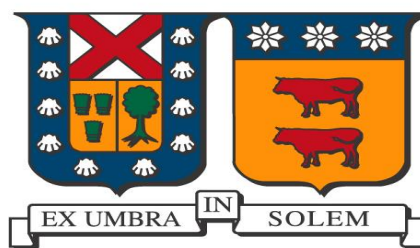


Universidad Técnica Federico Santa María

Sede Rey Balduino de Bélgica

Concepción



DETERMINACIÓN DE TAURINA EN JUGOS DE MARISCOS

MEDIANTE HPLC

Trabajo de Titulación para optar al Título
de Técnico Universitario en Química
mención Química Industrial

Alumno: Carlos David Chambers Jaime

Profesor guía: Zulema Maldonado R.

2018

El presente trabajo ha sido llevado a cabo en los Laboratorios de Análisis Instrumental del Departamento de Química y Medio Ambiente de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede Concepción, bajo la dirección de la Dra. Ximena Romo Marty, con financiamiento del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDEF (IDeAS ID15110523)

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores guías Ximena Romo y Zulema Maldonado por toda la paciencia, apoyo y constancia que tuvieron conmigo.

A mis compañeros de proyecto Rosa Garrido, Carla Sánchez y Pamela Fernández por toda la ayuda y soporte que me aportaron en el proceso del Trabajo de Título.

A Matías Alvial por hacer presente su amistad al darme ánimos para seguir adelante y su constante ayuda.

A mi familia por estar conmigo todo el tiempo y apoyarme incansablemente.

Y en especial a mi padre por su incansable perseverancia, confianza y soporte brindado todo este tiempo.

RESUMEN

Este trabajo se realizó con la finalidad de crear un protocolo para la determinación de taurina en extractos de mariscos.

La idea se originó en un intento de aprovechar los nutrientes contenidos en los extractos de mariscos, los cuales son considerados desechos líquidos de la industria pesquera. A partir de esta idea se realizó una recopilación de información acerca de distintas técnicas de cuantificación y detección de taurina y se evaluó la más adecuada para su uso.

La hipótesis utilizada como objetivo general fue: Elaborar una propuesta para realizar la identificación y cuantificación de taurina en el Laboratorio de Análisis Instrumental del Departamento de Química y Medioambiente

Al tener en cuenta los puntos anteriores queda un último objetivo específico que es: Estandarizar el método para la determinación de taurina mediante HPLC.

Teóricamente el método es simple, barato y eficiente; pero en la práctica tuvo que ser modificado debido a varios problemas con la fase móvil. Al ser solucionados estos problemas, el análisis fue realizado sin otros contratiempos. Se realizaron varios análisis en duplicado para ver la precisión del método obteniéndose resultados satisfactorios.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| OBJETIVOS..... | 2 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 2 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 2 |
| CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES | 3 |
| 1.1- Aminoácidos | 4 |
| 1.2-Propiedades ácido-base de los aminoácidos..... | 6 |
| 1.3- Técnicas para el análisis de aminoácidos..... | 8 |
| 1.4- La taurina..... | 11 |
| 1.5.- Métodos para la determinación de taurina | 12 |
| 1.6- Elección del método | 16 |
| CAPÍTULO II: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | 18 |
| 2.1- Materiales | 19 |
| 2.2- Condiciones cromatográficas | 25 |
| 2.3- Preparación de patrones y confección de la curva de calibración..... | 25 |
| 2.4- Preparación de muestras..... | 26 |
| 2.5- Reacción de derivatización..... | 27 |
| 2.6- Identificación..... | 27 |
| CAPÍTULO III: RESULTADOS | 28 |
| 3.1- Estudios de precisión..... | 29 |
| 3.2- Tratamiento e identificación de la muestra blanca..... | 29 |
| 3.3- Identificación del pico cromatográfico de la taurina..... | 30 |
| CONCLUSIONES..... | 33 |
| BIBLIOGRAFÍA | 34 |
| ANEXOS | 36 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--------------------|--------|
| Figura 1.1- | 5 |
| Figura 1.2- | 6 |
| Figura 1.3- | 7 |
| Figura 1.4- | 7 |
| Figura 1.5- | 12 |
| Figura 2.1- | 21 |
| Figura 2.2- | 21 |
| Figura 2.3- | 22 |
| Figura 2.4- | 22 |
| Figura 2.5- | 23 |
| Figura 2.6- | 23 |
| Figura 2.7- | 24 |
| Figura 2.8- | 24 |
| Figura 3.2.1. | 30 |
| Figura 3.3.1. | 31 |
| Figura 3.3.2. | 31 |
| Figura 3.3.3. | 32 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|-----------------|--------|
| Tabla 1.1. | 4 |
| Tabla 1.2. | 5 |
| Tabla 1.3. | 8 |
| Tabla 1.4. | 14 |
| Tabla 1.5. | 17 |
| Tabla 4.1. | 31 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--------------------------------------|----|
| Gráfico 1: Curva de calibración..... | 26 |
|--------------------------------------|----|

SIGLA Y SIMBOLOGÍA

Sigla:

| | |
|------------|--|
| Aa | Aminoácidos |
| RPC | Cromatografía Líquida de Fase reversa |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta eficiencia |
| EC | Electroforesis Capilar |
| CG | Cromatografía Gaseosa |
| OPA | o- ftalaldehido |
| nm..... | nanómetro |
| pg | picogramo |
| fg | femtogramo |
| ng | nanogramo |
| mcg | microgramo |
| pmol | picomol |
| mL | mililitro |
| mcL | microlitro |
| g | gramo |
| AOAC | Asociación Oficial de Químicos Agrícolas |
| ASTM | Sociedad Americana de Prueba de Materiales |

INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes avances de la industria es el manejo de los subproductos. Estos al no ser parte del producto principal, en ocasiones son considerados desechos o residuos, en cuyo caso tienen múltiples desventajas, como generar un costo extra en el proceso industrial y algunos tienen un impacto muy negativo en el medio ambiente. Al ver esta problemática se vio la necesidad de reutilizar estos productos secundarios para la confección de otros productos que tengan utilidad y disminuir la contaminación ambiental. Esta nueva fuente de materiales reutilizables ha aportado una mayor rentabilidad a los procesos industriales y ha creado muchas industrias nuevas en las que su rubro es darle utilidad a estos desechos. En la industria alimenticia estos subproductos son de un contenido nutricional muy alto; pero se debe tener cuidado con agentes procedentes del proceso principal, los que son responsables de contaminación de la zona y otros que causan la eutrofización de las aguas que puede destruir el ecosistema.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Elaborar una propuesta para realizar la identificación y cuantificación de taurina en el laboratorio de análisis instrumental del Departamento de Química y Medio Ambiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica acerca de distintas técnicas de detección de taurina, y distintas técnicas de derivatización.
- Seleccionar la técnica más adecuada para la determinación de taurina en jugo de cocción de mariscos.
- Estandarizar el método para la determinación y cuantificación de aminoácidos y taurina en líquidos de cocción de la industria conservera de mariscos

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES

1.1 AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son un componente de nuestro organismo y una parte muy importante de los alimentos que consumimos a diario ya que proveen elementos necesarios para la síntesis de proteínas. Aparte de ser componentes de las proteínas, éstos están involucrados en otras funciones del organismo como el transporte de moléculas y como fuente de nitrógeno para la síntesis de otros metabolitos. ^[1]

Estos se dividen en 2 grupos:

- Aminoácidos proteicos
- Aminoácidos no proteicos:

Los aminoácidos proteicos (Tabla 1.1) están relacionados directamente con la síntesis de proteínas.

Tabla 1.1: Aminoácidos proteicos

| Aminoácidos proteicos | | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Alanina | Glicina | Ácido Glutámico |
| Fenilalanina | Glutamina | Isoleucina |
| Lisina | Valina | Asparagina |
| Prolina | Ácido Aspártico | Serina |
| Treonina | Histidina | Tirosina |
| Cisteína | Metionina | Arginina |
| Leucina | Triptófano | |

Fuente: [1]

De estos aminoácidos solamente la mitad pueden ser sintetizados por el hombre y el resto deben ser suministrados en la alimentación. A éstos se les conoce como aminoácidos esenciales [2]. (Tabla 1.2)

Tabla 1.2: Aminoácidos esenciales

| Aminoácidos esenciales | |
|------------------------|------------|
| Arginina | Triptófano |
| Fenilalanina | Metionina |
| Lisina | Isoleucina |
| Treonina | Leucina |
| Histidina | Valina |

Fuente: [2]

1.1.1-Estructura de los aminoácidos

Los aminoácidos, como lo indica su nombre, son ácidos carboxílicos que poseen un grupo amino unido al carbono alfa del compuesto. Se define como carbono alfa el primer carbono que está unido al grupo funcional . (Fig 1.1)

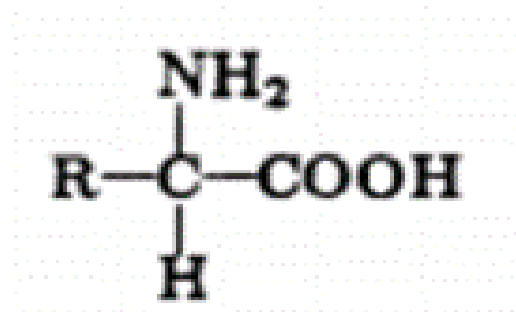


Fig.1.1: Estructura de un aminoácido

Fuente:[3]

Los aminoácidos son moléculas anfóteras al tener un grupo básico y un grupo ácido en la misma molécula describiendo su comportamiento ácido-base. Su cualidad ácido-base le ofrece a la molécula la característica de comportarse como zwitterión cuando está disuelto en una solución . Un zwitterión es una molécula que es capaz de polarizarse y mantener la carga neutra de la molécula. En el caso de la molécula de aminoácido el grupo carboxilo le entrega su protón al medio quedando con carga -1, mientras que el grupo amino capta el protón liberado quedando con carga +1. A pH fisiológico (pH 7,4) los aminoácidos están a la forma de zwitterión ^[3].

1.2-PROPIEDADES ÁCIDO-BASE DE LOS AMINOÁCIDOS

Una sustancia zwitteriónica se caracteriza, además, por ser más soluble en agua, menos soluble en disolventes orgánicos y tener un punto de fusión más elevado que los compuestos relacionados con un solo grupo a ionizar. Cuando los aminoácidos están en solución acuosa su capacidad zwitteriónica ofrece 3 posibilidades dependiendo del pH del medio donde se encuentren ^[3]:

pH ácido: Al haber altas concentraciones de protones en el medio, el grupo carboxilo acepta un protón del entorno para reemplazar el protón perdido quedando con carga neutra y dejando a la molécula con carga positiva. (Fig. 1.2)

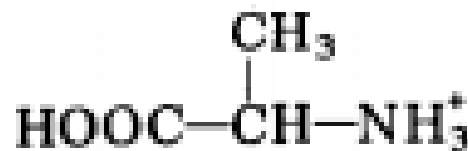


Fig. 1.2: Estructura de un aminoácido en medio ácido.

Fuente: [3]

pH básico: sucede lo contrario que en el caso anterior. En un medio con altas concentraciones de iones hidroxilo, el grupo amino le cede el protón sobrante al entorno quedando con carga neutra y dejando a la molécula con carga negativa ^[3]. (Fig. 1.3)

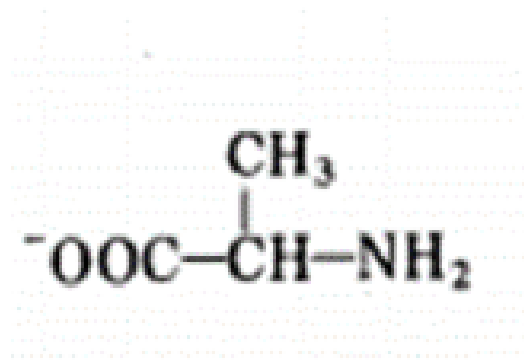


Fig. 1.3: Estructura de un aminoácido en medio básico

Fuente: [3]

A pH fisiológico (pH=7,4) la forma predominante es la forma zwitteriónica de los aminoácidos. (Fig. 1.4)

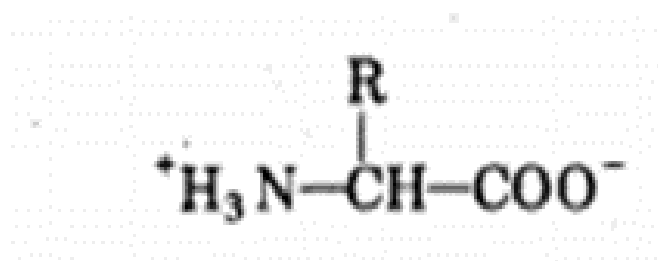


Fig. 1.4: Estructura de un aminoácido como zwitterión.

Fuente: [3]

Debido a esto, según el pH en que está el medio será la forma iónica predominante del aminoácido en cuestión, dependiendo de los pKa de los grupos amino y carboxílico de cada aminoácido. Los valores de pKa de los grupos de los aminoácidos se muestran en la tabla 1.3:

Tabla 1.3: pKa de los grupos aminos, carboxilos y radicales de aminoácidos esenciales

| Aminoácido | Tipo | Abreviatura | Letra | pK _{a1} (-COOH) | pK _{a2} (-NH ₂) | pK _{ar} (R) | pI |
|-----------------|--------------------|-------------|-------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------|
| Glicina | Neutros apolares | GLI | G | 2,34 | 9,78 | | 6,06 |
| Alanina | | ALA | A | 2,35 | 9,69 | | 6,02 |
| Valina | | VAL | V | 2,32 | 9,62 | | 5,97 |
| Leucina | | LEU | L | 2,36 | 9,64 | | 6,00 |
| Isoleucina | | ILE | I | 2,36 | 9,68 | | 6,02 |
| Metionina | | MET | M | 2,28 | 9,21 | | 5,75 |
| Prolina | | PRO | P | 1,99 | 10,60 | | 6,30 |
| Fenilalanina | Neutros aromáticos | PHE | F | 1,83 | 9,29 | | 5,53 |
| Tirosina | | TRY | Y | 2,20 | 9,11 | 10,07 | 5,65 |
| Triptófano | | TRP | W | 2,38 | 9,39 | | 5,89 |
| Serina | Neutros polares | SER | S | 2,21 | 9,15 | | 5,68 |
| Cisteína | | CYS | C | 1,96 | 10,28 | 8,18 | 5,07 |
| Treonina | | TRE | T | 2,71 | 9,62 | | 6,16 |
| Asparagina | | ASG | N | 2,02 | 8,80 | | 5,41 |
| Glutamina | | GLN | Q | 2,17 | 9,13 | | 5,65 |
| Ácido aspártico | Ácidos | ASP | D | 2,09 | 9,82 | 3,86 | 2,97 |
| Ácido glutámico | | GLU | E | 2,19 | 9,67 | 4,25 | 3,22 |
| Lisina | Básicos | LYS | K | 2,18 | 8,95 | 10,53 | 9,74 |
| Arginina | | ARG | R | 2,17 | 9,04 | 12,48 | 10,76 |
| Histidina | | HIS | H | 1,82 | 9,17 | 6,00 | 7,58 |

Fuente: [4]

1.3- TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.

El análisis de los aminoácidos nace principalmente frente a la necesidad de conocer el contenido de aminoácidos esenciales de los alimentos, puesto que éstos deben ser consumidos en la dieta por el motivo de que ellos no son sintetizados por el organismo. Martin, Cosden y Gordon fueron los primeros en realizar la determinación de aminoácidos utilizando la cromatografía en papel y ahora sus métodos se consideran clásicos dentro de la detección de aminoácidos y péptidos.

Un hecho importante fue cuando los bioquímicos Stein y Moore en sus investigaciones idearon un método de análisis de aminoácidos mediante una columna de separación cromatográfica que más tarde evolucionó en una columna de intercambio iónico [5].

Existen variados métodos basados en cromatografía para el análisis de aminoácidos de acuerdo a la exactitud, desde la cromatografía en papel hasta la cromatografía líquida:

- Cromatografía de adsorción: Está basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el reparto existente entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La mayor o menor migración de la sustancia estará afectada directamente por el coeficiente de reparto de ésta entre la fase móvil y la fase estacionaria. El coeficiente de reparto se calcula con el cociente entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por la fase móvil. Ejemplos de este tipo de cromatografía son: cromatografía en papel, cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa .

- a) Cromatografía en papel: Es uno de los métodos clásicos y más utilizados para la detección de aminoácidos de forma cualitativa. Esta técnica consiste en tener la muestra que se desea identificar en una solución. Se coloca cierta cantidad de muestra en un papel Whatman nº 1 a 2 cm del extremo inferior y este papel se coloca dentro de la cámara cromatográfica de tal manera que quede sólo 1 cm del extremo inferior sumergido en el agente eluyente o fase móvil. En el caso de los aminoácidos, la fase móvil es fenol saturado con agua. Si la muestra contiene aminoácidos, ésta debería eluir junto con la fase móvil a través del papel que es la fase estacionaria. Las principales ventajas de este método son: Utiliza materiales baratos, requiere pequeñas cantidades de muestra para la detección del analito y es muy eficaz para el análisis de sustancias muy polares. Su principal desventaja radica en que sus cromatogramas son muy lentos.
 - b) Cromatografía en capa fina: En este método se cubre una lámina con una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Las fases estacionarias más utilizadas en este método son gel de sílice y alúmina. Se deposita una cantidad de muestra en la fase estacionaria a 2 cm del extremo inferior y se sumerge la lámina de 1 cm dentro del agente eluyente. La muestra eluye de acuerdo a la afinidad por la fase móvil. La fase móvil va escalando la fase estacionaria por capilaridad ^[6].
- Cromatografía líquida de alta eficiencia con columna de fase reversa: La cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa o RPC permite separar sustancias en base a su polaridad. En este tipo de cromatografía se aprovechan las fuerzas de repulsión que se producen entre un compuesto polar (fase móvil), un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. La fase estacionaria más utilizada es sílica tratada con RMe_2SiCl , donde R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . En este tipo de cromatografía la fase móvil circula en contacto con la fase estacionaria y al introducir una mezcla de sustancias en la corriente de la fase móvil cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad con cada una de las fases. La técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography o

cromatografía líquida de alta eficiencia) en fase reversa es un tipo de cromatografía líquida de alta eficiencia con columna de fase reversa, y es la técnica mayormente usada para la identificación y detección de aminoácidos ^[6].

- Cromatografía de intercambio iónico: Este método permite la separación de moléculas basado en sus propiedades de carga eléctrica. Contiene una fase estacionaria (ya sea aniónica o catiónica) que funciona como intercambiador iónico y contiene contraiones que se intercambian con los iones de analito. Generalmente la fase móvil utilizada es un solvente orgánico que contiene especies iónicas en forma de buffer. El mecanismo utilizado para esta técnica es que se hace pasar la disolución con el analito y los iones de analito van formando uniones iónicas estables con la fase estacionaria, luego se hace pasar la fase móvil la cual contiene especies iónicas que compiten con el analito por un lugar en la fase estacionaria intercambiándose el analito en la fase móvil y eluyendo con ella de la columna cromatográfica ^[7].
- Electroforesis: Es una técnica de separación que se basa en la diferencia de velocidad de las moléculas en un campo eléctrico a través de una membrana porosa, la cual las separa por diferencia de tamaño molecular y carga eléctrica. La técnica clásica utiliza una tira recubierta de una sustancia porosa impregnada de un electrolito. Sus extremos se sumergen en dos depósitos independientes que contienen ambos al electrolito y están unidos a los electrodos del generador de corriente. La muestra se deposita en forma de un pequeño trazo transversal en la tira. En el caso de los aminoácidos si controlamos el pH de la matriz de la muestra, su comportamiento de zwitterión hará que la molécula de aminoácido adquiera carga y migrará hacia uno de los electrodos ^[8].
- Cromatografía gaseosa (CG): La cromatografía de gases capilar constituye otra alternativa para el análisis de aminoácidos. Esta técnica es rápida, y tiene un alto poder de resolución y sensibilidad, pero se necesita gran experiencia. Además, como los aminoácidos libres no son suficientemente volátiles necesitan ser convertidos en derivados volátiles para poder determinarlos. Los ésteres de aminoácidos acilados son la clase más frecuente de derivados para el análisis de aminoácidos por CG. La principal desventaja de la cromatografía de gases parece ser el procedimiento de la derivatización, debido a la complejidad de las reacciones y los tipos de reactivos usados ^[9].

1.4- LA TAURINA

La taurina es una molécula derivada del aminoácido metionina el cual está implicado en numerosas funciones biológicas y fisiológicas en el cuerpo humano. Fue aislado por primera vez en 1827 de la bÍlis de un buey[10]. Se considera esencial para los bebés ya que ellos no son capaces de sintetizarlo y condicionalmente esencial para los adultos pues éste es capaz de producirse cuando las personas consumen vitamina B6 en su dieta debido a que ésta es requerida como cofactor del ácido cisteinosulfónico descarboxilasa para la formación de hipotaurina a partir del ácido cisteinosulfónico. Algunas de las funciones más importantes de la taurina reside en su función como osmoregulador y en su capacidad para atrapar moléculas pro oxidantes, es decir, es un antioxidante. Desde un punto bioquímico y nutricional su rol ha llegado a ser conocido en mayor propiedad en este último tiempo. Además, ha sido usada en muchos estudios clÍnicos para tratar varias condiciones patolÓgicas como la hipertensi3n, diabetes mellitus y en falla cardÍaca[11]. Se ha observado, en algunas etapas del desarrollo, que en algunos tejidos existe una correlaci3n inversa entre la concentraci3n de la taurina y la de ambos fosfolÍpidos de membrana. Tambi3n, se ha demostrado que la taurina puede tener un rol importante en el cambio de algunas propiedades de la membrana, como la fluidez, la capacidad de transporte de algunos iones y la regulaci3n de la actividad de algunas enzimas enlazadas a la membrana, asÍ como tambi3n en la mantenci3n del potencial de la membrana y el pH intracelular. Al ser muy similar a un aminoácido ésta posee sus mismas propiedades el3ctricas.

1.4.1- Estructura y caracterÍsticas de la taurina

La taurina (Ácido 2-aminoetanosulf3nico) (fig.1.5) es un compuesto incoloro el cual cristaliza como agujas tetragonales, que posee un peso molecular de 125 g/mol. Es un compuesto soluble en agua (10,48 g/100 mL a 25 °C) pero insoluble en etanol y 3ter. A 25 °C su $pK_a(SO_3H)$ es de 1,5 y $pK_b(NH_3)$ de 8,74 [12].

La taurina puede ser obtenida por sÍntesis orgÁnica o fuente natural como la bÍlis de buey y moluscos. Los m3todos para determinaci3n de aminoácidos son usados generalmente para la determinaci3n de taurina.

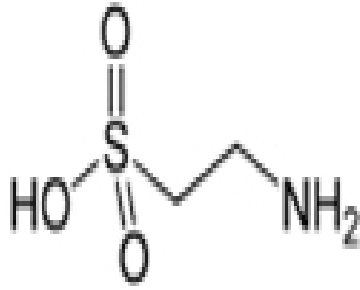


Fig.1.5: Estructura de la taurina

Fuente: [13]

1.5.- MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE TAURINA

Se ha visto los distintos tipos de técnicas instrumentales más utilizados para la detección de aminoácidos; pero éstos al ser moléculas complejas dependen de otros factores para su cuantificación, como una preparación de la muestra a ser analizada y del sistema de detección específico, que depende de la naturaleza de la muestra después de su preparación y del tipo de técnica analítica utilizada.

1.5.1- Sistemas de detección

Los detectores son un componente esencial en las técnicas instrumentales para análisis. Su función es identificar y en algunos casos cuantificar el analito en la sustancia. Este debe poseer características únicas que los hacen ideales según el tipo de análisis que se requiera. Algunas de estas características son:

- Sensibilidad alta
- Respuesta universal a todos los solutos o selectividad específica de cada uno
- Rango de trabajo de temperatura amplio
- Bajo nivel de ruido [14]

En la tabla 1.4 se indican los detectores más comunes para CG y HPLC.

Tabla 1.4: Tipos de detectores más utilizados y algunas características.

| Cromatografía de gases | | |
|---|--|---------------------------------|
| Tipo de detector | Muestras aplicables | Límites de detección |
| Termoiónico | Nitrógeno y compuestos de fósforo | 0,1 pg/s (P); 1 pg/s (N) |
| Fotoionización | Compuestos ionizados mediante radiación UV | 2 pg C/s |
| Ionización por llamas | Hidrocarburos | 1 pg/s |
| Captura de electrones | Compuestos halogenados | 5 fg/s |
| Conductividad térmica | Detector universal | 500 pg/ml |
| Espectrómetro de masas | Utilizable para cualquier especie | 0,25 a 100 pg |
| Conductividad electrolítica | Compuestos que contienen halógenos, azufre o nitrógeno | 0,5 pg Cl/s; 2 pg S/s; 4 pg N/s |
| Infrarrojo de transformada de Fourier | Compuestos orgánicos | 0,2 a 40 ng |
| Cromatografía líquida de alta eficiencia | | |
| Tipo de detector | Muestras aplicables | Límites de detección |
| Detector de Absorción | Detector universal (*) | 10 pg |
| Detector electroquímico | Detector universal (*) | 100 pg |
| Detector de fluorescencia | Detector universal (*) | 10 fg |
| Detector de índice de refracción | Detector universal (*) | 1 ng |
| Detector espectrométrico de masas | Detector universal (*) | 1 pg |
| Detector de dispersión de luz tras evaporación | Detector universal (*) | 1 mcg |

(*) Dependen de la elección de la preparación de la muestra

Fuente: [14], [15]

1.5.2- HPLC para identificar y cuantificar taurina.

La falta de un detector universal en HPLC que ofrezca una alta sensibilidad (además de cierto grado de selectividad) ha obligado al desarrollo de algunos procedimientos de acondicionamiento adecuados como la derivatización. La derivatización es la modificación química de un compuesto para obtener otro con propiedades más adecuadas para el procedimiento analítico utilizado. Resulta una herramienta analítica que puede usarse para ofrecer selectividad y sensibilidad. Se derivatizan compuestos o mezclas de compuestos antes del análisis por los siguientes motivos:

1. Para que un compuesto que no se puede analizar mediante un método particular resulte idóneo para el análisis.
2. Para mejorar la eficacia analítica del compuesto.
3. Para mejorar la detectabilidad del compuesto.

En derivatización para HPLC pueden usarse técnicas de pre y de post columnas. Las técnicas pre-columna ofrecen una mayor simplicidad técnica y se pueden usar para mejorar la estabilidad, la resolución, la simetría de pico y aumentar o disminuir el tiempo de retención de los solutos. Las técnicas post-columna se utilizan principalmente para mejorar la selectividad y la sensibilidad ^[16]. Las reacciones de derivatización para aminoácidos más utilizadas se presentan a continuación:

- Método de la ninhidrina: La ninhidrina se utiliza para la determinación de los aminoácidos tras su separación en su forma natural por cromatografía de intercambio iónico. Ésta reacciona con los aminoácidos en medio ácido (pH 3-4) produciendo un complejo de color púrpura-azulado. La determinación de aminoácidos requiere previamente de la eliminación de interferentes como proteínas, amoníaco, urea, etc. Por tanto, la derivatización con ninhidrina es exclusivamente postcolumna, así se evita que la ninhidrina reaccione con otras sustancias no deseadas. La reacción de la ninhidrina con los aminoácidos es muy sensible, llegándose a detectar cantidades inferiores a un picomol pero raramente reproducibles por debajo de 100 picomoles. Esta limitación la hace inadecuada para muchas de las aplicaciones demandadas actualmente. La sensibilidad de la ninhidrina depende de una serie de factores: es muy sensible a la luz, al oxígeno atmosférico, a cambios de temperatura y de pH. Este derivado de color azul absorbe una longitud de onda de 540 nm.
- Método del o-ftaldehido (OPA): Los aminoácidos pueden reaccionar con OPA en presencia de 2-mercaptoetanol a pH básico produciendo un compuesto

fluorescente con un máximo de excitación de 340 nm y un máximo de emisión de 455 nm. La reacción se realiza rápidamente sin necesidad de calentamiento. Una clara ventaja que posee este método es que es hasta 10 veces más sensible que el método de la ninhidrina; pero su principal inconveniente es que se necesita un detector de fluorescencia en el cromatógrafo.

- Método de la fluorescamina: Los aminoácidos reaccionan con la fluorescamina dando origen a un derivado fluorescente con un máximo de excitación de 390 nm y un máximo de emisión de 475 nm, el cual es inestable en soluciones acuosas pero estable en solventes orgánicos como la acetona. La reacción se produce rápidamente a temperatura ambiente. Posee las mismas desventajas que el OPA frente a la ninhidrina.
- Método del Cloruro de dansilo: Los aminoácidos reaccionan con cloruro de dansilo a pH básico (pH=9,5) para formar un compuesto fluorescente. El color del compuesto es dependiente del aminoácido específico del cual se formó, por lo que, no hay una longitud de onda específica para todos los aminoácidos pero se suele utilizar una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de emisión de 480 nm.

1.6- ELECCIÓN DEL MÉTODO

Cada método tiene sus ventajas e inconvenientes, por lo que, su selección es un paso muy difícil. Para seleccionar el método adecuadamente se tuvieron en cuenta varios aspectos muy importantes como la sensibilidad, el costo, la institución que validó el método, la repetibilidad y la reproducibilidad. Para entender claramente este procedimiento de selección, hay que definir estos conceptos previamente:

- Sensibilidad: Es la capacidad de un instrumento o método de desprender pequeñas concentraciones de analito.
- Costo: El costo se establece analizando el costo del equipo, el costo del detector, cantidad de análisis a realizar y cantidad de materiales y reactivos necesarios para su ejecución.
- Repetibilidad: Parámetro analítico que mide la capacidad de un instrumento de entregar los mismos resultados en diferentes mediciones en igualdad de condiciones
- Reproducibilidad: Mide cuan replicable es el análisis por otros analistas ^[17].

En la tabla 1.5 se ven reflejados los resultados de la selección:

Tabla 1.5: Tabla comparativa de métodos

| <u>Método</u> | <u>Sensibilidad del método</u> | <u>Costo</u> | <u>Institución que lo valida</u> | <u>Repetibilidad y reproducibilidad</u> |
|--|--------------------------------|--------------|----------------------------------|---|
| <u>AOAC 997.05 oficial Taurina en leche fortificada</u> | <u>5</u> | <u>2</u> | <u>5</u> | <u>5</u> |
| <u>AOAC 999.12 Taurina en alimentación animal</u> | <u>5</u> | <u>3</u> | <u>5</u> | <u>4</u> |
| <u>Ensayos de taurina en muestras de microdiálisis</u> | <u>5</u> | <u>4</u> | <u>3</u> | <u>3</u> |
| <u>Óptima longitud de onda para determinación de Taurina</u> | <u>5</u> | <u>4</u> | <u>3</u> | <u>1</u> |
| <u>Taurina en alimentos y leche para niños</u> | <u>5</u> | <u>5</u> | <u>4</u> | <u>1</u> |
| <u>Taurina en bebidas energéticas</u> | <u>5</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>1</u> |

Fuente: Elaborada a partir de un análisis propio de los métodos propuestos.

Los valores oscilan entre 1 y 5 siendo 5 el más alto y 1 el más bajo.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1- MATERIALES

2.1.1- Muestras

El primer paso y uno de los más importantes en lo que se refiere a análisis son el muestreo y el tratamiento de la muestra, los cuales dependen de múltiples factores. El tamaño de la muestra y la composición son algunos parámetros que definen que tipo de técnica analítica utilizar. La clasificación del análisis de acuerdo al tamaño de la muestra puede ser:

- Macroanálisis: Este término es utilizado cuando el peso de la muestra es mayor a 0,1 g.
- Semimicroanálisis: La masa de la muestra está entre 0,1 y 0,01 g.
- Microanálisis: El intervalo de las muestras está entre 10^{-2} y 10^{-4} g.
- Ultramicroanálisis: Todas las muestras son menores a 10^{-4} g.

Con sólo esta definición se puede apreciar que dependiendo de la cantidad de muestra se debe aplicar un tratamiento distinto. Cuando se analizan muestras reales el análisis en sí se dificulta más debido a que éstas contienen muchos otros componentes en la matriz junto al analito, y éstos a menudo tienen propiedades químicas similares a las del analito. Estas especies pueden reaccionar con los mismos reactivos del analito y pueden ocasionar errores en la lectura del equipo o errores al utilizar un método gravimétrico o volumétrico ^[16]. En este análisis se tiene 3 tipos de muestras a las que se les aplica el procedimiento: muestras blanco, muestras problemas y muestras estándares. Las muestras blanco son un tipo de muestras cuya matriz contiene los mismos reactivos que hay en las muestras problemas excepto el analito que se desea determinar y su función es identificar si los componentes de la matriz reaccionan entre sí o en el proceso creando alguna interferencia. Las muestras problemas son muestras de concentración desconocida y se pueden ver en todo tipo de análisis de laboratorio. Las muestras estándares son muestras que tienen una concentración conocida y son utilizadas para conocer parámetros específicos de las muestras problemas, por ejemplo, observar el punto de equivalencia en una titulación en un análisis volumétrico o realizar una curva de calibración en un análisis instrumental.

2.1.2- Reactivos

- a) Agua grado HPLC
- b) Agua ultra pura obtenida de purificador
- c) Acetonitrilo grado HPLC
- d) Ácido acético glacial
- e) Solución amortiguadora de acetato de sodio: 10 mM, pH 4,2. Pesar 0,820 g de acetato de sodio, disolviendo en 800 mL de agua, ajustando el pH a 4,180 con ácido acético glacial y aforando a 1 L en un matraz aforado.
- f) Fase móvil: Solución amortiguadora de acetato de sodio/ Acetonitrilo (74 + 26, v/v). Preparar un litro mezclando 740 mL de acetato de sodio con 260 mL de acetonitrilo
- g) Solución amortiguadora de carbonato de sodio: 80 mM, pH 9,5. Pesar 0,424 g de carbonato de sodio anhidro, disolver en 50 mL de agua, ajustar el pH a 9,5 con ácido clorhídrico 1 M y aforar a 100 mL.
- h) Reactivo de Carrez 1: Pesar 15,0 g de ferrocianuro de potasio trihidratado, disolver y aforar en un matraz aforado de 100 mL.
- i) Reactivo de Carrez 2: Pesar 30,0 g de acetato de zinc dihidratado, disolver y aforar en un matraz aforado de 100 mL.
- j) Cloruro de dansilo: 1,5 mg/mL. Pesar 0,015 g de cloruro de dansilo (cloruro de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil) y disolver en 10 mL de acetonitrilo.
- k) Solución de piridina: 4% v/v. Agregar 4 mL de piridina a matraz aforado de 100 mL y aforar con agua ultra pura.
- l) Solución estándar de taurina 1000 ppm

2.1.3-Instrumentación

2.1.3.1- Cromatógrafo de alta eficacia

Sistema de cromatografía líquida SHIMADZU formado por:

- Inyector manual SHIMADZU 7725
- Bomba de gradiente cuaternario SHIMADZU DGU 20A5r
- Estación de datos SHIMADZU

- Horno SHIMADZU CTO-20A/20AC
- Detector UV-visible SHIMADZU
- Columna de sílice C18 en fase reversa tamaño de partícula 5 mcm



Fig. 2.1

2.1.3.2- Otros Instrumentos

- a) Equipo de ultrasonido



Fig. 2.2

b) Centrífuga



Fig. 2.3

c) Agitador de vórtice



Fig. 2.4

d) Purificador de agua



Fig. 2.5

e) Balanza analítica



Fig. 2.6

f) Pehachímetro digital



Fig. 2.7

g) Baño termostatzado



Fig. 2.8

2.1.4- Otros materiales

- Matraz aforado 100 mL, 200 mL y 1000 mL
- Micropipetas 100 mcL y 1000 mcL
- Papel filtro Whatman N° 2
- Embudo de vástago corto
- Viales de reacción de 10 mL
- Viales de reacción de 2 mL

2.2- CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

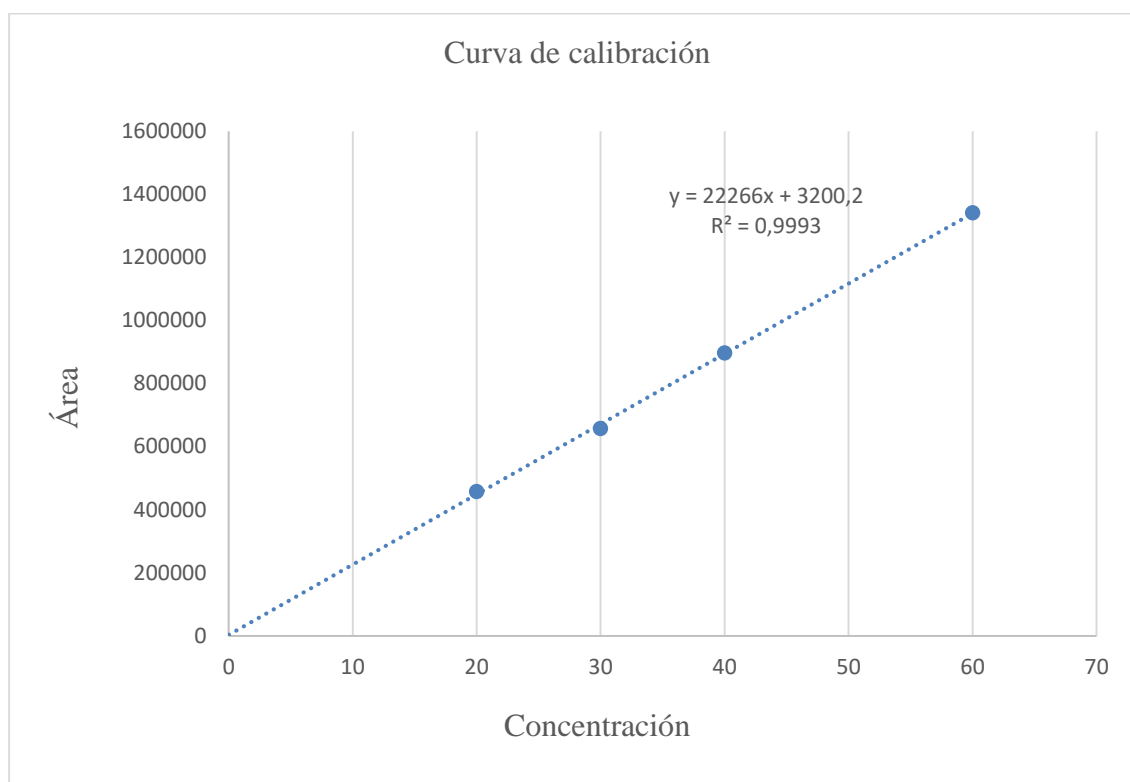
Se utilizó el método de gradiente isocrático, ya que como la mezcla entre el tampón de acetato de sodio y acetonitrilo produce efervescencia y estas burbujas interfieren en la lectura del equipo es conveniente tener la mezcla preparada y extraerle todo el gas posible tratándola en un equipo de ultrasonido. Inicialmente, se realizó el análisis siguiendo el método original paso a paso utilizando una fase móvil compuesta por 840 mL de tampón de acetato de sodio y 160 mL de acetonitrilo con la cual la muestra eluía con un tiempo de retención de 35 min aproximadamente. Considerando la cantidad de muestras a las que se realizaría el análisis, se modificó la proporción de tampón de acetato de sodio y acetonitrilo a 740 mL y 260 mL respectivamente, con el fin de disminuir el tiempo de retención.

2.3- PREPARACIÓN DE PATRONES Y CONFECCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Se prepararon patrones de taurina de 20, 30, 40 y 60 ppm a partir de la solución estándar de taurina 1000 ppm diluyendo 2, 3, 4 y 6 ml de estándar en matraces aforados de 10 ml.

Se leyó cada patrón en el equipo y como resultado se obtuvo la siguiente curva:

Gráfico 1: Curva de calibración



2.4- PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Las muestras se prepararon en matraces aforados de 100 mL pesando 0,5 g aproximadamente y posteriormente diluyendo en 80 ml de agua. Se llevaron las muestras diluidas a un baño termostatzado a 55 +/- 5 °C durante 10 min y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Se agregó 1 mL de reactivo de Carrez 1 y 1 mL de reactivo de Carrez 2 para precipitar las proteínas presentes en la matriz de la muestra, se mezcló bien agitando y se dejó reposar durante 20 min en la oscuridad. Se aforó y se filtró con papel filtro Whatman N° 2 dejando correr los primeros 2 o 3 mL de solución para cebar los viales.

2.5- REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN

Se agregaron en un vial de reacción de 2 mL; 0,5 mL de tampón de carbonato de sodio, 0,5 mL de filtrado y 0,5 de cloruro de dansilo y se llevó a baño termostático a 25 ±3 °C durante 2 horas. Pasadas las 2 horas se detuvo la reacción utilizando 0,05 mL de solución de piridina 4%. Se llevó al agitador de vórtice y luego 5 min en la centrífuga.

2.6- IDENTIFICACIÓN

Se utilizó un detector UV para su identificación utilizando una longitud de onda de 254 nm. Se leyeron muestras en el equipo con el fin de conocer el tiempo de retención y la ubicación del pico cromatográfico utilizando los métodos de la curva de calibración y adición estándar. En cada método se trabajó con una solución estándar de taurina de concentración 30 mg/L, una muestra con concentración desconocida y un duplicado de la misma muestra resultando en un tiempo de retención promedio de 6 min.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1- ESTUDIOS DE PRECISIÓN

La precisión es un indicador que mide el grado de dispersión entre varios análisis de una misma muestra. Este grado de dispersión se cuantifica como coeficiente de varianza el cual establece una relación entre la lectura de una muestra repetidas veces y el promedio de éstas. La finalidad de este estudio es para determinar que tanto pueden influir ciertos errores sistemáticos en el análisis ^[18]. El coeficiente de varianza (C.V) se expresa con la siguiente ecuación:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Donde S es la desviación típica o desviación estándar, X es la media aritmética o promedio de los datos. En este caso el coeficiente de variación dio un 1,47 % lo cual es una cantidad aceptable para este método.

3.2- TRATAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA BLANCA

La muestra blanca se preparó utilizando exactamente el mismo procedimiento que las muestras y la concentración leída fue de -0,289 la cual implica que los reactivos utilizados no interfieren en la lectura del analito ^[18].

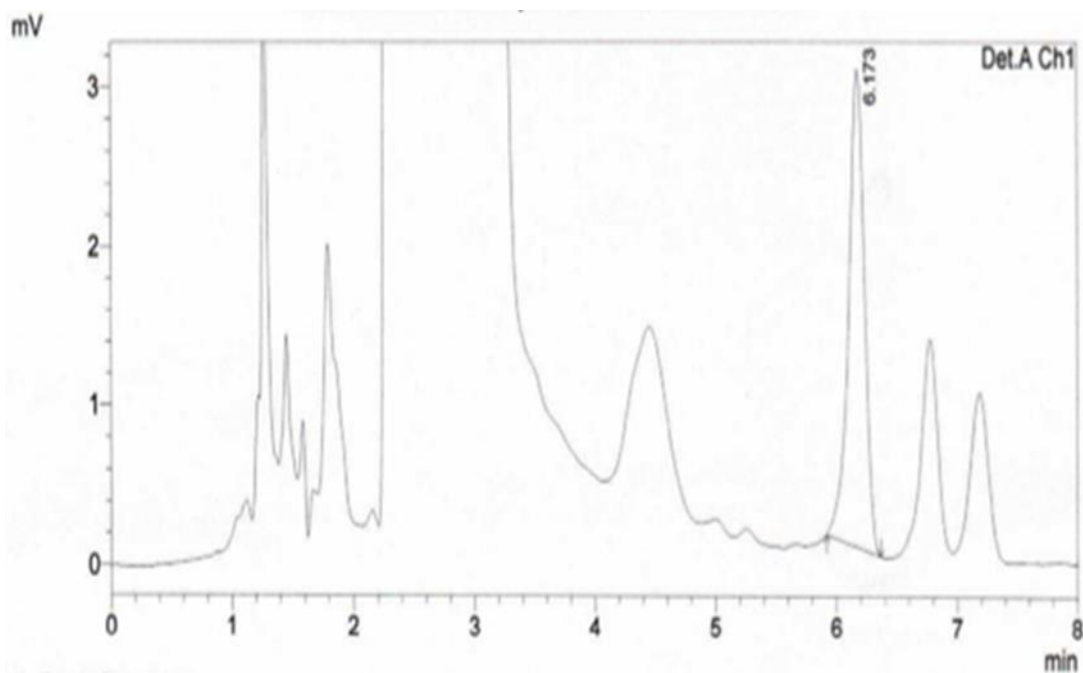


Fig. 3.2.1: Cromatograma de la muestra blanca

3.3- IDENTIFICACIÓN DEL PICO CROMATOGRÁFICO DE LA TAURINA

Se preparó un estándar de taurina de concentración 30 mg/L y se leyó para obtener un cromatograma, con un pico cromatográfico identificable (Fig 3.3.1). Luego se preparó una muestra real a la cual se le agregó una cantidad extra de estándar de taurina (Fig. 3.3.2). Al leer esta muestra se pudo observar que el pico cromatográfico era similar al del estándar con la diferencia que la concentración era mayor. Al final se leyó una muestra real con el fin de comparar y comprobar exactamente la localización del pico cromatográfico de la taurina (Fig. 3.3.3).

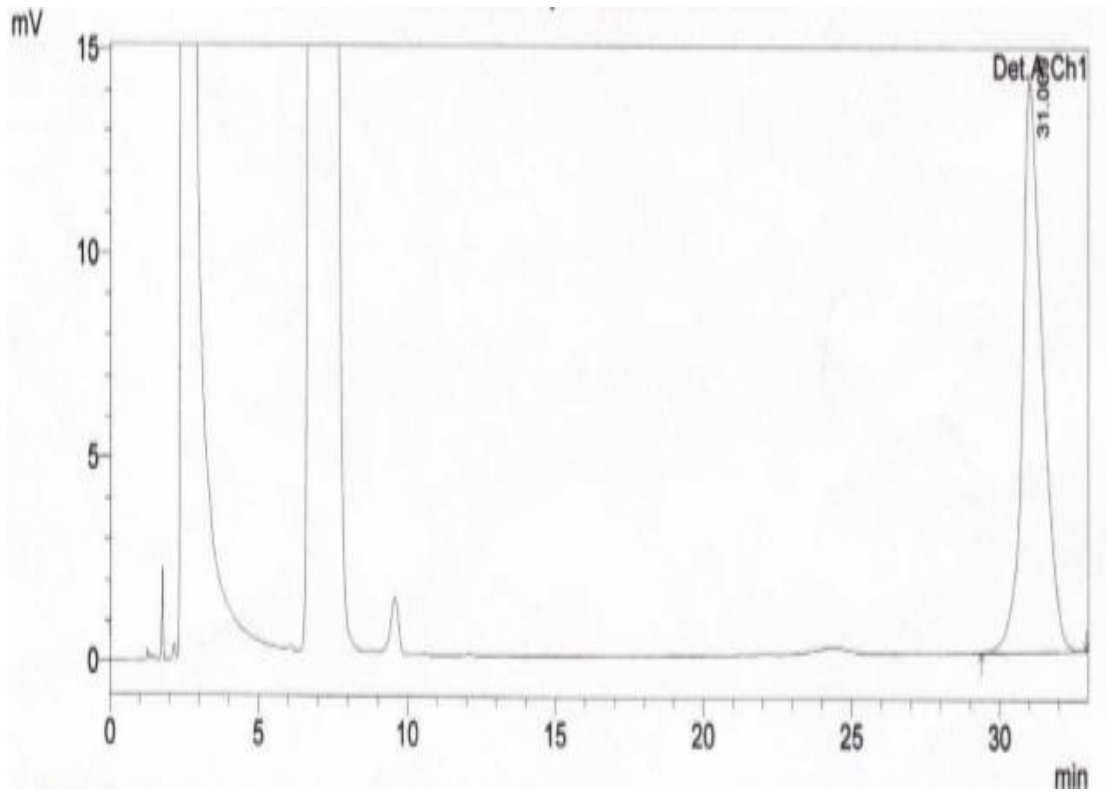


Fig. 3.3.1: Cromatograma del estándar de taurina

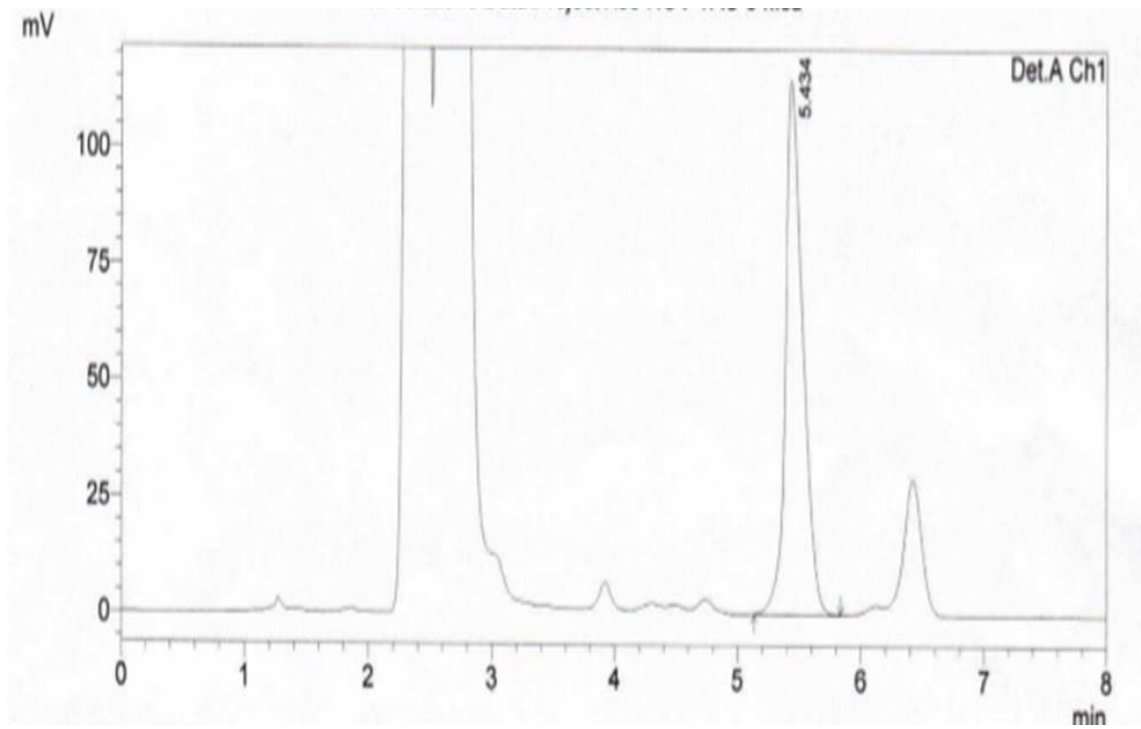


Fig.3.3.2: Cromatograma de una muestra con adición estándar

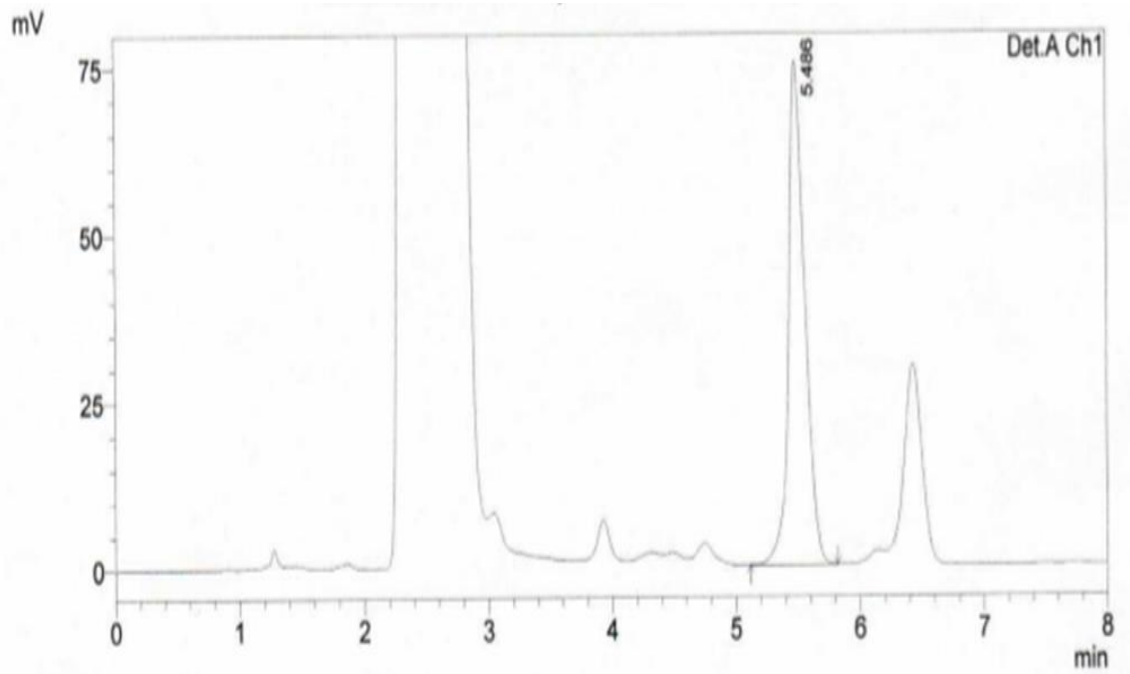


Fig.3.3.3: Cromatograma de una muestra real

Tabla de resultados de muestras leídas

| Nº de muestra | Concentración de Tau(mg/100 g) |
|---------------|--------------------------------|
| 1 | 548,858 |
| 2 | 577,891 |
| 3 | 540,007 |
| 4 | 580,365 |
| 5 | 605,510 |
| 6 | 316,345 |
| 7 | 262,007 |
| 8 | 299,022 |

Tabla 2.1: Resultados

CONCLUSIONES

Del trabajo realizado se puede concluir que:

1. Para validar este método se necesitó indagar sobre varias metodologías para la identificación y cuantificación de aminoácidos, que estuvieran certificadas por instituciones de prestigio en el campo del análisis como AOAC y ASTM.
2. Luego de seleccionado el método hubo que ejecutarlo con las condiciones del laboratorio de la Universidad. A lo largo de las pruebas se constató que la fase móvil producía efervescencia, que causaba errores al momento de la lectura. Esto se solucionó llevando la fase móvil durante 10 min a un equipo de ultrasonido para eliminar las burbujas.
3. Resuelto el problema de la efervescencia se procedió con la lectura la cual tuvo un tiempo de retención de 30 min en promedio.
4. Con la finalidad de disminuir el tiempo de retención del analito se modificó la proporción de la fase móvil de acetonitrilo – tampón acetato de sodio/ ácido acético desde 16:84 a 26:74 de los mismos reactivos respectivamente. Después de este cambio el tiempo de retención se redujo desde 30 min hasta 6 min en promedio.
5. Resueltos estos problemas se hicieron análisis de precisión y exactitud que sirvieron para verificar los resultados, comprobar homogeneidad de las muestras y correcto funcionamiento de los equipos. Con esto se logró cumplir el último objetivo específico y el objetivo general probando la factibilidad y veracidad del método.

BIBLIOGRAFÍA

1. <ftp://ftp.utralca.cl/profesores/raherrera/biorom2008/contenido/cibertexto/aa/aa3.htm>
2. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-5-proteinas.pdf>
3. PLUMMER David T., BARRERA Luis Alejandro Bioquímica Practica McGraw-Hill Latinoamericana VEJAR Rivera Eva Irma– Prácticas de bioquímica descriptiva- Hermosillo, Sonora: Editorial Unison, [2005] ISBN 970-689-263-X
4. <http://www.quimitube.com/determinar-pk-aminoacido-valoracion-acido-base>
(referencias: Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Salamanca. Verónica González Núñez. Tema 4. Curvas de titulación de aminoácidos.
5. Moore, S. and Stein, W.H. (1963). Meth. Enzymol. 6, 819.
6. Skoog, D. A., Holler, J. H., Stanley L. C “Principios de Análisis Instrumental”, 6ta Editorial. Cen.gage Lea.rning, ISBN 978 607 481 390 6 [2008].
7. <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Cromatografia%20de%20intercambio%20ionico.pdf>
8. ROCA Pilar OLIVER Jordi RODRIGUEZ Ana M^a- Bioquímica Técnicas y métodos, editorial Hélice, Madrid, [2003] ISBN 84-921-124-8-4
9. ROUESSAC, F. Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. España, McGraw Hill. Págs. 121-133 [2003] ISBN 978-844-813-785-4
10. <https://scientiablog.com/2015/06/09/bifrutas-active-de-pascual-y-su-extrano-sin-aurina>
11. CHAPMAN, R.A., SULEINAN, M.S. &Earm, Y.E. (1993) Taurine and the heart, Cardiovascular Research, Volume 27, issue 3, (pp. 358-363)
12. Review Taurina (Anexo 1)
13. <https://mx.depositphotos.com/126353134/stock-photo-molecular-structure-of-aurine.html>
14. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf
15. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf
16. KNAPP R. Daniel – Handbook of analytical derivatization reactions
17. LLAMOSAS R, Luis Enrique; Meza Contreras, Luis G. ; Botero Arbeláez, Marcela . estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de

calibración de acuerdo con la norma técnica NTCISO/ IEC 17025. Scientia et technica, [S.l.], v. 1, n. 35, ene. 2007. ISBN 2344-

18. SKOOG D, WEST D. M, HOLLER J Fundamentos de Química Analítica 8va edición, S.A Ediciones Paraninfo [2005] ISBN 9788497323338

ANEXOS

Anexo 1: Review Taurina

Anexo 2: Método AOAC 997.05 oficial Taurina en leche fortificada

Anexo 3: Método AOAC 999.12 Taurina en alimento animales

Anexo 4: Método Ensayos de taurina en muestras de microdiálisis

Anexo 5: Método Optima longitud de ondas para determinación de Taurina

Anexo 6: Método Taurina en alimentos y leche para niños

Anexo 7: Método Taurina en bebidas energéticas