg/ml del derivado, satisface las condiciones de linealidad del método analítico ya que se cumplen con todos los criterios de aceptación establecidos. Esto a su vez indica correspondencia entre los valores obtenidos con la recta de ajuste y los conseguidos experimentalmente.

3.1.2. Exactitud y Selectividad

En los estudios de exactitud y selectividad se analizó, por triplicado y de forma independiente, tres muestras distintas de glucosamina (suplementos C, H y O). Una vez conocido el contenido promedio de glucosamina en las tres muestras, se procedió a fortificar cada muestra, por triplicado, con 3.93 mg de glucosamina, empleando para ello 5 ml de la solución patrón de glucosamina de concentración igual a 0.7853 mg/ml.

Para la preparación de las muestras enriquecidas se mantuvo constante la cantidad de muestra y se agregó una cantidad conocida de analito. Es decir, se pesaron 50 mg de muestra previamente analizada, se adicionó 5 ml de la solución estándar de glucosamina y

se aforó a un volumen de 50 ml con acetato de sodio 0.1M. Cabe resaltar que la adición del estándar del analito se realizó desde las primeras fases del estudio (directamente a la matriz), ya que si la adición se hubiera efectuado inmediatamente antes de la medición, el porcentaje de recuperación sólo indicaría la confiabilidad del instrumento [45].

El procedimiento fue realizado en el mismo día, por el mismo analista y en el mismo laboratorio, es decir, en condiciones de repetibilidad. En la Tabla 3.6 se muestran los resultados alcanzados para el análisis de exactitud.

Para la evaluación de los datos obtenidos se determinó el porcentaje de recuperación con un criterio de aceptación de $\pm 10\%$ [47]. La recuperación media alcanzada (97.0%) indica que el método propuesto tiene la exactitud adecuada para la determinación de glucosamina en suplementos dietéticos.

Las pruebas de recuperación permiten determinar si existen o no interferencias por parte de la matriz, es decir, se usan para medir errores sistemáticos debidos a sustancias distintas del analito [47]. Los resultados de la Tabla 3.6 sugieren que no existen interferencias de excipientes, aditivos y otros ingredientes activos para la cuantificación glucosamina en suplementos dietéticos por espectrofotometría ultravioleta, y en consecuencia es posible utilizar una curva de calibración con patrones acuosos para esta determinación.

Tabla 3.6. Evaluación de la exactitud del método objeto de estudio

Muestra	Glucosamina en muestra (mg)	Glucosamina añadida (mg)	Glucosamina en muestra fortificada (mg)			Promedio	SD	RSD (%)	Porcentaje de recuperación (%)
			R ₁	R ₂	R ₃				
Suplemento C	28.6	3.93	32.5	31.4	33.1	32.3	8.46 x10 ⁻¹	2.62	95.6
Suplemento H	41.6	3.93	46.4	44.7	45.1	45.4	8.89 x10 ⁻¹	1.96	97.0
Suplemento O	44.4	3.93	48.8	48.2	47.9	48.3	4.23 x10 ⁻¹	0.88	98.4
Porcentaje de recuperación promedio = 97.0% RSD promedio = 1.82%									

Es importante mencionar que con el objetivo de corroborar la selectividad del método analítico, se consideró emplear el Suplemento O como parte del estudio de exactitud, ya que tiene en su composición metionina, un aminoácido esencial no polar [55]. Como se señaló en el Capítulo 1, el fenilisotiocianato (reactivo de Edman) es el agente más usado en el análisis de aminoácidos. Sin embargo, en lugar de ser analizados como derivados de la feniltiohidantoína, como ocurre durante la secuenciación de péptidos, los aminoácidos son analizados como derivados de la feniltiourea por espectrofotometría ultravioleta (240-255 nm) [37,55]. Es decir, conforme con los porcentajes de recuperación obtenidos se puede considerar que el método analítico es selectivo y exacto.

3.1.3. Precisión

Para estudiar la precisión del método analítico, tanto en la repetibilidad como en la precisión intermedia, se consideró el uso de la desviación estándar relativa (RSD) como parámetro de evaluación [47-49].

Con respecto a la repetibilidad, el primer análisis se realizó utilizando los resultados alcanzados en el estudio de exactitud, y como se puede observar en la Tabla 3.6 se obtuvo una desviación estándar relativa promedio igual a 1.82%, la cual está por debajo del límite aceptable. No obstante, se creyó pertinente revalidar el ensayo de repetibilidad tomando en consideración las lecturas de absorbancia. A continuación, en la Tabla 3.7 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3.7. Resultados de repetibilidad

Muestra	Absorbancia			Promedio	SD	RSD (%)
	R ₁	R ₂	R ₃			
Suplemento C	0.160	0.165	0.170	0.165	5.00x10 ⁻³	3.02
Suplemento C fortificado	0.188	0.182	0.192	0.188	5.03x10 ⁻³	2.68
Suplemento H	0.248	0.244	0.235	0.243	6.66x10 ⁻³	2.74
Suplemento H fortificado	0.271	0.261	0.263	0.265	5.29x10 ⁻³	1.99
Suplemento O	0.260	0.256	0.262	0.260	3.06x10 ⁻³	1.18
Suplemento O fortificado	0.285	0.282	0.280	0.283	2.52x10 ⁻³	0.89
RSD promedio = 2.09%						

Para el análisis de la precisión intermedia se prepararon estas mismas muestras, en distintos días, pero se leyeron en el mismo espectrofotómetro y por el mismo analista. Los datos se muestran en la Tabla 3.8.

En las Tablas 3.7 y 3.8 se puede apreciar que la desviación estándar relativa promedio calculada es inferior al 3%, 2.09% para la repetibilidad y 2.03% para la precisión intermedia. Es decir, existe un alto grado de correlación o cercanía entre los valores de absorbancia de los análisis intra e interdía.

En adición a los resultados antes expuestos, se consideró oportuno emplear los datos de las Tablas 3.7 y 3.8 para un análisis de varianza, por medio de la prueba F, de las lecturas de absorbancia medidas en un mismo día y entre días. Además, se creyó adecuado determinar, con la prueba de t de Student, si existe una diferencia significativa entre los valores de absorbancia promedio de los análisis intra e interdía. Los resultados se resumen en la Tabla 3.9, sin embargo, los detalles de las pruebas estadísticas realizadas se encuentran en el Anexo 1.

Tabla 3.8. Resultados de precisión intermedia

		Suplemento C	Suplemento C fortificado	Suplemento H	Suplemento H fortificado	Suplemento O	Suplemento O fortificado
Absorbancia	Día 1	0.176	0.192	0.254	0.266	0.262	0.280
	Día 2	0.175	0.197	0.242	0.277	0.249	0.272
	Día 3	0.171	0.199	0.246	0.272	0.255	0.281
	Promedio	0.174	0.196	0.248	0.272	0.256	0.278
	SD	2.65×10^{-3}	3.61×10^{-3}	6.11×10^{-3}	5.51×10^{-3}	6.51×10^{-3}	4.93×10^{-3}
	RSD	1.52	1.84	2.47	2.02	2.54	1.77
RSD promedio = 2.03%							

Tabla 3.9. Pruebas t y F para los análisis intra e interdía

	Suplemento C		Suplemento C forticado		Suplemento H		Suplemento H forticado		Suplemento O		Suplemento O forticado	
	Intradía	Interdía	Intradía	Interdía	Intradía	Interdía	Intradía	Interdía	Intradía	Interdía	Intradía	Interdía
Absorbancia	0.160	0.176	0.188	0.192	0.248	0.254	0.271	0.266	0.260	0.262	0.285	0.280
	0.165	0.175	0.182	0.197	0.244	0.242	0.261	0.277	0.256	0.249	0.282	0.272
	0.170	0.171	0.192	0.199	0.235	0.246	0.263	0.272	0.262	0.255	0.280	0.281
Promedio	0.165	0.174	0.188	0.196	0.243	0.248	0.265	0.272	0.260	0.256	0.283	0.278
SD	5.00 $\times 10^{-3}$	2.65 $\times 10^{-3}$	5.03 $\times 10^{-3}$	3.61 $\times 10^{-3}$	6.66 $\times 10^{-3}$	6.11 $\times 10^{-3}$	5.29 $\times 10^{-3}$	5.51 $\times 10^{-3}$	3.06 $\times 10^{-3}$	6.51 $\times 10^{-3}$	2.52 $\times 10^{-3}$	4.93 $\times 10^{-3}$
SD²	2.50 $\times 10^{-5}$	7.00 $\times 10^{-6}$	2.53 $\times 10^{-5}$	1.30 $\times 10^{-5}$	4.43 $\times 10^{-5}$	3.73 $\times 10^{-5}$	2.80 $\times 10^{-5}$	3.03 $\times 10^{-5}$	9.33 $\times 10^{-6}$	4.23 $\times 10^{-5}$	6.33 $\times 10^{-6}$	2.43 $\times 10^{-5}$
F_{exp} < F_{tab} (0.05; 2,2)	3.57 < 19.0		1.95 < 19.0		1.19 < 19.0		1.08 < 19.0		4.54 < 19.0		3.84 < 19.0	
t_{exp} < t_{tab} (0.05, 4)	1.84 < 2.78		1.62 < 2.78		0.64 < 2.78		1.01 < 2.78		0.64 < 2.78		0.97 < 2.78	

La prueba F debe su importancia al uso de ella cuando se quieren comparar dos varianzas de poblaciones normales [56]. Los resultados que se muestran en la Tabla 3.9 indican, por un lado, que el método analítico propuesto es preciso e independiente del día que se haga el análisis, ya que el valor de F experimental resultó ser inferior al valor crítico en cada una de las muestras analizadas, esto con una probabilidad de 0.05. Por otro lado, se pudo confirmar, con un 95% de confianza, que no existen diferencias significativas entre los valores de absorbancia promedio de las muestras analizadas en un solo día y en diferentes días.

Todos los resultados expuestos indican que el método analítico propuesto es preciso y puede ser aplicado con seguridad y eficiencia.

3.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Un total de quince suplementos dietéticos que contienen glucosamina, en distintas formulaciones y presentaciones, fueron evaluados por triplicado a través del método analítico validado. Los suplementos analizados presentan, además de glucosamina, otros ingredientes dietéticos como: sulfato de condrotina, MSM, vitaminas, minerales, hierbas medicinales, aminoácidos, entre otros.

En la Tabla 3.10 se indican las medidas de absorbancia de cada una de las muestras empleadas en este estudio. Para obtener el verdadero valor de absorbancia fue necesario hacer la corrección del blanco.

Tabla 3.10. Valores de absorbancia de muestras analizadas

Muestra	R ₁	R ₂	R ₃	Promedio	SD	RSD (%)
Suplemento A	0.226	0.224	0.231	0.227	3.61x10 ⁻³	1.59
Suplemento B	0.211	0.214	0.220	0.215	4.58x10 ⁻³	2.13
Suplemento C	0.160	0.165	0.170	0.165	5.00x10 ⁻³	3.03
Suplemento D	0.155	0.158	0.162	0.158	3.51x10 ⁻³	2.22
Suplemento E	0.208	0.212	0.215	0.212	3.51x10 ⁻³	1.66
Suplemento F	0.237	0.227	0.234	0.233	5.13x10 ⁻³	2.21
Suplemento G	0.132	0.135	0.130	0.132	2.52x10 ⁻³	1.90
Suplemento H	0.248	0.244	0.235	0.242	6.66x10 ⁻³	2.75
Suplemento I	0.252	0.255	0.265	0.257	6.81x10 ⁻³	2.65
Suplemento J	0.206	0.212	0.208	0.209	3.06x10 ⁻³	1.46
Suplemento K	0.242	0.238	0.230	0.237	6.11x10 ⁻³	2.58
Suplemento L	0.244	0.252	0.256	0.251	6.11x10 ⁻³	2.44
Suplemento M	0.256	0.250	0.257	0.254	3.79x10 ⁻³	1.49
Suplemento N	0.242	0.230	0.237	0.236	6.03x10 ⁻³	2.55
Suplemento O	0.260	0.256	0.262	0.259	3.06x10 ⁻³	1.18
RSD promedio = 2.12%						
Absorbancia promedio del blanco = 0.056						

El ensayo en blanco se realizó en forma paralela y bajo las mismas condiciones experimentales seguidas para los ensayos en blanco de las soluciones de trabajo, es decir, una vez por día y durante tres días consecutivos. En este caso, el volumen de la solución patrón blanco utilizado fue 2 ml aforados a un volumen de 10 ml, esto por cuanto las muestras se diluyen en ese sentido. Los resultados se presentan en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Valores de absorbancia de ensayos en blanco para muestras

	Absorbancia			Promedio	SD	RSD (%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
Blanco	0.056	0.056	0.055	0.056	5.77x10 ⁻⁴	1.04

Como se puede apreciar en las Tablas 3.10 y 3.11, los valores de desviación estándar relativa (RSD) permanecen por debajo del límite aceptable (3%), lo que evidencia una buena repetibilidad entre los resultados analíticos individuales de cada muestra y por supuesto de los ensayos en blanco.

Una vez conocidas las absorbancias reales de las muestras analizadas se procedió a calcular la cantidad de glucosamina presente en cada una de ellas. A continuación, en la Tabla 3.12 se muestran los resultados del análisis de glucosamina en los quince suplementos dietéticos ensayados. Como observa en la tabla, se compara el promedio de glucosamina encontrada con la cantidad esperada, obteniéndose de esta manera un porcentaje de glucosamina en la muestra.

Para obtener la concentración verdadera de glucosamina en las muestras se tomó en consideración la dilución 1:5 realizada al derivado. Mientras que la cantidad de glucosamina esperada se obtiene relacionando el peso molecular de la glucosamina y el sulfato/clorhidrato de glucosamina con la cantidad de glucosamina pesada. Los detalles de los cálculos efectuados para determinar la concentración de glucosamina en las muestras y la cantidad esperada se encuentran en el Anexo 1.

Tabla 3.12. Análisis del contenido real de glucosamina en suplementos dietéticos que contienen sulfato/clorhidrato de glucosamina

Muestra	Glucosamina en muestra (mg)			Promedio (mg)	Cantidad esperada (mg)	Porcentaje encontrado (%)	RSD (%)
	R ₁	R ₂	R ₃				
Suplemento A	38.8	38.4	39.6	39.0	39.3	99.2	1.56
Suplemento B	36.3	36.8	37.8	36.9	39.3	94.1	2.08
Suplemento C	27.7	28.5	29.4	28.5	39.3	72.7	2.94
Suplemento D	26.9	27.4	28.0	27.4	39.3	69.8	2.15
Suplemento E	35.8	36.4	36.9	36.4	39.3	92.6	1.62
Suplemento F	40.6	39.0	40.1	39.9	39.3	102	2.16
Suplemento G	23.0	23.5	22.7	23.0	39.3	58.7	1.84
Suplemento H	42.5	41.8	40.3	41.5	41.6	99.9	2.69
Suplemento I	43.2	43.7	45.3	44.0	41.6	106	2.60
Suplemento J	35.4	36.4	35.8	35.9	41.6	86.3	1.43
Suplemento K	41.5	40.8	39.5	40.6	41.6	97.6	2.53
Suplemento L	41.8	43.2	43.8	42.9	41.6	103	2.47
Suplemento M	43.8	42.8	44.0	43.5	41.6	105	1.46
Suplemento N	41.5	39.5	40.6	40.5	41.6	97.5	2.50
Suplemento O	44.5	43.8	44.8	44.4	50.0	88.8	1.16
Porcentaje de glucosamina promedio = 91.5%							
RSD promedio = 2.07%							
t_{exp} > t_{tab} (0.05, 14) = 42.17 > 1.76							

En la Figura 3.2 se grafica el porcentaje de glucosamina encontrado en los quince suplementos dietéticos analizados. Como se puede ver en la figura, en algunos productos la cantidad determinada fue significativamente diferente de la expuesta en la etiqueta, con desviaciones desde 58.7 hasta 106%. Estos resultados ponen en evidencia las inconsistencias que existen en los suplementos dietéticos con el porcentaje de principio activo sugerido en la etiqueta y el contenido real presente [4,28,41,57-61].

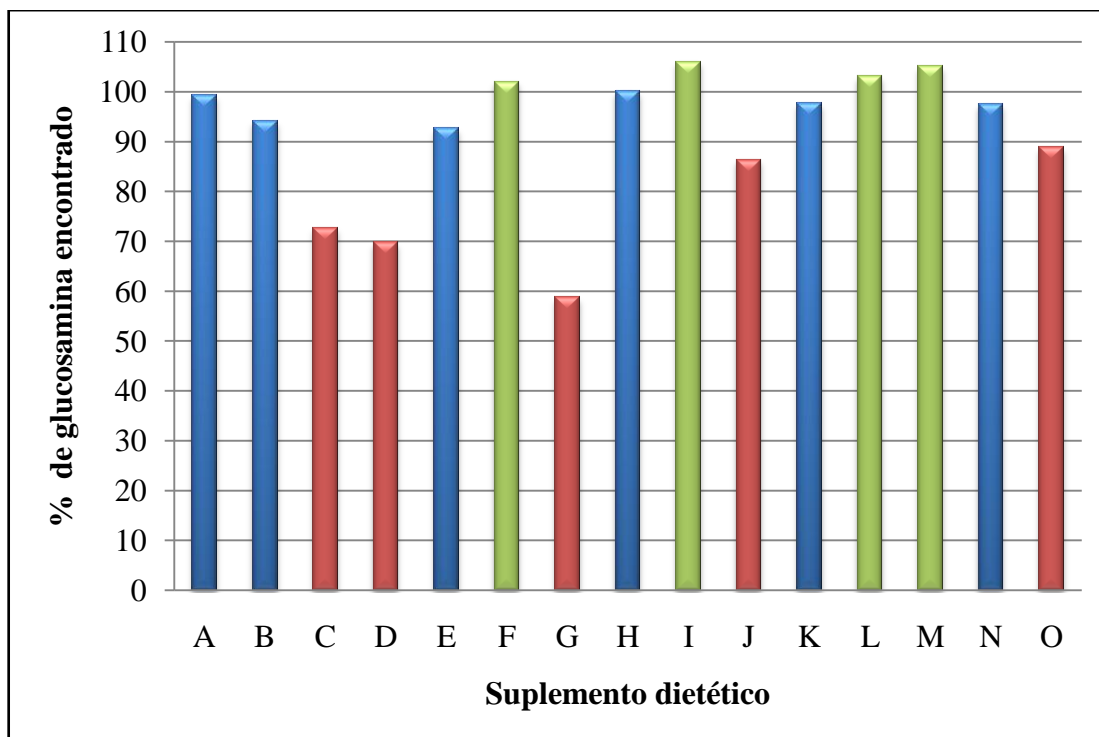


Figura 3.2. Porcentaje de glucosamina determinado en quince suplementos dietéticos que contienen sulfato/clorhidrato de glucosamina

Conforme con los resultados de la Tabla 3.12 y Figura 3.2, de los quince suplementos dietéticos ensayados, cinco (C, D, G, J y O) presentan menos del 90% del contenido de glucosamina propuesto en la etiqueta; de estos, tres productos (C, D y G) contienen menos del 80% de lo establecido. En cuatro suplementos (F, I, L y M) se halló un porcentaje algo superior a lo manifestado en la etiqueta. El resto de productos (A, B, E, H, K y N) muestran un porcentaje de glucosamina entre 90 y 100%.

En la Tabla 3.12 se exhibe el porcentaje de glucosamina promedio de las muestras analizadas (91.5%). Es parte primordial de este trabajo determinar si efectivamente existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos y lo establecido en la etiqueta. Es así que por medio de la prueba t de Student, se compara el porcentaje promedio de glucosamina encontrado con el porcentaje ideal, para una probabilidad de 0.05 y 14 grados

de libertad (ver Tabla 3.12 y Anexo 1).

Al aplicar esta prueba estadística se obtuvo un valor t experimental mayor al tabulado, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque existen diferencias significativas entre la cantidad de glucosamina encontrada y la etiquetada en el producto. En este caso, el hecho de usar el contraste de una cola implica que nos interesa sobremanera el sentido en que difiere la media del valor nominal, es decir, si la diferencia es por exceso o defecto, ya que existe un mayor perjuicio económico y en la salud si la diferencia es negativa, como lo es en este caso.

A pesar de que no existen pruebas científicas determinantes para escoger entre las distintas formas de glucosamina y obtener un mayor beneficio terapéutico, es primordial considerar el tipo de glucosamina administrada ya que la cantidad real de principio activo en las formulaciones varía de acuerdo al tamaño de la sal formada [25].

Como se pudo analizar en la Tabla 1.1, el derivado clorhidrato tiene una pureza mayor al 99%, en comparación con el 75 y 79.5% de las formas sulfato, las cuales necesitan sodio y potasio para su estabilidad, respectivamente. No obstante, el porcentaje en peso de glucosamina en la forma clorhidrato es de 83.1%, en la forma sulfato estabilizada con sodio es 62.7% y en la forma sulfato estabilizada con potasio es de tan sólo 59.5%. Esto se traslada en una dosis aproximada diaria de 1246, 940.5 y 892.5 mg de glucosamina por cada 1500 mg de formulación, respectivamente. Por lo tanto, es importante determinar la concentración de glucosamina presente en forma de base libre en los distintos suplementos dietéticos, ya que a pesar de que ciertas muestras cumplen con la cantidad de sulfato/clorhidrato de glucosamina etiquetada, no se está administrando la dosis de ingrediente activo sugerida por profesionales, que recomiendan 1500 mg por día [25,62].

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El “Análisis de la cantidad real de glucosamina contenida en varios suplementos dietéticos por espectrofotometría ultravioleta (UV)” permite llegar a las siguientes conclusiones y recomendaciones:

4.1. CONCLUSIONES

- ❖ Después de analizar quince suplementos dietéticos que contienen glucosamina en distintas formulaciones y presentaciones, se establece que existe una diferencia significativa en la cantidad de principio activo determinada y la indicada por el fabricante en la etiqueta.
- ❖ En términos de porcentaje, únicamente dos suplementos (A y H) cumplen con lo etiquetado, con cantidades de glucosamina de $99.2\% \pm 1.56$ y $99.9\% \pm 2.69$, respectivamente; los trece productos restantes presentan concentraciones de glucosamina entre 58.7 y 106%.
- ❖ La cantidad real de ingrediente activo varía de acuerdo al tipo de sal presente en la formulación. En este mismo sentido, las formas sulfato y clorhidrato de glucosamina difieren en su pureza como sales, porque la primera necesita de sodio o potasio para alcanzar una estabilidad y poder ser comercializada.

- ❖ La mayoría de suplementos con glucosamina avalados tanto por instituciones internacionales como por laboratorios farmacéuticos, independientemente de su formulación y presentación, no siguen las Buenas Prácticas de Manufactura.
- ❖ El método analítico propuesto para determinar la cantidad de glucosamina en suplementos dietéticos utilizando espectrofotometría ultravioleta (UV), cumple con los parámetros mínimos de linealidad, exactitud, selectividad y precisión.
- ❖ Se estableció que el método es lineal en el intervalo de concentraciones comprendido entre 2.5 y 22 $\mu\text{g/ml}$ del derivado 2-desoxi-2-(3-feniltioureido)-D-glucopiranosas, basado en el coeficiente de correlación igual a 0.9997.
- ❖ El método es exacto y específico para análisis de glucosamina en presencia de excipientes así como demás ingredientes dietéticos, conforme el porcentaje de recuperación promedio (97.0%) está dentro de los criterios de aceptación.
- ❖ El método en estudio es preciso y puede ser aplicado con seguridad ya que los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia alcanzan valores de desviación estándar relativa (RSD) menores al 3%.

4.2. RECOMENDACIONES

- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos es recomendable adquirir productos de las marcas: Sandoz S.A. y Nature Made. Sin embargo, a pesar de que estas muestras cumplen con la cantidad de sulfato/clorhidrato de glucosamina etiquetada, no se está

administrando la cantidad de ingrediente activo sugerida por profesionales (1500 mg por día).

- ✓ Se pueden consumir suplementos de las marcas: Procaps S.A., Kirkland Signature, Berkley&Jensen y Schiff Nutrition, ya que presentan un porcentaje de glucosamina superior al manifestado en la etiqueta, que es relativamente aceptable según la consideración antes mencionada.
- ✓ No es aconsejable comprar productos de las marcas: Biogenet S.A, Bronson Laboratories, Spring Valley y Diet Market, pues contienen menos del 90% de glucosamina establecida en la etiqueta.
- ✓ Las personas que compran este tipo de suplementos dietéticos deben reconocer el tipo de glucosamina que están consumiendo porque la pureza, biodisponibilidad y equivalencia de dosis varía según el tipo de sal presente.
- ✓ Se recomienda emplear el método analítico propuesto para análisis rutinario de glucosamina en suplementos dietéticos ya que es rápido, sencillo y económico, en comparación con métodos cromatográficos mucho más costosos y que demandan mayor tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Institute of Medicine and National Research Council of the National Academies, (2005). *Dietary supplements: a framework for evaluating safety*, United States.
2. Martin, C. (2004). *Glucosamine: Review of its effectiveness in treating knee osteoarthritis*. Reporte de investigación, Workers' Compensation Board of BC Evidence Based Practice Group, WorkSafeBC, Canadá.
3. Cargill, (2004). *GRAS notification for RegenasureTM Glucosamine Hydrochloride*. United States.
4. Adebowale, A., Cox, D., Liang, Z. y Eddington, N. (2000). Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials, *The Journal of American Nutraceutical Association*, Vol. 3, No. 1, pp 37-44.
5. Farreras, V. (2000). *Medicina interna*, 14^{ta} edición, Harcourt, S.A., España.
6. Harrison, T. (2006). *Principios de medicina interna*, 16^{ta} edición, McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., Chile.
7. Ministerio de Salud y Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas, (2007). *Glucosamina sulfato*. Perú.

8. VitaBasix, (2008). Descripción del producto: glucosamina, http://www.vitabasix.com/fileadmin/content/produktInfoPDFs/esPDF/Produktinfo_Glucosamin_ES.pdf, 24 de mayo de 2010.
9. Mirzayan, R. (2006). *Cartilage injury in the athlete*, Thieme Medical Publishers, Inc., United States.
10. Holistic Health Tools, (2002). JAMA report on glucosamine and chondroitin, <http://www.holistichealthtools.com/jama.html>, 24 de mayo de 2010.
11. Eddington, N., Lee, M., Ramey, D. y Thonar, E. (2002). An analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in oral joint supplement products marketed to horse owners, *Journal of Equine Veterinary Science*, Vol. 22, No. 3, pp 25-27.
12. National Center for Complementary and Alternative Medicine, NCCAM, (2009). *Using dietary supplements wisely*. United States.
13. Diet Health, (2004). Glucosamine, <http://www.diet.com/g/glucosamine>, 27 de julio de 2010.
14. Linoflax, (2008). Glucosamina, <http://www.linoflax.com/glucosamina/glucosamina.htm>, 27 de julio de 2010.
15. García, M. (2009). *Salud Articular. Apoyo nutricional y fitoterapia*, El Mundo del Bienestar, S.A., España.

16. Elkins, R. (1997). *Glucosamine sulfate and chondroitin sulfate*, Woodland Publishing, United States.
17. National Institutes of Health, (2010). Glucosamine sulfate, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/807.html>, 21 de diciembre de 2010.
18. Johns, M. and Tracy, T. (2003). *Dietary supplements toxicology and clinical pharmacology*, Humana Press, Inc., United States.
19. Adaptógenos Internacionales, (2008). Sulfato de glucosamina y Sulfato de condroitin, http://www.adaptogeno.com/productos/sulfato_gluco_condro.asp, 27 de julio de 2010.
20. Radi, R. (2009). *Artrosis y degeneración del cartílago articular. Mecanismo de acción del condroitín sulfato y glucosamina en la protección y reparación del cartílago*. Reporte de investigación, Departamento Médico de Gramón Bagó de Uruguay, Uruguay.
21. Council for Responsible Nutrition, CRN, (2005). *Glucosamine, Chondroitin and Joint Health*. United States.
22. United States Pharmacopeia, USP, (2006). *Dietary supplement lexicon*. United States.
23. García, M. y Quesada, S. (2004). *Artritis reumatoide fisiología y tratamiento*. Reporte de investigación, Centro Nacional de Información de Medicamentos, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

24. Talbott, S. and Hughes, K. (2007). *The health professional's guide to dietary supplements*, Lippincott Williams & Wilkins, United States.
25. Coates, P., Blackman, M., Cragg, G., Levine, M., Moss, J. and White, J. (2005). *Encyclopedia of dietary supplements*, 1st edition, Marcel Dekker, United States.
26. International Marketing & Communication, IM&C, (2006). *Evidencia científica en artrosis*. España.
27. Barrow, C. and Shahidi, F. (2008). *Marine nutraceuticals and functional foods*, CRC Press, United States.
28. Asamoah, R. (2008). *Determination of glucosamine in drug formulation*. Master of Science Thesis (Pharmaceutical Analysis and Quality Control), Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Ghana.
29. Arthritis Foundation, (2009). Glucosamina y Sulfato de condroitina, <http://www.arthritis.org/espanol/terapias-alternativas-complementarias-glucosamina.php>, 3 de agosto de 2010.
30. Guía de suplementos, (2007). Glucosamina, <http://guiadesuplementos.org/glucosamina.htm>, 31 de julio de 2010.
31. Instituto Químico Biológico, (2000). Glucosamina, <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/g013.htm>, 26 de julio de 2010.

32. Facultad de Medicina UNAM, (2004). Vartalon compositum, http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/36505.htm, 21 de diciembre de 2010.
33. Farmacias Ahumada, (2009). Flexure, <http://www.farmaciasahumada.cl/fasaonline/fasa/MFT/PRODUCTO/P6429.HTM>, 21 de diciembre de 2010.
34. Alyaa, I. y Fakhreddin, J. (2010). Improved Sensitive High Performance Liquid Chromatography Assay for Glucosamine in Human and Rat Biological Samples with Fluorescence Detection, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, Vol. 13, No. 2, pp 128-135.
35. Surridge, B., Gottschak, R., Ma, M., Powell, K. y Jin, C. (2002). Determination of Glucosamine in Health Supplements by LC-MS, Direct HPLC-ELSD, and Precolumn OPA Derivatization HPLC-UV, *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, Vol. 4, No. S1.
36. Sánchez, F. (2004). *Evaluación de las características químicas y nutricionales de maíces de color cultivados en el estado de Puebla*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de las Américas Puebla, México.
37. Burriel, O. Salavera, D. y Gimeno, V. (2003). Análisis del contenido aminoacídico de los alimentos con fines nutricionales, <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EpyuVFuZuFPEPxsPZH.php>, 09 de septiembre de 2010.

38. Wu, Y., Hussain, M. y Fassihi, R. (2005). Development of a simple analytical methodology for determination of glucosamine release from modified release matrix tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 38, No. 1, pp 263-269.
39. Appuhn, A., Georg, R., Raubuch, M., Scheller, E. y Wilke, B. (2004). The automated determination of glucosamine, galactosamine, muramic acid, and mannosamine in soil and root hydrolysates by HPLC, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Vol. 167, No. 1, pp 17-21.
40. Skyba, O. (2006). *Chitin and ergosterol assays as methods for quantitative characterisation of colonization by wood decay fungi*. Reporte de investigación, Swiss Federal Laboratories of Material Testing and Research (EMPA), Suiza.
41. Gaonkar, P., Khanvilkar, V., Shettigar, R. y Gadgoli C. (2006). Spectrophotometric method for determination of glucosamine in tablets, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 68, No. 1, pp 83-84.
42. CATLAB, (1994). AccQ - Tag de Waters, http://www.catlab.com.ar/imprimir_art.php?accion=imprimir&idm=45, 09 de septiembre de 2010.
43. Callejón, R. (2006). *Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales*. Reporte de investigación, Universidad de Sevilla, España.

44. Shahabi, M., Janmaleki M., Reza, H. y Masoumi, J. (2010). Chitosan preparation from persian gulf shrimp shells and investigating the effect of time on the degree of deacetylation, *Journal of Paramedical Sciences*, Vol. 1, No. 2, pp 1-7.
45. Zumbado, H. (2002). *Análisis químicos de los alimentos. Métodos Clásicos*. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba.
46. Hirata, M. (2006). ¿Por qué validar métodos analíticos?, <http://www.scribd.com/doc/4925527/porque-validar-metodos-analiticos>, 01 de enero de 2011.
47. Ministerio de Salud de Costa Rica, (1998). Guía de validación de métodos analíticos, <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>, 18 de octubre de 2010.
48. Suárez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F. y Hernández, G. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario, *Avances en Química*, Vol. 4, No.2, pp 53-62.
49. López, A., Felizola, A., Hernández, V. y Cuartero, T. (2005). Validación de un método analítico espectrofotométrico para cuantificar glibenclamida en tabletas de 5 mg, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 36, No. 3, pp 33-41.
50. Castillo, B. y González, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos, *Revista Cubana de Farmacia*, Vol. 30, No. 1.

51. Organismo Uruguayo de Acreditación, OUA, (2010). *Directriz para validación de métodos de ensayo*. Uruguay.
52. Hernández, L. y González, C. (2002). *Introducción al análisis instrumental*, 1ª edición, Ariel Ciencia, S.A., España.
53. Skoog, D., Holler, J., y Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, 5ª edición, Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A., España.
54. Jurado, M. (2008). *Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos*. Reporte de investigación, Universidad de Sevilla, España.
55. Wade, G. y Wade, R. (1993). *Química Orgánica*, 2ª edición, Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., México.
56. Bartés, A., Tort-Martorell, X., Grima, P., Pozueta, L. y Solé, I. (1998). *Métodos estadísticos. Control y mejora de la calidad*, 1ª edición, Ediciones de la Universidad Politécnica de Catalunya, España.
57. Yamaguchi, T., Inoue, M., Miyachi, K., Tominaga, H. y Fujita, Y. (2004). Spectrophotometric determination of glucosamine and its analogous amino sugars with *o*-hydroxyhydroquinonephthalein and palladium (II), *Analytical Sciences*, Vol. 20, pp 387-389.
58. Chen, J., Lee, C., Cheng, T., Hsiao, H. y Chen, R. (2006). Determination of glucosamine content in nutraceuticals by capillary electrophoresis using in-capillary

OPA labeling techniques, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 14, No. 2, pp 203-206.

59. Zhou, J., Waszkuc, T. y Mohammed, F. (2005). Determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by High Performance Liquid Chromatography with FMOC-Su derivatization: Collaborative Study, *Journal of AOAC International*, Vol. 88, No. 4, pp 1048-1058.
60. Kornfeld, R., Hanko, V. y Rohrer, J. (2008). *A rapid method for determining glucosamine in dietary supplements using HPLC-PAD*. Reporte de investigación, Dionex Corporation, Estados Unidos.
61. Abdullah, O. y Barakat, S. (2005). Spectrophotometric determination of glucosamine and mannitol with 4-amino-5-hydrazino-4h[1,2,4]-triazole-3-thiol in pharmaceutical formulations, *Saudi Pharmaceutical Journal*, Vol. 13, No. 4, pp 185-191.
62. Comité de Redacción Científica de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica, (2004). Avances recientes en la suplementación con glucosamina y condroitina, <http://www.bago.com/bago/bagoarg/biblio/artweb10.htm>, 21 de enero de 2011.

ANEXO 1

CÁLCULOS

1.1. PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

1.1.1. Preparación de la solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml)

En el Capítulo 1 se hizo referencia al sulfato de glucosamina como una sal inestable, por lo que necesita de sales de sodio y potasio para disminuir sus propiedades higroscópicas y estabilizarlo. En este mismo sentido, es importante mencionar que el estándar de sulfato de glucosamina utilizado tiene una pureza de 76.14%, como se puede evidenciar en el Anexo 2.

Considerando esta información, a continuación se indica el cálculo efectuado para determinar la cantidad exacta de estándar de sulfato de glucosamina que se debe pesar para preparar la solución patrón de concentración igual a 1.0 mg/ml.

76.14 g de sulfato de glucosamina → 100 g de estándar de sulfato de glucosamina

250 mg de sulfato de glucosamina → X_1

$X_1 = 328.3$ mg de estándar de sulfato de glucosamina

1.1.2. Corrección de la concentración de glucosamina en solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml)

Como se mencionó en el Capítulo 2, es necesario realizar la corrección de la concentración de la solución patrón de sulfato de glucosamina (1.0 mg/ml), en forma de base libre, ya que el propósito de esta investigación es analizar el contenido real de glucosamina en suplementos dietéticos, independientemente de la formulación en la que esté presente. A continuación se realiza el cálculo para determinar la concentración de glucosamina en la solución patrón.

179.2 g de glucosamina (PM) \rightarrow 228.2 g de sulfato de glucosamina (PM)

X_2 \rightarrow 1.0 mg de sulfato de glucosamina

$X_2 = 0.7853$ mg de glucosamina

Solución patrón de glucosamina: 0.7853 mg/ml \approx 0.7853 g/l

1.1.3. Determinación de la concentración del derivado en solución patrón

Es fundamental determinar la concentración exacta de la solución patrón del derivado porque a partir de ella se preparan las soluciones de trabajo empleadas para elaborar la curva de calibración y analizar la linealidad del método en estudio. En seguida se detallan la serie de cálculos efectuados para determinar la concentración del derivado 2-desoxi-2-(3-feniltioureido)-D-glucopiranososa en la solución patrón.

1 mol de glucosamina \rightarrow 179.2 g

$X_3 \rightarrow$ 0.7853 g

$X_3 = 4.382 \times 10^{-3}$ mol/l (M)

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_1 \times 25 \text{ ml} = 4.382 \times 10^{-3} \text{ M} \times 4 \text{ ml}$$

$$C_1 = 7.011 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$C_3 \times V_3 = C_4 \times V_4$$

$$C_3 \times 50 \text{ ml} = 7.01 \times 10^{-4} \text{ M} \times 5 \text{ ml}$$

$$C_3 = 7.011 \times 10^{-5} \text{ M}$$

1 mol del derivado \rightarrow 314.4 g

7.011×10^{-5} mol del derivado $\rightarrow X_4$

$X_4 = 22 \times 10^{-3} \text{ g/l} = 22 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Solución patrón del derivado: 22 $\mu\text{g/ml}$

1.1.4. Preparación de las soluciones de trabajo

A continuación se presenta la ecuación utilizada para determinar el volumen de solución patrón del derivado necesario para preparar las distintas soluciones de trabajo.

$$\text{Solución patrón (ml)} = \frac{\text{concentración de solución de trabajo } (\mu\text{g/ml}) \times \text{volumen de aforo (ml)}}{\text{concentración de solución patrón } (\mu\text{g/ml)}} \quad (\text{A.1})$$

Los resultados de los cálculos se resumen en la Tabla 2.2.

1.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

En primer lugar, es importante conocer la cantidad de muestra (M) que se debe pesar para obtener un equivalente a 50 mg de clorhidrato/sulfato de glucosamina, para ello se emplea la Ecuación A.2:

$$M \text{ (mg)} = \frac{\text{contenido/peso de muestra (mg)} \times 50 \text{ mg sulfato/clorhidrato de glucosamina}}{\text{sulfato/clorhidrato de glucosamina etiquetada (mg)}} \quad (\text{A.2})$$

Para cuantificar la cantidad real de glucosamina, en forma de base libre, presente en cada una de las muestras ensayadas se utiliza la siguiente ecuación:

$$y = 168 x + 0.0870 \quad (\text{A.3})$$

Donde, y, representa la cantidad real de glucosamina (mg) en 50 mg de sulfato/clorhidrato de glucosamina pesada y, x, representa la absorbancia que presenta la muestra.

Esta ecuación deriva, en primer lugar, del cálculo de la cantidad total de derivado formado, por medio de la ecuación de regresión lineal y el factor de dilución; y en segundo lugar, de una regresión del cálculo efectuado para determinar la concentración de la solución patrón del derivado (ver numeral 1.1.3).

En este mismo sentido, para calcular la cantidad de glucosamina esperada (GE), se relaciona el peso molecular de la glucosamina y el sulfato/clorhidrato de glucosamina con la cantidad de sulfato/clorhidrato de glucosamina pesada, a través de la Ecuación A.4:

$$GE \text{ (mg)} = \frac{PM \text{ de glucosamina (g)} \times 50 \text{ mg sulfato/clorhidrato de glucosamina}}{PM \text{ de sulfato/clorhidrato de glucosamina (g)}} \quad (\text{A.4})$$

Finalmente, para calcular el porcentaje de glucosamina en los suplementos dietéticos analizados se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de glucosamina en muestra} = \frac{\text{glucosamina cuantificada (mg)}}{\text{glucosamina esperada (mg)}} \times 100 \quad (\text{A.5})$$

1.3. PRUEBA T DE STUDENT

La prueba t de Student ayuda a pronosticar la probabilidad de que dos promedios pertenezcan a una misma población (en el caso que las diferencias no sean significativas) o que provengan de distintas poblaciones (en el caso que las diferencias de promedios sean significativas).

El modelo matemático que en seguida se presenta, corresponde a dos muestras independientes:

$$t_{\text{exp}} = \frac{x_1 - x_2}{S_p} \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \times n_2}} \quad (\text{A.6})$$

Donde, t_{exp} = valor estadístico de la prueba t

x_1 = valor promedio del grupo 1

x_2 = valor promedio del grupo 2

S_p = desviación estándar ponderada de ambos grupos

n_1 = tamaño de la muestra del grupo 1

n_2 = tamaño de la muestra del grupo 2

La ecuación para obtener la desviación estándar ponderada es:

$$S_p = \sqrt{\frac{[(n_1-1) \times s_1^2] + [(n_2-1) \times s_2^2]}{n_1+n_2-2}} \quad (\text{A.7})$$

Donde, S_p = desviación estándar ponderada de ambos grupos
 s_1^2 = desviación estándar al cuadrado (varianza) del grupo 1
 s_2^2 = desviación estándar al cuadrado (varianza) del grupo 2
 n_1 = tamaño de la muestra del grupo 1
 n_2 = tamaño de la muestra del grupo 2

La prueba t también debe su importancia al uso de ella en la comparación del valor promedio de una muestra con un valor tomado como referencia (valor verdadero).

A continuación se indica la ecuación para calcular la prueba t en este caso:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n} \quad (\text{A.8})$$

Donde, t_{exp} = valor estadístico de la prueba t
 \bar{x} = valor promedio de la muestra
 μ = valor verdadero
 s = desviación estándar
 n = tamaño de la muestra

En la Tabla A.1 se presentan parte de los valores críticos para calcular la prueba t:

Tabla A.1. Parte de valores críticos de la prueba t

Grados de libertad	Probabilidad, p				
	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	3.08	6.31	12.71	31.82	63.66
2	1.89	2.92	4.30	6.96	9.92
3	1.64	2.35	3.18	4.54	5.84
4	1.53	2.13	2.78	3.75	4.60
5	1.48	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.44	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.42	1.90	2.36	3.00	3.50
8	1.40	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.38	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.37	1.81	2.23	2.76	3.17
11	1.36	1.80	2.20	2.72	3.11
12	1.36	1.78	2.18	2.68	3.06
13	1.35	1.77	2.16	2.65	3.01
14	1.34	1.76	2.14	2.62	2.98

Los grados de libertad representan el tamaño de la muestra menos uno, y la probabilidad, p, que se usó fue 0.05, que representó el 95% de confianza. El criterio para aceptar que no existen diferencias significativas entre los dos promedios \bar{o} , entre el valor promedio y el valor nominal, fue: si el valor t_{exp} es menor que t_{tab} (ver Tabla A.1).

1.4. PRUEBA F DE SNEDECOR-FISHER

La prueba F de Snedecor-Fisher es una herramienta estadística empleada para la comparación de varianzas de dos métodos analíticos, laboratorios, analistas. etc. El análisis de varianza también se utiliza para calcular la precisión intermedia de un método cuando se analizan muestras de referencia en distintos días.

En seguida se indica la ecuación y tabla para calcular la prueba F:

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{A.9})$$

Donde, F_{exp} = valor estadístico de la prueba F

s_1^2 = desviación estándar al cuadrado (varianza) de mayor valor

s_2^2 = desviación estándar al cuadrado (varianza) de menor valor

Tabla A.2. Parte de valores críticos de la prueba F (p=0.05)

		Grados de libertad en el numerador				
		1	2	3	4	5
Grados de libertad en el denominador	1	161	200	216	225	230
	2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3
	3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05

Los grados de libertad representan el tamaño de la muestra menos uno, y la probabilidad, p, que se usó fue 0.05, que representó el 95% de confianza. El criterio para aceptar la hipótesis nula fue: si el valor F_{exp} es menor que F_{tab} (ver Tabla A.2), entonces la diferencia entre las varianzas de las dos muestras no es significativa.

ANEXO 2

CERTIFICADO DE ANÁLISIS PARA ESTÁNDAR DE SULFATO DE D-GLUCOSAMINA



Certificate of Analysis

Product Description: D-glucosamine sulfate Catalog Number: 153928 Lot: R26366	
Formula: $C_6H_{13}NO_5 \cdot \frac{1}{2}H_2SO_4$ CAS #: 29031-19-4 Physical Description: White Powder	Formula Weight: 228.2 Storage: Room Temperature

Test	Specification	Result
Identity	Passes	Passes
FTIR:	Conforms to Reference	Conforms to Standard
Loss on Drying:	For Information Only	0.0%
Optical Rotation: (C=2, H ₂ O)	+51° to +61°	+51.5°

Assay: 100.98%
Glucosamine Sulfate: 76.14%
pH: 4.46
Residue on Ignition: 27.88%
Iron: 5 ppm
Heavy Metals: 3 ppm
Chloride: 11.37%
Potassium: 12.49%
Cd: 0.6 ppm
Arsenic: 0.45 ppm

Christina Marotta


12/08/2009 - Christina Marotta
MP Biomedicals, LLC.
Technical Director

This is an electronically generated document
<mailto:biotech@mpbio.com>
<http://www.mpbio.com>

Online Ordering, MSDSs, certificates of analysis and data sheets now available on our web site
Technical Service: 1-800-279-5490 (440-337-1200) Customer Service: 1-800-854-0530 (440-337-1200)

ANEXO 3

CERTIFICADO DE ANÁLISIS PARA FENILISOTIOCIANATO



807028 Fenilo isotiocianato
para síntesis

For general questions please contact our
Customer Service:

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Germany
Teléfono: +49 6151 72-0
Fax: +49 6151 72 2000

27 agosto 2010

Número de producto	Embalaje	Tamaño	Precio
8070280100	Frasco de vidrio	100 ml	Precio sobre pedido
8070280250	Frasco de vidrio	250 ml	Precio sobre pedido

Los precios están sujetos a cambios sin notificación.

Información sobre producto

Synonyms	Isothiocyanic acid phenyl ester, PTC
Fórmula empírica (según Hill)	C ₇ H ₅ NS
Fórmula químico	C ₆ H ₅ NCS
Número HS	2930 90 99
Número CE	203-138-1
Masa molar	135.18 g/mol
Número CAS	103-72-0

Datos químicos y físicos

Solubilidad en agua	(20 °C) insoluble,(descomposición)
Punto de fusión	-21 °C
Masa molar	135.18 g/mol
Densidad	1.13 g/cm ³ (20 °C)
Valor de pH	(H ₂ O, 20 °C) neutro
Punto de ebullición	221 °C (1013 hPa)
Presión de vapor	10 hPa (20 °C)
Temperatura de inflamabilidad	87 °C
Índice de refracción	1.6497 (20 °C, 589 nm)

Información de seguridad de acuerdo a GHS

Hazard Statement(s)	H301 + H311 + H331: Tóxico si se ingiere, por contacto con la piel o si se inhala.
---------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Precautionary Statement(s)	H335: Puede irritar las vías respiratorias. P280: Llevar guantes de protección/prendas de protección. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P304 + P340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.
Signal Word	Peligro
Hazard Pictogram(s)	
Clase de almacenamiento	6.1A Sustancias combustibles, tóxicos
WGK	WGK 3 muy contaminante para el agua
Disposal	9 Los compuestos combustibles caracterizados como cancerígenos y como "muy tóxicos" o "tóxicos" (aparte de disolventes): categoría F. Los sulfatos de alquilos son cancerígenos: evitar a toda costa la inhalación y cualquier contacto con la piel. Para su desactivación pueden añadirse, gota a gota mediante un embudo de decantación y agitando intensamente, a una solución concentrada de amoníaco enfriada con hielo (art. 105426). Antes del vertido a categoría D controlar el valor del pH con tiras indicadoras universales (art. 109535).
Información de seguridad	
Frase R	R 23/24/25-37 Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.Irrita las vías respiratorias.
Frase S	S 28-36/37-45 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua y jabón a ser posible también con polietilenglicol 400.Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).
Características de peligrosidad	tóxico, irritante
Hazard Symbol	 Toxic
Información de transporte	
Clasificación (Transporte terrestre) ADR, RID	UN 2206 Isocyanate, giftig, n.a.g.(PHENYLISOTHIOCYANAT), 6.1, II
Clasificación (Transporte marítimo) IMDG-Code	UN 2206 ISOCYANATES, TOXIC, N.O.S.(PHENYLISOTHIOCYANATE), 6.1, II
Clasificación (Transporte aéreo) IATA-DGR	UN 2206 ISOCYANATES, TOXIC, N.O.S.(PHENYLISOTHIOCYANATE), 6.1, II
Datos toxicológicos	
LD 50 oral	DL50 rata 157 mg/kg
especificaciones	
Assay (GC, area%)	≥ 98 %
Density (d 20 °C/ 4 °C)	1.132 - 1.135
Identity (IR)	passes test
	

ANEXO 4

INFORME TÉCNICO DE MANTENIMIENTO Y CALIBRACIÓN DE BALANZA METTLER TOLEDO AB204

		
	Quito, 09 de Diciembre del 2010	
	SEÑORES P.U.C.E. ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS ING. ALEXIS ARIAS CIUDAD	
	INFORME TECNICO 266-10-2010 P.U.C.E. FACULTAD QUÍMICA	
	Equipo: BALANZA	Fecha revisión: 10-Nov-2010
	Marca: METTLER TOLEDO	Próxima revisión: Noviembre-2011
	Modelo: AB204	
	Serie: 1117061658	
	Ubicación: SALA DE BALANZAS	
	Reporte de Servicio.	
<p>Se realizó mantenimiento general preventivo, limpieza interna y externa de todo el equipo y de sus componentes y accesorios, limpieza integra de la celda de carga y revisión del sistema eléctrico y electrónico de control. Ajustes de calibración del peso con patrones certificados. Pruebas de funcionamiento consistente en pruebas de carga excéntrica, linealidad, reproducibilidad, sensibilidad, cálculos de la desviación estándar y del error de incertidumbre. Para estos ensayos se utilizaron pesas METTLER TOLEDO clase E2 certificadas por el fabricante y por el INEN.</p>		
<p>Anexo a este informe se encuentra el reporte de ajustes de calibración para esta balanza así como el certificado de calibración de las pesas utilizadas.</p>		
Observaciones y Recomendaciones.		
<p>Funcional y físicamente después de realizado el mantenimiento, el equipo se encuentra trabajando correctamente. El ambiente en cual se encuentra es el adecuado sin agentes externos como vibraciones, humedad, corrientes fuertes de aire, fluctuaciones bruscas de temperatura que pudieran afectar en su normal funcionamiento.</p>		
<p>El mantenimiento y calibración de este equipo se lo debe realizar cada año.</p>		
<p>Atentamente,</p>  Daniilo Espin A. SERVICIO TECNICO TECNOESCALA S.A.		
<p>QUITO Cristóbal Góngora N28-104 y Concha Telf: (593) 2 2560077 2560070 - 2550919 Fax: 2227892 h@tecnoscala.com.ec www.tecnoscala.com.ec</p>		
<p>GUAYAQUIL 09 4024333 09 6132070</p>		
<p>MANA 09 6026887 09 6026883</p>		



BALANZA ANALITICA		CODIGO:	
Compañía:	TECNOESCALA S.A.	Marca:	METTLER TOLEDO
Cliente:	P.U.C.E. - FACULTAD DE QUIMICA	Modelo:	AB204
Dirección:	QUITO-ECUADOR	Num. Serie:	1117061658
		Capacidad Max:	210 gr
		Cap.Min. (OIML):	0,01 gr
Persona de Contacto:	ING. CHRISTIAN ARIAS	Resolución (d)	0,0001 gr
Departamento:	LABORATORIO (205)	Verificación (e)	0,001 gr
Ref. Cliente:	003-B-2009 PUCE - FAC CCQQ	Precisión Clase:	1

**REPORTE DE CALIBRACION
PRUEBAS METROLOGICAS**

Excentricidad				
	Carga Ensayo	Posición	Lectura	Desv. Centro
Unidades	[g]		[g]	[g]
	100,0000	Centro	99,9999	0,0000
		Fondo Izquierdo	100,0001	0,0002
		Fondo Derecha	100,0000	0,0001
		Frente Derecha	99,9997	0,0002
		Frente Izquierda	99,9998	0,0001
		Centro	99,9999	0,0000
Cumple Tolerancias		Error Excentricidad	0,0002 g	
SI -X- NO --		Tolerancia Fabric.	0,0004 g	

Linealidad				
-X- Absoluto	Valor Nominal	Lectura		
-- Diferencial	Tara	Tara+Referencia	Desv. Referencia	*e.m.p (OIML)
Unidades	[g]	[g]	[g]	[g]
1	2,0000	2,0000	0,0000	0,001
2	5,0000	4,9999	-0,0001	0,001
3	10,0000	10,0001	0,0001	0,001
4	20,0000	20,0001	0,0001	0,001
5	50,0000	50,0000	0,0000	0,002
6	100,0000	99,9999	-0,0001	0,002
7	200,0000	200,0001	0,0001	0,003
Cumple Tolerancias		Error Linealidad	0,00010 g	
SI -X- NO --		Tolerancia Fabric.	0,0002 g	
		Desviación Standard	0,00009 g	

Repetibilidad			
N°	Vacío	Carga	Desviación
Unidades	[g]	[g]	[g]
1	0,0000	99,9999	99,9999
2	0,0000	99,9999	99,9999
3	0,0000	99,9999	99,9999
4	0,0000	99,9999	99,9999
5	0,0000	99,9999	99,9999
6	0,0000	99,9999	99,9999
7	0,0000	99,9999	99,9999
8	0,0000	100,0000	100,0000
9	0,0000	100,0000	100,0000
10	0,0000	99,9999	99,9999
Cumple Tolerancias		Desviación Standard	0,00004 g
SI -X- NO --		Tolerancia Fabric.	0,0001 g

QUITO
Cristóbal Góngola
N24-784 y Coruña
Tels.: (593-2) 2560077
2560078 - 2550919
Fax: 3227892
tecnoscala@tecnoscala.com.ec
www.tecnoscala.com.ec

GUAYAQUIL
09 6026883
09 6158070

MANTA
09 6026887
09 6026888

Sensibilidad		
Carga de Ensayo [g]	Lectura [g]	Desviación [g]
200,0000	200,0001	0,0001 g
Cumple Tolerancias		Tolerancia Fabric 0,0003 g
SI -X- NO --		

ERROR DE INCERTIDUMBRE DE LOS ENSAYOS DE MEDICION.

**U_{combinada}= 0,00025 g

CONDICIONES AMBIENTALES

PARAMETRO	MINIMO	MAXIMO
Temperatura [°C]	18,60	19,50
Humedad [%RH]	61,0	62,0

IDENTIFICACION DE LOS PATRONES UTILIZADOS DE PESO Y TEMPERATURA

NOMBRE	MARCA	SERIE	CERTIFICADO NO.	FECHA CAL.	PROX. CAL.
JUEGO DE PESAS DE PESAS DE 1mg A 1kg, CLASE E2	METTLER-TOLEDO	15885	LPC-M-2010-015 (INEN)	06-Ene-10	Ene-12
TERMOMIGROMETRO DIGITAL TRACEABLE; 5.0% A 95.0%RH; -40.00°C A 104.4°C.	CONTROL COMPANY, MODELO 4085	80267637	CERT. NO. LPC-T-2010-271	26-May-10	May-12

OBSERVACIONES:

MANTENIMIENTO: REPARACION: INSTALACION: CALIBRACION:

**El error de incertidumbre de medida ha sido determinado evaluando todos los factores que influyen sobre el resultado medido. Los factores a considerarse son repetibilidad, sensibilidad, linealidad y excentricidad.

*Error máximo permitido por la OIML R76-1 edición 1992-E, tabla 6, página 23.

El procedimiento de evaluación fue referido al descrito en la publicación "Balanzas en la gestión de calidad" ME11795155 de Mettler Toledo de abril de 1999.

El procedimiento de calibración (SOP) es referido a "Procedimiento de Medición y Test para balanzas de Mettler-Toledo". Versión 29. May 2007, Documento: 11793000.

Las tolerancias de los ensayos son dadas por Mettler-Toledo en el manual de usuario o en el folleto de tolerancias "LabTec Balance Tolerances", Versión 9/03, Documento: 11793027.

El presente certificado fue realizado midiendo pesos patrones certificados y bajo las indicaciones y cuidados del manual de usuario del fabricante.

La balanza no debe exceder la capacidad máxima y se debe seguir el procedimiento de uso y cuidados descritos en el manual de usuario.

El equipo luego de efectuadas las pruebas, se encuentra dentro de tolerancias?

SI X NO

Responsable: DANILO ESPIN

Firma: 

EMISION: 10-NOV-2010

VENCIMIENTO: NOVIEMBRE - 2011

ANEXO 5

ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS CECIL 1021



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Freddy Rafael Sánchez Tapia con C.I. 1710489863, autor del trabajo de graduación intitulado: “Análisis de la cantidad real de glucosamina contenida en varios suplementos dietéticos por espectrofotometría ultravioleta (UV)”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 18 de mayo de 2011

Sr. Freddy Rafael Sánchez Tapia

C.I. 1710489863